

ANTONINO CATARA

Socio corrispondente

VITTORIA CATARA

Università degli Studi di Catania

IL “MAL SECCO” DEGLI AGRUMI, DA UN SECOLO IN SICILIA

Dati del Dipartimento di Agricoltura degli Stati Uniti indicano che a gennaio 2017 la produzione mondiale di limoni (e di lime) era di 7.252.000 t, con il Messico al primo posto (2.400.000 t), seguito da Spagna (quasi un milione), Argentina (782.000 t) e Turchia (640.000 t). Nello stesso periodo, in Italia il limone occupava 21.222 ha per una produzione complessiva di 440.560 t. La Sicilia contribuiva per 384.458 t, con punte più elevate nelle province di Siracusa (128.000 t) e Catania (112.000 t) (ISTAT). Comparando questi dati con quelli del periodo 1984-86 emerge crudamente che in 30 anni la superficie investita a limone è diminuita del 45% e la produzione del 41%. Una perdita che grava pesantemente sulla Sicilia, che in quegli anni vantava una produzione di 680.300 t e una superficie coltivata di 35.000 ha. Un declino in buona parte associato al dilagare del “mal secco”, la tracheomicosi causata dal fungo *Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc. & Gik [oggi *Plenodomus tracheiphilus* (Petri) Gruyter, Aveskamp & Verkley]. Se ne discusse in occasione del “Seminario Internazionale sul mal secco degli agrumi” tenutosi a Capo d’Orlando (ME) (Cutuli et al., 1984). La documentata rassegna sullo stato dell’arte dell’epoca costituisce, unitamente ad altre più recenti (Migheli et al., 2009; Nigro et al., 2011; EFSA PLH, 2014), il punto di partenza per la comprensione di una malattia altamente distruttiva che rimane il fattore limitante la limonicoltura di molti Paesi,

per i danni ingentissimi alla produzione e al patrimonio arboreo¹. Come evidenzia l'inclusione del patogeno fra i patogeni di quarantena di tutte le organizzazioni fitosanitarie internazionali e nella lista delle armi biologiche ad elevato potenziale distruttivo².

Numerosi autori hanno affrontato lo studio della malattia, talvolta in modo saltuario e non coordinato, con risultati non sempre conclusivi a causa delle risorse limitate. In questa sede, lungi dal voler mettere ordine, si ripercorrono alcuni dei temi affrontati che, nella visione degli autori, sono più vicini ai fabbisogni più urgenti.

NOTIZIE STORICHE E DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

I documenti disponibili indicano che il mal secco fu osservato per la prima volta nel 1834 in Grecia, nelle isole dell'Egeo. Alcuni autori, tuttavia, ritengono che abbia origine in Asia centrale (Persia, Afghanistan, e India nord-occidentale), dove ha avuto origine il limone. Nel tempo la malattia si è diffusa in tutti i Paesi agrumicoli del bacino del Mediterraneo, intorno alle coste del Mar Nero e nell'Asia Minore (EPPO Global Database, 2019). Recentemente è stato ritrovato un focolaio nella provincia di Malaga (Spagna)³, mentre non risulta ancora segnalata in Portogallo, Marocco, Malta e Croazia.

¹ Secondo indagini dell'epoca, i limoneti gravemente colpiti da mal secco avevano una produzione intorno a 20 t/ha, appena il 30% dei limoneti non affetti. Il 5 % delle piante morte e il 50% di quelle ammalate erano affette da mal secco (EFSA PPIH,2014). Vista la gravità della situazione, per evitare effetti disastrosi sull'economia siciliana, il governo regionale stanziò un contributo straordinario per l'applicazione degli interventi di difesa.

² Lillie S.H., Hanlon E.Jr., Kelly J.M., Rayburn B.B. Army Knowledge Online. 2005 (www.us.army.mil).

³ Il rinvenimento risale a luglio 2015, su limone Fino innestato su *Citrus macrophylla*, nella valle del Guadalhorce (provincia di Málaga). Le autorità fitosanitarie hanno predisposto un piano provinciale di eradicazione che impone l'obbligo di estirpazione delle piante malate nelle aree infette e nelle aree di sicurezza, il divieto di circolazione e di impianto di specie suscettibili nel territorio, e l'adozione di tutti i metodi di profilassi, agronomici e chimici (*Resolución de la Delegación Territorial de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de Málaga, 26 novembre 2016*).

In Sicilia, i primi casi di mal secco, osservati in provincia di Messina nel 1918, provocarono gravi danni fra gli anni '20 e '30, che portarono alla distruzione 3.000 ha di limoneti. Fra le successive epidemie si ricorda quella verificatasi nel 1972, favorita da eventi meteorici di particolare intensità (grandine, freddi e venti) e dall'elevata carica di propaguli del patogeno, dovuta all'allentamento delle misure di contenimento abitualmente adottate, a causa della carenza di mano d'opera esperta e della lievitazione dei costi di produzione.

In quegli anni fu rilevata un'elevata frequenza di infezioni radicali, fino ad allora ritenute occasionali (Cutuli et al., 1984). Più recentemente, metodi quantitativi per il monitoraggio del patogeno nel terreno⁴, pongono interrogativi sul suo ruolo come serbatoio di propaguli infettivi⁵.

SINTOMATOLOGIA

La sindrome del “mal secco” è caratterizzata da una sequenza di sintomi esterni e interni non dissimili da quelli che si riscontrano in altre alterazioni parassitarie vascolari causate da funghi o batteri. Il quadro sintomatologico, già descritto dettagliatamente da Petri (1930) per quanto attiene le infezioni epigee⁶ (Fig.1), varia per intensità ed evoluzione, con il sito di penetrazione del patogeno, la virulenza del patogeno, la suscettibilità dell'ospite, fattori pedoclimatici, ecc.

In genere, le prime manifestazioni compaiono sotto forma di decolorazione delle nervature primarie e secondarie delle foglie apicali, che ingialliscono e cadono, disarticolandosi dai piccioli. I rametti iniziano a disseccare con andamento basipeto, interessando progressivamente

⁴ Russo M., Grasso F.M., Bella P., Licciardello G., Catara A., Catara V. *Molecular diagnostic tools for the detection and characterization of Phoma tracheiphila*. Acta Horticulturae, 2011, 892: 207-214.

⁵ Negli ultimi anni, nei nuovi impianti sono state rilevate percentuali di infezioni insospettite su giovani piante appena messe a dimora, difficilmente riferibili ad infezioni epigee post-impianto.

⁶ Petri non descrive le infezioni radicali, descritte da Savastano e Fawcett (1930), e successivamente evidenziate da Carrante (1938) e da Cutuli (1972) (in: Nigro et al, 2011).

rami e intere branche, fino alla morte della pianta. In autunno, negli elementi corticali dei rami disseccati il patogeno differenzia le fruttificazioni picnidiche, corpuscoli neri sub-epidermici, disposti in linee longitudinali parallele all'asse del ramo, che danno luogo ad un'intercapedine subepidermica piena d'aria, dal colore grigio plumbeo con riflessi argentei⁷. I tessuti legnosi sottostanti mostrano una colorazione rosa salmone a carico delle cerchie xilematiche esterne, o bruna se a carico del midollo o del durame⁸. La pianta reagisce con l'emissione di getti basali che presenteranno a loro volta gli stessi sintomi. La malattia assume un decorso lento in quanto la colonizzazione dei fasci vascolari è ostacolata dal movimento della linfa ascendente e dall'attività delle cellule perivasali.

Nelle infezioni attraverso radici o ferite sul tronco o alla base dei rami principali, la malattia assume invece un decorso rapido ("mal fulminante") in quanto la corrente ascensionale diffonde rapidamente i conidi di tipo ifale (talloconidi), che si formano per gemmazione direttamente dalle ife miceliali, e i prodotti del metabolismo del parassita, comprese alcune tossine. La progressione dei sintomi assume carattere di collasso con defogliazioni subitanee e generali o disseccamenti dei rami con foglie che restano attaccate. In un'altra forma di mal secco, denominata "mal nero", il patogeno penetra attraverso le radici e resta confinato per più anni negli strati interni del legno. La malattia si evidenzia dopo qualche tempo con clorosi delle nervature fogliari, che progressivamente interessano tutta la chioma, associate a defogliazioni, cascola o anticipo di colorazione dei frutti, seccumi sparsi. Asportando i rami malati, la pianta emette una vegetazione stentata; se le cerchie esterne del legno non sono invase dal patogeno, si ha l'emissione di polloni basali vigorosi. I rametti apicali non manifestano sintomi a carico del legno, ben visibili, invece, su rami di diametro maggiore, pre-

⁷ Da non confondere con gli acervuli bruni, disposti in serie concentriche, di *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz.) Sacc., agente dell'antracnosi che accompagna i seccumi in genere.

⁸ La colorazione delle cerchie xilematiche è un elemento diagnostico assai utile, in quanto indicativa della colonizzazione dei tessuti ad opera del patogeno e dell'epoca in cui si è realizzata l'infezione.

feribilmente alla base e alla diramazione di una branca⁹. Nelle cerchie interne dello xilema si osservano imbrunimenti diffusi che si estendono progressivamente verso quelle esterne, assumendo la colorazione rosa salmone caratteristica.

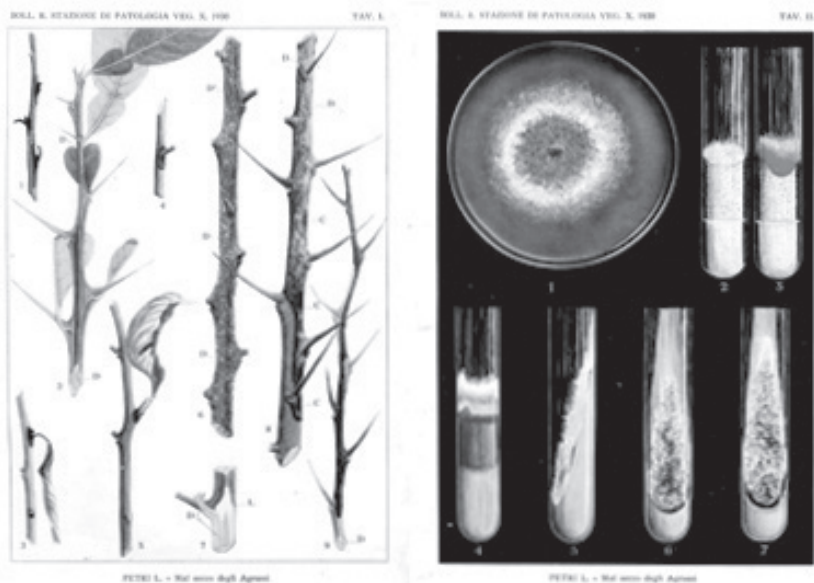


Figura 1. Due tavole descrittive del mal secco degli agrumi pubblicate da Petri sul Bollettino della Regia Stazione di Patologia vegetale di Roma nel 1930. Con ricchezza di particolari documentano le differenze dei sintomi rispetto ad altri seccumi e l'esistenza di ceppi cromogeni e non cromogeni del fungo (al tempo *Deuterophoma tracheiphila*).

Quando il fungo penetra attraverso le radici resta per più anni negli strati interni del legno e progredisce lentamente in senso acropeto e radiale. I tessuti colonizzati assumono una colorazione bruna a margini irregolari, color nero seppia al centro e marrone chiaro al margine, associati ad un intenso odore di melone stramaturato. In questa forma cronica la malattia assume un decorso iniziale molto lento (fin quando sono interessate le cerchie interne dello xilema), e una progressione molto

⁹ In tali casi la capitozzatura della pianta non aiuta a contenere la malattia in quanto l'infezione si diffonde in senso acropeto.

veloce, simile a quello del mal fulminante, dalla comparsa dei sintomi alla morte della pianta o dell'organo interessato.

Infezioni possono osservarsi anche a carico dei frutti e dei tegumenti esterni dei semi, ma non hanno alcun ruolo nel ciclo epidemiologico della malattia.

AGENTE EZIOLOGICO

Visto l'immane flagello, nel 1925 il Ministero dell'Economia Nazionale affidò a Lionello Petri l'incarico ufficiale di far luce sulle cause della moria del limone nel messinese¹⁰. Nel 1929 egli attribuì l'eziologia del mal secco ad una nuova specie di fungo sferossidale: *Deuterophoma tracheiphila* Petri, specie tipo del nuovo genere *Deuterophoma* Petri¹¹. Goidanich e Ruggeri (1947) emendarono la descrizione, indicando che i picnidi hanno un ostiolo, spesso munito di collo, e che i picnoconidi, come pure i conidi formati liberamente sulle ife, sono di origine endogena. Nel 1948 Kanchaveli e Gikashvili assegnarono il fungo al genere *Phoma* e designarono la specie *P. tracheiphila*, posizione confermata da esami al microscopio elettronico negli anni 70 da Ciccarone in base ai caratteri delle fialidi e dei picnidi¹². Successivamente, sulla base di caratteristiche dei picnidi, il fungo è stato ricondotto al genere *Plenodomus*¹³ e riclassificato come *Plenodomus tracheiphilus*.

Il fungo produce sugli elementi corticali più esterni di giovani rami infetti un ifenchima sul quale si differenziano i picnidi, generalmente sparsi e disposti in serie o in gruppi confluenti. Al loro interno sono

¹⁰ Petri, allora direttore della Regia Stazione di Patologia vegetale di Roma, svolse l'incarico anche presso l'Istituto Tecnico di S. Teresa di Riva, dove fu attivo un Osservatorio per il mal secco, meritandosi di avere intitolata a suo nome la Scuola Media del luogo.

¹¹ In contrasto con Gassner, che riferiva la causa del mal secco a *Phoma limoni* Thum., e con altri autori che hanno riferito il fungo ad altri generi (Nigro et al., 2011).

¹² Ciccarone A. *Il fungo del "mal secco" degli agrumi*. Phytopathologia Mediterranea 1971,10: 68-75.

¹³ Nella sezione *Plenodomus* sono presenti molte specie che hanno *Leptosphaeria* come teleomorfo, una relazione confermata anche per *P.tracheiphilus* da studi di filogenesi molecolare (EFSA,2014).

presenti cellule madri che attraverso un processo endogeno danno luogo alla produzione di conidi ialini, unicellulari, di $2,4-4,8 \times 1,2-2 \mu\text{m}$, che a maturità fuoriescono sotto forma di cirri, ovvero sono dispersi a seguito della lacerazione del corpo fruttifero. Sono anche note altre due forme di moltiplicazione agamica: i fialoconidi e i talloconidi (Fig.2). Entrambi hanno origine ifale. I primi si formano in presenza di elevata umidità all'apice di particolari cellule fertili specializzate (fialidi), che si originano dal micelio presente in residui di piante infette, sul legno esposto per ferite, tagli e fessurazioni della corteccia e sulle cicatrici fogliari. Esse si presentano isolate o riunite in gruppi di 3 o 4, e sono unicellulari, ialine, di dimensioni dell'ordine di $6 \times 3 \mu\text{m}$. I talloconidi si differenziano negli elementi xilematici, hanno forma e dimensioni irregolari e sono convogliati dalla linfa ascendente.

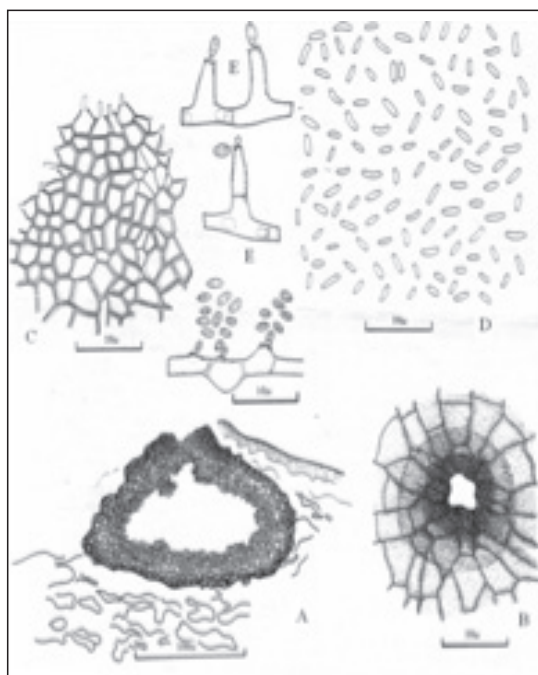


Figura 2. Organi di riproduzione e diffusione di *P. tracheiphilus*. A) Sezione verticale di picnidio, B) apertura ostiolare, C) parete cellulare interna del picnidio con cellule conidiogene, D) conidi di $2-3 \times 1 \mu$, E) fialidi e fialoconidi generati direttamente da micelio (da: CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. No.399).

In vitro il fungo cresce a temperature fra 5° e 30°C con valori ottimali di 20-22°C. I picnidi preferiscono temperature comprese tra 12° e 24°C e sono più numerosi a 15°C; ma raggiungono maggiori dimensioni e hanno conidi più germinabili a 10°C. Il micelio produce vari pigmenti, tra i quali due derivati antrachinonici rossi, l'elmentosporina e la cinodontina, ed uno giallo, il crisofanolo che conferisce al substrato la colorazione rosso-arancio caratteristica. La colorazione del legno è invece dovuta alla produzione di gomma nei tessuti invasi dal fungo.

Nonostante possano osservarsi varianti che producono in abbondanza i pigmenti rossi, e varianti non cromogene, *P. tracheiphilus* è considerata un'entità monotipica, con variazioni cromatiche e morfologiche non correlate a caratteri colturali e a strutture riproduttive. Le frequenti varianti settoriali (saltazioni), che si differenziano per il colore, la velocità di crescita ed il tipo di sviluppo del micelio, sono probabilmente di origine extranucleare.

La prova che la popolazione del fungo sia omogenea è rafforzata anche da recenti studi del DNA di isolati provenienti da varie aree del Mediterraneo^{14,15}, che hanno evidenziato profili sostanzialmente identici tra loro e differenti da quelli di altre specie di *Phoma*. Solo alcuni hanno mostrato lievi differenze rispetto agli isolati depositati nella banca dati di sequenze nucleotidiche di GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Tuttavia, l'analisi sui polimorfismi dei frammenti amplificati (AFLP) ha rilevato alcune differenze¹⁶ non correlabili con l'origine geografica, né con i caratteri colturali o la virulenza, e piccoli cluster tra isolati provenienti dalla stessa località o da aree geografiche

¹⁴ Balmas V., Scherm B., Ghigne S., Salem A.O.M., Cacciola S.O., Migheli Q. *Characterization of Phoma tracheiphila by RAPD-PCR, microsatellite-primed PCR and ITS rDNA sequencing and development of specific primers for in planta PCR detection*. European Journal of Plant Pathology, 2005,111: 235-247.

¹⁵ Ezra D., Kroitor T., Sadowsky A. *Molecular characterization of Phoma tracheiphila, causal agent of Mal secco disease of citrus, in Israel*. European Journal of Plant Pathology, 2007,118: 183-191.

¹⁶ Russo M., Grasso M.F., Bella P., Licciardello G., Catara A., Catara V. *Molecular diagnostic tools for the detection and characterization of Phoma tracheiphila*. Acta Horticulturae 2011,892: 207-214.

vicine. L’uniformità riscontrata è coerente con la riproduzione clonale.

Una recente indagine che ha interessato isolati tunisini e italiani ha evidenziato 20 patotipi con diversi livelli di virulenza, casualmente distribuiti, indipendentemente dalla provenienza dell’isolato, che gli autori attribuiscono allo scambio di materiale vegetale¹⁷.

PIANTE OSPITI

P. tracheiphilus, comunemente noto come patogeno del limone, è potenzialmente capace di infettare tutte le specie di *Citrus*, *Poncirus*, *Severinia* e *Fortunella*, nonché ibridi interspecifici e intergenerici. Tuttavia, nel caso di infezioni naturali di campo si osservano alcune differenze nel numero di piante infette e nel decorso della malattia, talvolta interpretati come potenziali indizi di resistenza legati alla specie e/o alla cultivar¹⁸. Frequenza e gravità delle infezioni sono anche influenzate da fattori genetici e costituzionali e dall’età dell’ospite¹⁹, dalle condizioni ambientali, dalle pratiche colturali, dalla massa di propaguli infettivi e dalla virulenza dei ceppi del patogeno.

Le differenti condizioni in cui è stata condotta la sperimentazione non consentono di definire una scala di suscettibilità delle numerose specie saggiate nella speranza di trovare caratteri di resistenza utili al miglioramento genetico. Una comparazione, limitata ad alcune specie di *Citrus*, è stata tentata dal Panel of Plant Health EFSA (2014) (Tabella 1), sulla base di precedenti elaborazioni (Cutuli et al., 1984; Nigro et al., 2011).

Per quanto riguarda i portinnesti, i risultati di una lunga sperimentazione di campo hanno messo in evidenza una buona resistenza del

¹⁷ Ziadi S., Chebil S., Melki I., Ippolito A., Mliki A. *Virulence spectra and geographical distribution of Mal Secco disease of citrus caused by Phoma tracheiphila in the Mediterranean countries: Tunisia and Italy*. European Journal of Plant Pathology 2014,138:123–131 DOI 10.1007/s10658-013-0311-7.

¹⁸ Inoculazioni sperimentali hanno dimostrato che tali differenze non sono significative allorché il patogeno raggiunge gli elementi xilematici.

¹⁹ In prove di inoculazione alle foglie cotiledonari e alla prima foglia vera giovani semenzali di arancio dolce non si sono differenziati da quelli di arancio amaro. Un elemento da non sottovalutare nei vivai e nei test di laboratorio.

Tabella 1: Suscettibilità a *Plenodomus tracheiphilus* di alcune specie di Citrus, generi affini e ibridi (diversi dal limone) (EFSA Panel Plant Health, 2014).

Binomio latino	Nome comune	Suscettibilità ^(a)
<i>Citrus jambhiri</i>	Limone rugoso	+++
<i>C. volkameriana</i>	Limone volkameriano	++
<i>C. meyeri</i>	Limone Meyer	+
<i>C. webberii</i>	Papeda	+++
<i>C. karna</i>	Limone Karna	+++
<i>C. medica</i>	Cedro	+++
<i>C. limettioides</i>	Lima di Palestina	+
<i>C. limonia</i>	Lima di Rangpur	+++
<i>C. aurantifolia</i>	Lima di Key	+++
<i>C. bergamia</i>	Bergamotto	+++
<i>C. deliciosa</i>	Mandarino Mediterraneo	+
<i>C. reticulata</i>	Mandarino Comune	++
<i>C. reshni</i>	Mandarino Cleopatra	+
<i>C. clementina</i>	Clementine Comune	++
<i>C. macrophylla</i>	Alemow	+++
<i>C. junos</i>	Yuzu	+++
<i>C. sinensis</i>	Arancio dolce	+ / ++ ^(b)
<i>C. aurantium</i>	Arancio amaro	+++
<i>C. paradisi</i>	Pompelmo	+
<i>C. myrtifolia</i>	Chinotto	+++
<i>C. madurensis</i>	Calamondino	++
<i>C. taiwanica</i>	Arancio di Taiwan	+++
<i>C. tangelo</i>	Tangelo Orlando	+
<i>C. ichangensis</i> × <i>C. grandis</i>	Limone Ichang	+
<i>Poncirus trifoliata</i>	Arancio trifogliato	+
<i>Fortunella</i> spp.	Kumquat	+
<i>Severinia buxifolia</i>	Severinia	++
<i>C. sinensis</i> × <i>P. trifoliata</i>	Citrange Carrizo	++
<i>C. sinensis</i> × <i>P. trifoliata</i>	Citrange Troyer	++

(a) Suscettibilità: + bassa; ++ media; +++ elevata.

(b): (+) secondo Ruggieri (1948); (++) secondo Crescimanno et al. (1973).

limone Ichang CRC 1215, del siamelo CRC 2586 e dell’arancio amaro selezione Marina II, inoculati alle radici, innestati e non con limone Femminello e Monachello (Nigro et al., 2011).

PROCESSO D’INFEZIONE

Le infezioni di *P. tracheiphilus* hanno luogo attraverso lesioni delle foglie e degli organi legnosi, e attraverso le cicatrici fogliari causate da filloptosi naturale o traumatica, ma non attraverso aperture stomatiche²⁰.

Le ferite alle foglie rimangono recettive da 4-5 giorni se sono piccole e puntiformi, e fino a 10 giorni se sono estese. Quelle causate dal

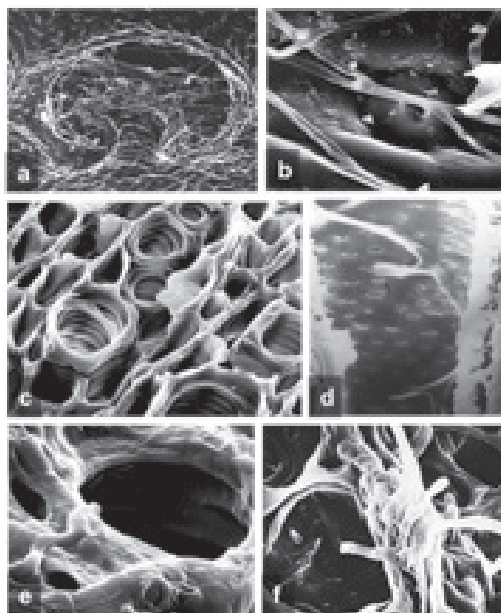


Figura 3. Il processo di infezione al microscopio elettronico a scansione: a) Evasione di ife miceliche di *P. tracheiphilus* da una ferita provocata con ago entomologico; b) Ifa sopra uno stoma aperto; c) e d) Ife miceliche all’interno dei vasi xilematici; e) Penetrazione di un’ifa generata da un conidio appena germinato attraverso una cicatrice di abscissione fogliare; f) Groviglio di ife nello xilema. (da: D’Anna et al., 1986).

²⁰ D’Anna R., Trigila P.L., Catara A. *Aspetti della morfologia e della biologia di Phoma tracheiphila esaminati al microscopio elettronico a scansione*. Atti Giornate Fitopatologiche 1986, 105-114.

distacco delle foglie restano recettive oltre 16 giorni a 15°C, mentre quelle da filloptosi fisiologica sono meno recettive.

Nonostante la recettività decresca rapidamente e tenda ad annullarsi già dopo 10 giorni, le ferite rimangono vulnerabili per tempi ben più lunghi di quelli necessari al fungo per la germinazione e la penetrazione nell'ospite. Un evento possibile per gran parte dell'anno purché l'umidità sia elevata. I picnoconidi che giungono all'interno di ferite germinano in tempi brevi, trovando condizioni ideali di UR, mentre quelli che rimangono all'esterno germinano solo con UR del 100%, producendo abbondanti ife miceliche che penetrano all'interno dell'ospite attraverso ferite e avviano il processo d'infezione. Mancando le condizioni di umidità degenerano.

Osservazioni istologiche su foglie di arancio amaro inoculate per ferita con una sospensione di conidi evidenziano che *P. tracheiphilus* procede rapidamente attraverso vasi xilematici aperti durante la ferita praticata per l'inoculazione. In sei giorni il processo di infezione è pienamente innescato: le ferite mostrano un periderma cicatriziale definito e all'interno del lume delle nervature secondarie e negli spazi intercellulari del parenchima spugnoso sono presenti conidi e frammenti di micelio.

Nei giorni successivi i vasi feriti e quelli più prossimi (1-3 mm) sono progressivamente invasi da ife e conidi, presenti anche negli spazi intercellulari. Attraverso le punteggiature le ife passano da vaso in vaso, che presentano pareti scure rivestite da una sostanza amorfa gommosa, non necessariamente associata alla presenza del fungo.

All'interno dello xilema, il fungo rimane confinato fino a quando l'organo infetto è vitale, e differenzia conidi di tipo ifale che sono trasportati passivamente dalla linfa ascendente, diffondendo rapidamente l'infezione, mentre la colonizzazione dei tessuti in senso radiale avviene più lentamente attraverso le punteggiature dei vasi o per attacco diretto alla parete cellulare^{21,22}.

²¹ Bassi M., Magnano di San Lio G., Perrotta G. *Morphological observations on the host-parasite relations in sour orange leaves infected with Phoma tracheiphila*. Phytopathologische Zeitschrift., 1980,98: 320-330.

²² Perrotta G., Magnano di San Lio G., Bassi M. *Some anatomical and morpho-functional aspects of resistance to Phoma tracheiphila in Citrus plants*.

Se l'umidità si mantiene prossima alla saturazione e la temperatura fra 10-25°C l'evasione del fungo avviene attraverso cicatrici fogliari, piccioli e ferite 2-3 giorni dopo che è stato messo a nudo il legno²³.

SOPRAVVIVENZA E DISSEMINAZIONE DEI PROPAGULI

A differenza di altri patogeni delle piante che svolgono una parte del loro ciclo nel suolo, *P. tracheiphilus* non forma organi di resistenza (come sclerozi, clamidospore, ecc.), ma sopravvive nel corso delle stagioni come micelio vivace nei tessuti dell'ospite o nei residui di potatura (da cui hanno origine le fialidi) o sottoforma di picnidi sui rametti disseccati. Mancano ancora indagini conclusive sull'esistenza e sull'eventuale ruolo di piante ospiti alternative²⁴.

Di solito la disseminazione dei conidi avviene attraverso l'ostiolo, sotto forma di cirri, a seguito della bagnatura dei picnidi che provoca il rigonfiamento della massa gelatinosa interna. Ma può avvenire anche in seguito all'azione della pioggia e del vento che, lacerando l'epidermide dei rametti e gli ostioli dei picnidi ad essa adesi, lasciano esposti i conidi presenti all'interno, immersi nella mucillagine. I propaguli del patogeno (conidi e fialoconidi) sono disseminati a distanza relativamente breve (accertata fino a 15 metri) e, se esistono le condizioni, germinano e possono infettare le piante (temperatura, umidità, piante suscettibili e recettive).

Sebbene i picnidi siano presenti sulle piante infette da settembre ad aprile (e persino a giugno), le condizioni migliori per la produzione di inoculo e l'infezione si realizzano con temperature intorno ai 15-22 °C. Con temperature oltre i 25°C le probabilità di avere infezioni sono basse. In Sicilia, le infezioni di "mal secco" cominciano in settembre, raggiungono il massimo a novembre, e, in concomitanza con piogge,

Phytopathologische Zeitschrift., 1980, 98: 346-358.

²³ De Cicco V., Paradies M., Ippolito A., Salerno M. *Produzione di fialidi libere di Phoma tracheiphila in condizioni controllate*. Phytopathologia Mediterranea, 1986, 25:107-110.

²⁴ Salerno M., Catara A. *Ricerche sul "mal secco" degli Agrumi (Deuterophoma tracheiphila Petri). IV. Comportamento parassitario del fungo in ospiti diversi dagli Agrumi*. Tecnica Agricola, Catania, 1967,19: 290-297.

possono proseguire fino all'inizio della primavera e oltre. Il periodo d'incubazione, mediamente di 60 giorni in condizioni di campo, si riduce a 3-4 settimane nelle infezioni di inizio primavera e si allunga di mesi nelle infezioni primaverili-estive.

Per quanto riguarda le infezioni radicali, in condizioni di laboratorio, semenzali posti in terreni inoculati con rametti infetti o con sospensioni di conidi presentano 26% e 70% di infezioni. Se le radici sono immerse direttamente nella sospensione di conidi le infezioni sono del 100%. La capacità infettiva si protrae fino a quattro mesi e oltre, ed è più elevata in terreno argilloso. In terreno sterile, il micelio rimane vitale per oltre due anni, ma in condizioni di campo l'attività di antagonisti può limitarne la vitalità²⁵. La presenza di DNA del fungo nel terreno è stata rilevata mediante PCR anche tre anni dopo l'estirpazione di piante di limone; minore la quantità di DNA, minore il numero di piante di limone infette²⁶.

FATTORI PREDISPONENTI LA MALATTIA

Fra i numerosi fattori che influiscono sulla recettività delle piante e sulla capacità infettiva del patogeno la potatura e le lavorazioni del suolo, l'irrigazione e le concimazioni giocano ruoli importanti. L'asportazione dei rami malati, che consente di ridurre l'inoculo e impedire la progressione della malattia verso i rami principali, può favorire anche la liberazione di fialidi e fialoconidi dai tagli esposti e/o dai rami di risulta. La lavorazione del suolo può causare all'apparato radicale lesioni penetrabili dai propaguli del fungo presenti nel terreno, con esiti variabili con la tessitura del terreno²⁷, gli attrezzi utilizzati, il periodo

²⁵ Leonardi O., Sesto F., Polizzi G., Di Silvestro I., Astuto A. *Antagonismo in vitro di microrganismi presenti nei terreni agrumetati nei confronti di Phoma tracheiphila*. Tecnica Agricola, Catania, 1990, 42: 61-67.

²⁶ Cfr.: Di Silvestro I., Leonardi M., Leonardi O., Catara A., Sesto F. *Osservazioni sul comportamento di Phoma tracheiphila nel terreno mediante l'impiego di una sonda a DNA*. Atti Giornate Fitopatologiche 1988, Lecce: 139-148. Di Silvestro I., Raciti M., Lanza G., Di Martino A., Bonforte M. *Analisi della presenza di P. tracheiphila nel terreno impiegando una sonda a DNA*. Atti Giornate Fitopatologiche 1990, Pisa: 355-362.

²⁷ Alcuni autori riportano che nei terreni argillosi si osservano meno infe-

dell'intervento²⁸.

Favorevoli alle infezioni sono gli eventi meteorici che causano lesioni alle foglie, danneggiamenti e rotture dei rami, che a loro volta favoriscono la disseminazione di fialoconidi e di micelio presenti nei tessuti infetti. Lo stesso dicasi per le carenze di meso- e microelementi che causano defogliazioni, lasciando le cicatrici di abscissione pervie e vulnerabili, ma anche siti di disseminazione dei conidi.

Sulla sopravvivenza, la diffusione e la penetrazione del patogeno agisce l'irrigazione, creando condizioni di umidità favorevoli a livello della fillosfera e/o della rizosfera²⁹. Mentre somministrazioni di azoto non bilanciate con fosforo e potassio accelerano il decorso della malattia, e richiedono interventi di potatura più frequenti.

RAPPORTI PIANTA OSPITE/PATOGENO

Per quanto indagati da diversi autori i rapporti che *P. tracheiphilus* instaura con l'ospite restano ancora poco chiari (Nigro et al., 2011). Modificazioni isto-citologiche tendenzialmente differenti sono state osservate in piante suscettibili e piante resistenti all'infezione. Nello xilema del limone Monachello (resistente), attorno ai centri di infezione si è osservato un tessuto cicatriziale che circonda le zone necrotiche, ma il cambio rimane funzionale e rigenera nuovo xilema. Nelle piante suscettibili, invece, si osservano reazioni di tipo iperplastico, riferibili a meccanismi di riparazione, che tendono ad estendersi anche in senso radiale con il progredire della colonizzazione dei tessuti ad opera del patogeno.

Differenze sono state osservate anche nel caso di inoculazione alle foglie: le piante suscettibili mostrano nello xilema delle nervature numerosissimi propaguli del fungo, distribuiti in modo sistemico, mentre

zioni, attribuendolo ad un certo indurimento della pianta.

²⁸ Questi elementi devono fare riflettere sull'importanza della corretta esecuzione degli interventi agronomici anche per quanto riguarda l'epoca stagionale.

²⁹ Nel caso delle infezioni radicali, le condizioni di umidità e temperatura che si stabiliscono nel terreno possono ampliare il periodo di recettività rispetto a quello che interessa la chioma.

nel limone Monachello sono in numero ridotto e spiccatamente localizzati. Le ife e le pareti cellulari dei vasi sono rivestite da una sostanza osmiofila, più abbondante nel Monachello, che possibilmente frena l'avanzamento del patogeno, permettendo alla pianta di mobilitare altri meccanismi di resistenza per circoscrivere l'infezione.

Un ruolo importante nelle fasi più avanzate del processo di infezione, ma non nelle fasi iniziali, potrebbero avere alcuni enzimi pectolitici, quali poligalatturonasi (PG) e poligalatturonato-transeliminasi (PGTE); pectin-metilesterasi (PME), β -glucosidasi ed enzimi cellulolitici riscontrati in colture *in vitro* del fungo.

Da filtrati di coltura di *P. tracheiphilus* sono state estratte due glicoproteine fitotossiche, di 93 Kd e 60 Kd (denominate "malseccina"), in grado di riprodurre i sintomi della clorosi delle nervature quando iniettate nelle foglie di agrumi e alterazioni ultrastrutturali in protoplasti di diverse specie di agrumi³⁰. La tossina di 60 Kd è stata isolata anche da foglie e xilema di limoni con sintomi della malattia.

L'analisi delle proteine extracellulari di *P. tracheiphilus* in terreno di coltura per la produzione di malseccina ha rilevato un elevato aumento di mono-amino ossidasi, un enzima che potrebbe causare nelle cellule dell'ospite una tossicità per accumulo di H_2O_2 e NH_4 .

MECCANISMI DI DIFESA DELLA PIANTA

Il fenomeno della resistenza delle piante alle malattie vascolari è piuttosto complesso in quanto correlato a meccanismi di natura chimica e fisico-meccanica, che agiscono simultaneamente o in successione tra loro. Barriere di tipo morfologico o chimico hanno spesso un ruolo importante nell'impedire e/o ritardare la diffusione del parassita nei tessuti dell'ospite e consentire alla pianta di mettere in atto meccanismi di difesa più adeguati.

Nel caso del mal secco, l'esame delle caratteristiche anatomico-strutturali di specie suscettibili e tolleranti non ha evidenziato elementi che possano essere considerate vere barriere istologiche. Tuttavia, la

³⁰ Sesto F., Grimaldi V., Pennisi A.M. *Sensitivity of different citrus and non citrus species protoplasts towards "Mal secco" toxins*. Advances in Horticultural Sciences, 1990, 4: 97-102.

formazione di cerchie di legno in anticipo rispetto all'avanzata del patogeno, rilevata nel limone Monachello, potrebbe giocare un ruolo nel meccanismo che questa cultivar mette in atto per bloccare le infezioni.

La ricerca di meccanismi di difesa di natura chimica, nel legno di arancio dolce e di limone, ha permesso di individuare sostanze termolabili che ostacolano lo sviluppo del fungo in misura diversa, ma non distintiva ai fini della resistenza. Altri possibili meccanismi, pre- e post-infezionali, sono stati ricercati nell'attività di perossidasi e catalasi, di acidi e di alcaloidi. Anche lo studio del contenuto fenolico in piante suscettibili e resistenti ha messo in evidenza differenze in alcuni composti dotati di una buona attività fungistatica, in particolare tangeritina e nobiletina, e nel metabolismo dei fenoli liberi 6-8 giorni dopo l'inoculazione del patogeno. Tuttavia, nessuna di queste linee di ricerca ha portato a risultati conclusivi.

Recentemente³¹, è stato accertato che foglie di limone Interdonato, Femminello e Monachello inoculate con proteine extracellulari del complesso della “malseccina” producono livelli differenti di lipoperossidi. E che l'aggiunta di foglie e rametti liofilizzati di limone Monachello e di limone Femminello nel terreno di coltura del patogeno aumenta nel micelio la concentrazione di enzimi diversi.

Questi risultati, seppure non forniscano elementi conclusivi, mettono in evidenza la molteplicità e la diversità delle reazioni di ospiti suscettibili e resistenti al processo di infezione, e la complessità dei rapporti ospite/patogeno che sottendono i meccanismi di resistenza, tuttora non sufficientemente indagati.

METODI DI DIAGNOSI

La diagnosi della malattia, che in campo si basa essenzialmente sull'osservazione dei sintomi, è convenzionalmente completa con l'identificazione al microscopio ottico di picnoconidi e fialidi ottenuti su agar patata o agar carota o su campioni legnosi incubati in camera umida. Il protocollo diagnostico EPPO (European and Mediterranean

³¹ Reverberi M., Betti C., Fabbri A.A., Zjalic S., Spadoni S., Mattei B., Fanelli C. *A role for oxidative stress in the Citrus limon/Phoma tracheiphila interaction*. Plant Pathology 2008, 57: 92-102.

Plant Protection Organization) per *P. tracheiphilus* suggerisce l'isolamento su agar destrosio patata, agar carota³² o agar malto addizionato di cloramfenicolo (EPPO, 2015), e incubazione tra 20° e 25° C. Su agar carota i picnoconidi si sviluppano preferibilmente dopo cinque giorni, mentre i fialoconidi, prodotti liberamente sulle ife, si possono osservare anche dopo un solo giorno.

La ricerca di metodi molecolari per il rilevamento di *P. tracheiphilus* ha segnato l'inizio di una nuova era nello studio dei microrganismi funghi³³. L'individuazione di un frammento specifico di DNA del fungo ha permesso la realizzazione di una sonda clonata per analisi dot-blot, poi utilizzata per allestire un protocollo PCR³⁴, capace di rilevarne la presenza e la identificazione in matrici diverse, previo arricchimento in brodo di coltura³⁵. L'ottimizzazione della tecnica ha successivamente elevato la sensibilità a 10 pg di DNA, sufficienti ad analizzare direttamente i campioni vegetali. La stessa sequenza bersaglio è stata utilizzata per sviluppare un metodo di real-time PCR che utilizza una sonda di tipo TaqMan³⁶. Il cui limite di rilevamento è stato ulteriormente migliorato permettendo di rilevare *P. tracheiphilus* sia in campioni asintomatici che nel terreno³⁷.

³² L'agar carota addizionato di pentacloronitrobenzene, ampicillina e rifampicina assolve una buona funzione semiselettiva, vantaggiosa nei casi in cui si analizzano matrici (aria, suolo, acqua) che contengono altre popolazioni microbiche.

³³ Rollo F., Amici A., Foresi F., Di Silvestro I. *Construction and characterization of a cloned probe for the detection of Phoma tracheiphila in plant tissues*. Applied Microbiology and Biotechnology 1987, 451, 1-6.

³⁴ Rollo F., Salvi R., Torchia P. *Highly sensitive and fast detection of Phoma tracheiphila by polymerase chain reaction*. Applied Microbiology and Biotechnology 1990, 32, 572-576.

³⁵ Gentile A., Deng Z.N., Tribulato E., Vardi A., Albanese G., Grimaldi V., Catara A. *Evaluation of lemon somaclones for tolerance to mal secco disease by artificial inoculation*. Acta Horticulturae 2000, 535, 259-263.

³⁶ Licciardello G., Grasso F.M., Bella P., Cirvilleri G., Grimaldi V., Catara V. *Identification and detection of Phoma tracheiphila, causal agent of citrus mal secco disease, by real-time polymerase chain reaction*. Plant Disease, 2006, 90: 1523-1530.

³⁷ Russo M.C. *Valutazione quantitativa di aspetti epidemiologici e patogenetici di Phoma tracheiphila mediante qPCR*. Tesi Dottorato di ricerca. Univer-

Un approccio diverso è stato seguito da altri ricercatori che hanno sviluppato protocolli di PCR³⁸ e di real time-PCR³⁹ basati su sequenze non codificanti del DNA ribosomale.

I protocolli molecolari disponibili consentono di studiare agevolmente la biologia e l'epidemiologia del patogeno e le interazioni che intrattiene con l'ospite e con l'ambiente e di valutare i risultati di piani di difesa. Tuttavia, i risultati vanno interpretati con attenzione, tenendo conto che il DNA può essere rilevato anche in cellule morte e che alla elevata sensibilità del metodo deve corrispondere una non inferiore attenzione nell'approntamento del campione. Pertanto, in molti casi si rende necessario controllare i risultati con metodi d'indagine convenzionali. In attesa che altre tecnologie già in uso per i batteri siano messe a punto.

MEZZI DI LOTTA

La lotta contro il mal secco degli agrumi costituisce la più importante delle operazioni colturali nei limoneti in quanto il suo esito è pregiudizievole per il risultato economico. Malgrado le numerose ricerche, non esistono mezzi di lotta sicuri ma solo criteri per convivere con la malattia, con interventi profilattici riconducibili a pratiche agronomiche e a mezzi chimici. Molte speranze sono riposte nel miglioramento genetico (compresa l'introduzione di resistenza non convenzionale) e nei mezzi biologici di contenimento del fungo in pianta e nel terreno.

Interventi agronomici. L'asportazione e la distruzione dei rami infetti e delle ceppaie di piante morte, in quanto focolai d'infezione, costituiscono il punto centrale della prevenzione della malattia. La messa

sità di Catania, Italia 2008.

³⁸ Ezra D., Kroitor T., Sadowsky A., Molecular characterization of *Phoma tracheiphila*, causal agent of Mal secco disease of citrus, in Israel. *European Journal of Plant Pathology* 2007,118: 183-191.

³⁹ De Montis M.A., Cacciola S.O., Orrù M., Balmas V., Chessa V., Maserti B.E., Mascia L., Raudino F., Magnano di San Lio G., Migheli Q. *Development of real-time PCR systems based on SYBR® Green I and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of Phoma tracheiphila in infected Citrus*. *European Journal of Plant Pathology* 2008,120:339-351.

a dimora di piante esenti da infezioni e/o resistenti al patogeno ottenute all'interno dello schema di certificazione è l'altro cardine fondamentale per i nuovi impianti, come peraltro prevede il D.M.31 marzo 2005, e assume ormai carattere irrinunciabile. In considerazione della capacità del patogeno di sopravvivere a lungo nel terreno sarebbero da valutare protocolli di sanificazione dei terricci impiegati.

Da evitare sono le lavorazioni del terreno nel periodo fine autunno - inverno, specie dopo lunghi periodi di non lavorazione, in quanto espongono le radici a ferite, il reinnesto di piante ammalate, le eccessive somministrazioni di azoto, l'irrigazione soprachiuma perché contribuisce alla disseminazione e alla germinazione dei conidi⁴⁰.

La protezione dalle avversità meteoriche, con barriere frangivento e la copertura con reti antigrandine per contrastare le infezioni è prioritaria in particolari aree (specie nei vivai)⁴¹. In ambienti ventosi l'alta densità d'impianto può assicurare una difesa reciproca delle piante riducendo il rischio infezione.

L'uso di portinnesti resistenti potrebbe essere utile nelle aree storicamente infette da mal secco maggiormente esposte al rischio di infezioni radicali per l'elevato inoculo nel terreno

Legislazione fitosanitaria. *P. tracheiphilus* è l'unico patogeno fungino degli agrumi inserito nella lista A2 dell'EPPO, che elenca gli organismi nocivi da quarantena di cui si vuole impedire la diffusione nelle aree in cui non sono ufficialmente segnalati ('aree protette')⁴². In Italia permane il Decreto di lotta obbligatoria su tutto il territorio nazionale (DM 17 aprile 1998), che impone ai proprietari e ai conduttori dei fondi

⁴⁰ Nel caso di terreni con elevata carica di inoculo, l'irrigazione con ala gocciolante potrebbe creare condizioni favorevoli alla sopravvivenza del patogeno.

⁴¹ L'impiego di coperture con reti di plastica abbinata o meno a trattamenti con prodotti rameici o con captafol, con risultati interessanti soprattutto riguardo alla protezione dei vivai (Cutuli et al.,1984).

⁴² In tali aree, come Portogallo e Marocco nel caso del mal secco, è vietata l'introduzione di materiali provenienti da vivai ubicati in aree in cui il patogeno è presente. I Paesi terzi richiedono un certificato addizionale attestante la sanità, la provenienza da aree di produzione non affette dalla malattia e l'ispezione del materiale dopo l'ingresso.

il taglio e la distruzione con il fuoco delle parti di piante infette o di tutta la pianta se irrimediabilmente compromessa (Art.3), al fine di contenere la diffusione della malattia. I servizi fitosanitari regionali devono svolgere indagini periodiche al fine di individuare eventuali agrumeti infetti (Art.2), nonché promuovere tecniche di difesa atte a controllare la malattia (con particolare riguardo all'impiego di varietà resistenti) (Art.5)⁴³.

Il D.M. del 31 Marzo 2005, che riguarda l'introduzione e la diffusione di organismi nocivi nel Territorio della Repubblica, vieta la commercializzazione di piante di agrumi colpite da mal secco.

Interventi chimici. Nonostante non abbia carattere risolutivo, la lotta chimica, associata alle altre misure profilattiche, consente di ridurre la carica di inoculo, limitare i tagli di potatura e prevenire nuove infezioni, a condizione che il fitofarmaco sia presente sulle piante quando le probabilità di infezioni sono più elevate, incluso il periodo primaverile-estivo.

L'elenco dei formulati saggiati è molto ampio e include numerosi principi attivi, distribuiti anche con modalità non convenzionali (per via radicale, pennellature al tronco, iniezione al fusto, irrorazioni da punto fisso). Il loro impiego è tuttavia limitato dalla difficoltà di intervenire ripetutamente, al momento giusto e nei limiti di legge⁴⁴, ma può risultare vincente nei vivai e negli impianti non in fruttificazione, pur nei limiti dei principi attivi attualmente registrati per il mal secco (mancozeb e sali di rame⁴⁵). In prove sperimentali l'acibenzolar-S-metile, che agisce

⁴³ E' appena il caso di rilevare che, così strutturato, il Decreto è inadeguato tenuto conto della diffusione della malattia, della mancanza di dati certi sulle tecniche di difesa e di varietà resistenti, di risorse per lo svolgimento delle attività indicate.

⁴⁴ Anche l'impiego di fungicidi sistemici, che in prove su piante in vaso aveva acceso molte speranze, non ha portato risultati trasferibili. Peraltro, il loro uso, non autorizzato su agrumi, può dar luogo a fenomeni di resistenza. Risultati promettenti erano stati ottenuti in limoneti adulti con irrorazioni di captafol, di cui è oggi vietata la produzione.

⁴⁵ La nuova regolamentazione sull'uso di composti rameici ne consente un impiego massimo di 28 kg/ha nell'arco di sette anni, al fine di ridurre il potenziale accumulo nel suolo e il rischio per gli organismi non bersaglio.

stimolando le difese dell'ospite, ha contenuto in maniera significativa le infezioni⁴⁶.

Lotta biologica. L'impiego di microrganismi batterici e fungini, isolati da varie matrici, ha fornito dei risultati interessanti nel contenimen-

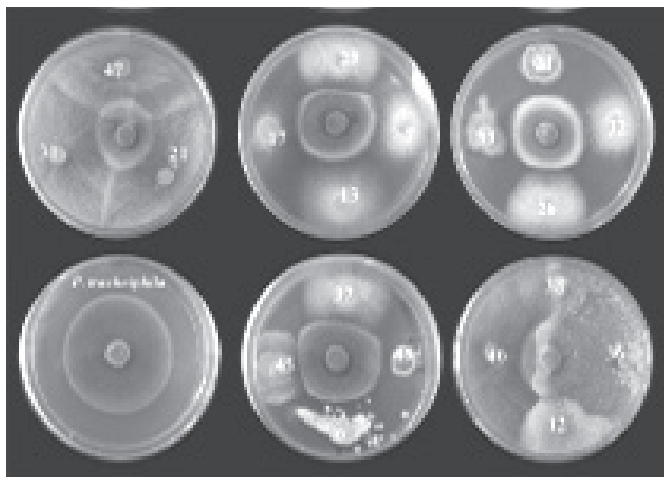


Figura 4. Test *in vitro* di antagonisti microbici verso *P. tracheiphillus*. In ciascuna piastra sono testate quattro specie fungine diverse, alcune delle quali ne limitano sensibilmente l'accrescimento diametrico del fungo posto al centro. In basso a sinistra una colonia non sfidata (ripresa da Russo, 2008).

to di *P. tracheiphilus in vitro* e talvolta *in planta*⁴⁷, ma non ha trovato ancora applicazione in campo. *Verticillium dahliae* e ceppi ipovirulenti di *P. tracheiphilus* iniettati in semenzali di arancio amaro prima dell'i-

Il loro impiego su limone può avere azione fitotossica in condizioni di basse temperature e in miscela con prodotti alcalini.

⁴⁶ Grasso F.M., Coco V., Grimaldi V., Catara V. *Contenimento delle infezioni di Phoma tracheiphila in piante di limone mediante trattamenti con Pseudomonas spp. e acibenzolar-S-metil*. Atti Giornate Fitopatologiche, 2008, 2, 191-195.

⁴⁷ L'inoculazione preventiva di funghi o batteri non patogeni nelle piante induce in molti casi un aumento del livello di resistenza, detta SAR (Sistemic Acquired Resistance), nei confronti dell'infezione da parte di altri microrganismi patogeni, accompagnato da accumulo di fitoalessine, acido salicilico e proteine di patogenesi.

noculazione con il patogeno, hanno contenuto la malattia, senza tuttavia competere con ceppi altamente virulenti.

Altri autori hanno rilevato una spiccata attività antagonista *in vitro* di funghi e batteri isolati da terreni agrumetati, potenzialmente utili nel contenere i propaguli di *P. tracheiphilus* nel terreno⁴⁸. Fra essi, numerose pseudomonadi fluorescenti, produttrici di sostanze ad attività antimicrobica nonché di siderofori⁴⁹.

Analogamente a quanto è avvenuto per altre piante arboree, alcuni batteri endofiti (e non), iniettati in fusticini di arancio amaro prima della inoculazione del patogeno, colonizzano lo xilema efficacemente e rallentano la diffusione del fungo^{50,51}.

La possibilità di migliorare la produttività e la salute delle piante attraverso il ripristino delle comunità di microrganismi associati alla rizosfera e all'endosfera, reintegrando le componenti mancanti sulla base del sequenziamento del DNA dei microrganismi presenti nel campione⁵².

Miglioramento genetico. Nel corso degli anni sono state utilizzate strategie diverse per ottenere linee di limone resistenti: selezione clonale, mutagenesi, ibridazione e recentemente trasformazione genetica. Il

⁴⁸ I risultati del monitoraggio del DNA di *P. tracheiphilus* nel terreno evidenziano che in alcune condizioni la flora microbica tellurica prende il sopravvento sul fungo, al punto di rendere difficile il rilevamento (Russo, 2008).

⁴⁹ Il genere *Pseudomonas* comprende un elevato numero di antagonisti microbici, che agiscono mediante svariati meccanismi di azione tra i quali la produzione di antibiotici, competizione per i nutrienti, parassitismo cellulare, o induzione di resistenza nella pianta.

⁵⁰ Lima G., Ippolito A., Nigro F., Salerno M. *Tentativi di lotta biologica contro il mal secco degli agrumi (Phoma tracheiphila) a mezzo di batteri endofiti*. La Difesa delle Piante 1994,16: 43-49.

⁵¹ Coco V., Grimaldi V., Licciardello G., Cirvilleri G., Grasso S., Catara A. *Inhibition of Phoma tracheiphila by Pseudomonas in citrus seedling*. Proceedings of the 8th International Citrus Congress, Agadir, Morocco 2004: 729-732.

⁵² Con questo obiettivo è stato costituito l'International Citrus Microbiome (Phytobiome) Consortium che riunisce i principali paesi produttori di agrumi per studiare le comunità di batteri e funghi associate a piante di agrumi e i loro geni, come supporto alla scelta dei microrganismi più adeguati agli interventi.

lavoro di selezione clonale per la resistenza al mal secco in condizioni di campo, che ha riguardato alcune cultivar largamente diffuse e numerose accessioni di varia provenienza^{53,54}, ha talvolta individuato differenze utili di alcuni cloni⁵⁵, spesso associati a caratteri bioagronomici non di pregio. Anche l'intensa ricerca di ibridi e di mutanti resistenti ha dato risultati parziali⁵⁶. In altri casi, caratteri bioagronomici interessanti non sono risultati associati a caratteri di resistenza, come è avvenuto per il triploide Lemox e per il mutante 2Kr, ottenuto per mutagenesi indotta da radiazioni prodotte da Cobalto 60.

L'ibridazione somatica di protoplasti di limone Femminello siracusano (susceptibile) con quelli di mandarino Murcott (tollerante) ha consentito di ottenere ibridi tolleranti alla tossina di *P. tracheiphilus*⁵⁷. Da callo embriogenico di limone Femminello siracusano sono state ottenute due linee cellulari tolleranti over produttori di chitinasi, in grado di contrastare l'attacco del patogeno. Le piante ottenute hanno mostrato un grado di resistenza paragonabile a quello del Monachello e superiore alla pianta madre (Deng et al., 1995; Gentile et al., 2000).

L'introduzione nel limone Femminello Siracusano del gene chit 42 di *Trichoderma harzianum* ha incrementato l'attività di chitinasi e glucanasi⁵⁸. Le proteine fogliari extracellulari dei cloni transgenici hanno

⁵³ Damigella P., Continella G. *Il miglioramento genetico del limone. Osservazioni comparative su alcune selezioni clonali*. Tecnica agricola, Catania 1971, 96 pp.

⁵⁴ Continella G., Tribulato E. *Preliminari osservazioni comparative su ventidue selezioni clonali di limone* (Citrus limon (L.) Burm.). Tecnica Agricola, Catania, 1979, 31: 131-141.

⁵⁵ Continella G. *Productivity and behaviour versus mal secco disease of some lemon cultivars and clones selected in Sicily*. Proceedings International Society Citriculture 1992, 90-92.

⁵⁶ Russo F. *Stato attuale del miglioramento genetico degli agrumi*. Frutticoltura, 1990, 52:33-40.

⁵⁷ Deng Z.N., Gentile A., Nicolosi E., Domina F., Tribulato E. *Selection of lemon protoplasts for insensitivity to Phoma tracheiphila toxin and regeneration of tolerant plants*. Journal American Society Horticulture Science 1995, 120: 902-905

⁵⁸ Gentile A., Deng Z.N., La Malfa S., Distefano G., Domina F., Vitale A.,

inibito la germinazione dei conidi e l'accrescimento di *P. tracheiphilus* in vitro, e ridotto il numero e le dimensioni delle lesioni causate da *Botrytis cinerea* sulle foglie.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

A distanza di un secolo dalla sua comparsa in Sicilia il mal secco è ormai diffuso in tutte le regioni d'Italia e ha esteso la sua presenza ad altri Paesi del Mediterraneo. *P. tracheiphilus* conferma così il carattere di fattore limitante la coltivazione del limone, temuto dai Servizi Fitosanitari e di Biosicurezza, tanto da attribuirgli l'etichetta di arma biologica. Ciononostante, a parte il lontano Progetto finalizzato CNR per il miglioramento genetico del limone per la resistenza al mal secco (1976-1978), non è stato mai messo a punto un piano multisettoriale di ricerca e sviluppo con finanziamenti e competenze adeguate.

Pertanto, l'avanzamento delle conoscenze, che tuttavia si registra, è frutto della curiosità e dell'intraprendenza di alcuni ricercatori, di mode tecnologiche, di approcci isolati, legati a piccoli finanziamenti occasionali e sporadici.

Se è pur vero che notevoli passi avanti sono stati fatti per quanto riguarda la posizione tassonomica del patogeno e i metodi di rilevamento e identificazione, molti aspetti rimangono non sufficientemente esplorati, e i risultati ottenuti, ancorché interessanti, sono insufficienti per rispondere alle domande dei produttori che investono nel settore.

Oggi, come ieri, rimangono numerosi dubbi sulla esistenza di ceppi del fungo a diversa virulenza, sui rapporti ospite-parassita e sui meccanismi di resistenza, sul ruolo del terreno nell'epidemiologia della malattia⁵⁹, sull'utilità del decreto di lotta obbligatoria. Si ravvisa anche l'ur-

Polizzi G., Lorito M., Tribulato E. *Enhanced resistance to Phoma tracheiphila and Botrytis cinerea in transgenic lemon plants expressing a Trichoderma harzianum chitinase gene*. Plant breeding 2007, 126:146-151.

⁵⁹ Cfr.: i rapporti dei due Seminari di Studio sul Miglioramento Genetico del Limone realizzati nell'ambito del Progetto Finalizzato Miglioramento delle produzioni vegetali per fini alimentari ed industriali mediante interventi genetici, sub progetto Limone. S.Flavia (PA), 21-22 Ottobre 1976; Giovinazzo (BA) 5-6 Aprile 1979.

genza di avviare finalmente una seria applicazione della certificazione delle piante di limone in vivaio, di stimolare il saggio di nuovi formulati e la ricerca di strategie innovative. Non c'è più tempo. Occorre un piano d'azione organico, basato sulla rivisitazione di alcune ricerche mai concluse, sulla condivisione dei prodotti disponibili, e su metodologie, strumenti e competenze moderni (anche non convenzionali).

BIBLIOGRAFIA GENERALE

- CUTULI G., LAVIOLA C., PERROTTA G., SALERNO M., SPINA P., *Il mal secco degli agrumi*. Seminario Internazionale di Studio organizzato nell'ambito del programma di ricerche Agrimed. Museo Villa Piccolo. Capo d'Orlando (Messina) Fondazione Piccolo di Calanovella, Capo d'Orlando (ME), Italy, 1984,133pp.
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health. *Scientific Opinion on the pest categorisation of *Plenodomus tracheiphilus* (Petri) Gruyter, Aveskamp & Verkley [syn. *Phoma tracheiphila* (Petri) L.A. Kantschaveli & Gikashvili]*. EFSA Journal 2014; 12:3775, 34 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3775.
- EPPO (2015) PM 7/048 (3) *Plenodomus tracheiphilus* (formerly *Phoma tracheiphila*).
- EPPO (2019) EPPO Global Database (available online). <https://gd.eppo.int>
- MIGHELI Q., CACCIOLA S.O., BALMAS V., PANE A., EZRA D., MAGNANO DI SAN LIO G., *Mal secco disease caused by *Phoma tracheiphila*: a potential threat to lemon production worldwide*. Plant Disease 2009, 93 :852–867.
- NIGRO F., IPPOLITO A., SALERNO M.G., *Mal secco disease of citrus: a journey through a century of research*. Journal of Plant Pathology 2011, 93:523–560.
- PERROTTA G., GRANITI A., *Phoma tracheiphila* (Petri) Kantschaveli and Gikashvili. In: Smith I.M., Dunez J., Lelliott R.A., Phillips D.H., Archer S.A. European handbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1988 : pp. 396–398.
- PETRI L., *Lo stato attuale delle ricerche sul “mal del secco” dei limoni*. Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale 1930,10, pp. 63-107.
- PUNITHALINGAM E., HOLLIDAY P., *Deuterophoma tracheiphila*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. N. 399, CABI, Wallingford, UK, 1973.