

Identificazione di *Alternaria linicola*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lini*, *Fusarium* spp. e *Boeremia exigua* var. *linicola* in *Linum usitatissimum* L. (lino oleaginoso e da fibra)

Generalità e procedura di analisi delle sementi

Mauro Dal Prà, Alessandro Mattiello, Claudio Marcello Puglielli, Romana Bravi



Laboratorio CREA-DC di Lonigo

Via Guglielmo Marconi, 2 - 36045 Lonigo (VI)
dc.lonigo@crea.gov.it

Introduzione

Il lino (*Linum usitatissimum* L.) è una coltura di rilevanza storica e agronomica, coltivata sia per la produzione di fibra che per i semi oleaginosi ricchi di acidi grassi omega-3. Negli ultimi decenni, l'interesse per questa pianta è cresciuto grazie alla sua versatilità e al valore economico dei suoi derivati. Tuttavia, la produttività e la qualità del lino sono fortemente minacciate da numerosi agenti patogeni, in particolare da funghi eucarioti che causano malattie devastanti in campo e durante la conservazione.

Tra i principali patogeni fungini che colpiscono il lino si annoverano *Fusarium* spp., responsabile di marciumi vascolari; *Botrytis cinerea*, agente della muffa grigia; *Alternaria linicola*, causa della maculatura del fusto; *Colletotrichum lini*, associato all'antracnosi; e *Boeremia exigua* var. *linicola*, implicata nel marciume basale del fusto. Questi microrganismi, essendo patogeni trasmissibili per seme, non solo riducono la resa in campo attraverso sintomi quali avvizzimenti, necrosi fogliare, marciumi e disseccamenti, ma influenzano anche la qualità dei semi in modo significativo. Le infezioni fungine possono alterare la composizione biochimica dei semi, riducendo il contenuto di olio, proteine e lignani, e compromettendo la germinabilità e la vitalità del seme stesso. Ad esempio, *Fusarium* spp. è noto per produrre micotossine che contaminano i semi, rendendoli inadatti all'uso alimentare o alla semina. *Botrytis cinerea* e *Alternaria linicola* possono ridurre l'integrità fisica del seme ed eventualmente causare macchie e marciumi sui germinelli. *Colletotrichum lini* e *Boeremia exigua* var. *linicola* sono associati a riduzione della massa secca del seme ed eventuale necrosi dei germinelli.

La gestione delle fitopatie del lino rappresenta una sfida complessa, poiché ogni patogeno presenta specificità ecologiche, modalità di trasmissione (aria, suolo, seme, residui colturali) e sintomatologie differenti. Tuttavia, un elemento comune a molti di essi è la capacità di utilizzare il seme e i residui colturali come vettori di infezione. Per questo motivo, l'impiego di semente certificata e sana, insieme a pratiche agronomiche corrette come la rimozione o l'interramento dei residui infetti, costituisce una misura preventiva fondamentale nella strategia di difesa fitosanitaria.

Un approccio integrato alla difesa fitosanitaria (IPM – Integrated Pest Management) è una strategia fondamentale per la protezione del lino dalle malattie, che combina diverse tecniche agronomiche, biologiche e, se necessario, chimiche, con l'obiettivo di:

- Prevenire l'insorgenza delle fitopatie
- Limitare la diffusione dei patogeni
- Ridurre l'uso di fitofarmaci
- Salvaguardare l'ambiente e la salute umana

Patogeni e sintomatologie correlate

Alternaria del lino — Alternaria linicola

L'*Alternaria* del lino può causare perdite di resa fino al 60%. Nelle prime fasi di sviluppo della pianta, provoca lesioni rosso scuro nei germogli (Fig. 1a) e, in caso di infezione grave, porta alla morte delle piantine. Se le piantine sopravvivono, risultano rattrappite, e i loro fusti mostrano macchie marrone scuro. I frammenti di pianta morta lasciati sul terreno costituiscono una ricca fonte di inoculo primario, poiché il patogeno può sopravvivere sotto forma di clamidospore a parete spessa sui residui di lino e nel suolo. L'infezione può verificarsi anche in fasi più avanzate dello sviluppo della pianta, causando macchie clorotiche sulle foglie, che portano alla senescenza fogliare.

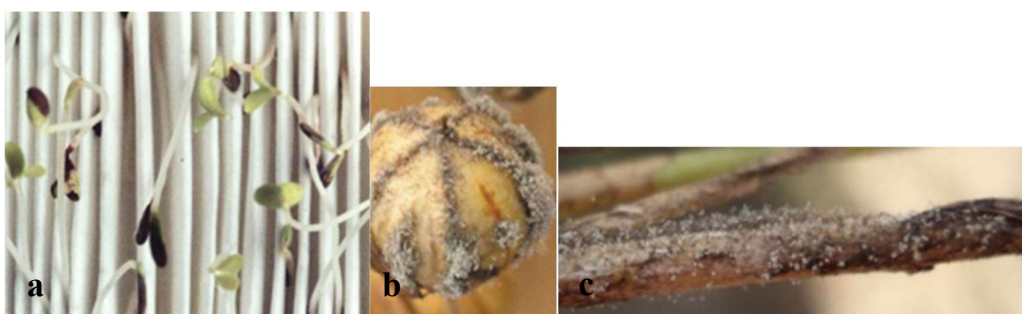


Figura 1: Malattie del lino. a) *A. alternata* sui germinelli; b) *B. cinerea* su capsule; c) *B. cinerea* su fusto.

Muffa grigia — Botrytis cinerea

Questa malattia fungina, causata da *Botrytis cinerea*, provoca il damping-off (marciume del colletto) delle giovani plantule al momento dell'emergenza. Nelle piante che sopravvivono, *B. cinerea* produce macchie grigie (micelio) e aree brunastre o nere (sclerozi) sul fusto (Fig. 1c), che portano al deperimento e alla morte della pianta. Se la pianta riesce a sopravvivere fino alla fase di produzione del seme, le colonie grigie si sviluppano anche sulle capsule (Fig. 1b). Eventi di allettamento possono aumentare la gravità della malattia e causare perdite significative di resa. A causa del suo stile di vita necrotrofo, questo fungo può sopravvivere sui residui colturali fino a quando non trova un nuovo ospite da infettare; questo processo è facilitato dal suo ampio spettro di ospiti che include oltre 200 specie coltivate. In caso di infezione in campo, la pressione dell'inoculo aumenta rapidamente, rendendo la malattia difficile da controllare. Quando la malattia colpisce un campo di lino durante la fase vegetativa, è difficile da eliminare.

Antracnosi — Colletotrichum lini

Colletotrichum lini (sinonimo: *Colletotrichum linicola*) può causare marciume dei germogli prima o dopo l'emergenza ed è responsabile della perdita di ampie superfici coltivate. Quando la pianta di lino sopravvive all'infezione, compaiono lesioni circolari di colore verde scuro o marrone sui cotiledoni e sulle prime foglie, che infine diventano senescenti (Fig. 2a). Lo sviluppo di *C. lini* è favorito da clima caldo e piogge, che ne promuovono la diffusione nel campo tramite schizzi da una pianta all'altra. La semina con semi provenienti da lotti esenti da patogeni è la soluzione migliore per ridurre il rischio di insorgenza della malattia.

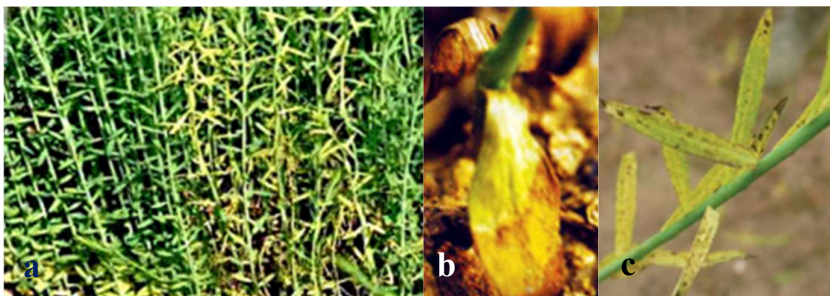


Figura 2: Malattie del lino. a) *C. lini* su piante adulte; b) *B. exigua* var. *linicola* su plantule; c) *F. oxysporum* f. sp. *lini* su foglie.

Marciume basale del fusto / marciume radicale — *Boeremia exigua* var. *linicola*

Boeremia exigua var. *linicola* (precedentemente nota come *Phoma exigua* f. sp. *linicola*) provoca ingiallimento delle plantule (Fig. 2b) che può portare alla morte delle giovani piante. Questo fungo è stato rilevato in campo in quasi tutte le aree di coltivazione del lino nel corso dell'ultimo secolo e, la sua presenza in campo, può distruggere completamente la coltura. Quando la pianta sopravvive, le radici mostrano una colorazione marrone, con zone scolorite che si estendono verso la parte superiore. La parte aerea della pianta diventa gialla, appassita, e presenta lesioni marroni allungate sul fusto. La morte della pianta può avvenire in qualsiasi fase della coltivazione, prima della fioritura. La fase saprofita del ciclo di sviluppo del fungo inizia con miceli all'interno del tegumento del seme, che evolvono in picnidi, prodotti in gran quantità nei tessuti infetti o morti della pianta.

Fusariosi del lino — *Fusarium* spp

Si tratta di un complesso di specie riconducibili al genere *Fusarium*. Tra queste la specie più importante è probabilmente *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, un fungo trasmesso dal suolo che infetta le piante di lino attraverso le radici. È specifico per l'ospite e può compromettere la coltivazione del lino già nelle prime fasi causando, imbrunimento e crescita rallentata delle piantine fino alla senescenza e morte delle giovani piante. L'infezione può colpire anche le piante adulte, provocando macchie giallo/marroni su fusti, foglie (Fig. 2c) e boccioli, che successivamente diventano senescenti e muoiono. In un campo infetto, l'impatto della malattia è non omogeneo, con la presenza di macchie marroni sparse. L'apice delle piante infette può piegarsi verso il basso, formando una sorta di uncino. Il fungo colonizza i vasi xilematici del lino, causando sintomi di carenza idrica unilaterale, visibili sul lato dei vasi infetti. Le epidemie possono provocare perdite di resa dal 80% al 100%, e il patogeno può sopravvivere per decenni nel suolo sotto forma di clamidospore.

In genere per questi cinque patogeni sono disponibili solo pochi fungicidi, con efficacia limitata sia come trattamento del seme, sia per contrastare l'evolvere della malattia nei campi di lino. Inoltre, la maggior parte delle formulazioni sono registrate solamente al di fuori dell'Italia e, in alcuni casi, al di fuori dell'Europa.

Allo stato attuale, varietà di lino resistenti alle malattie sono disponibili solo per *Fusarium* spp. e sono in corso di realizzazione per *Alternaria linicola*.

Disciplina sementiera del lino: aspetti normativi e fitosanitari

La normativa sementiera di riferimento è la Direttiva 2002/57/CE del Consiglio dell'UE, che regola la commercializzazione delle sementi di piante oleaginose e da fibra. Il più recente riordino della disciplina sementiera è stato attuato con il Decreto Legislativo 2 febbraio 2021, n. 20, che stabilisce le norme per la produzione e la commercializzazione dei prodotti sementieri, in attuazione dell'articolo 11 della legge 4 ottobre 2019, n. 117 ed in adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/2031 e del regolamento (UE) 2017/625. Il regolamento (UE) 2016/2031, rappresenta la nuova normativa fitosanitaria europea ed in particolare stabilisce misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante. Secondo la normativa i patogeni del lino sopramenzionati vengono definiti come Organismi Regolamentati Non da Quarantena (ORNQ). I requisiti fitosanitari e le soglie di tolleranza di contaminazione dai diversi patogeni per le diverse categorie di sementi sono indicati nella Fig. 3.

Vengono distinte due tipologie: lino da fibra e lino oleaginoso, poiché si tratta di due filiere agronomiche diverse, con obiettivi produttivi e requisiti di certificazione specifici. La normativa indica con il termine “lino” il lino da fibra e altre volte “semi di lino” per indicare il lino oleaginoso.

Funghi e oomiceti				
ORNQ o sintomi causati dagli ORNQ	Piante da impianto (genere o specie)	Soglie per le sementi pre-base	Soglie per le sementi di base	Soglie per le sementi certificate
<i>Alternaria linicola</i> Groves & Skolko [ALTELI]	<i>Linum usitatissimum</i> L.	5 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i> spp.	5 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i> spp.	5 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i> spp.
<i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> (Naumov & Vassiljevsky) Aveskamp, Gruyter & Verkley [PHOMEL]	<i>Linum usitatissimum</i> L. - lino	1 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i> spp.	1 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i> spp.	1 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i> spp.
<i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> (Naumov & Vassiljevsky) Aveskamp, Gruyter & Verkley [PHOMEL]	<i>Linum usitatissimum</i> L. - semi di lino	5 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i> spp.	5 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i> spp.	5 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i> spp.
<i>Botrytis cinerea</i> de Bary [BOTRCI]	<i>Helianthus annuus</i> L., <i>Linum usitatissimum</i> L.	5 %	5 %	5 %
<i>Colletotrichum lini</i> Westerdijk [COLLLI]	<i>Linum usitatissimum</i> L.	5 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i>	5 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i>	5 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i>
<i>Fusarium</i> Link (genere anamorfo) [FUSAG] esclusi <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (Kill. & Maire) W.L. Gordon [FUSAAL] e <i>Fusarium circinatum</i> Nirenberg & O'Donnell [GIBBCI]	<i>Linum usitatissimum</i> L.	5 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i> spp.	5 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i> spp.	5 % 5 % colpite da <i>Alternaria linicola</i> , <i>Boeremia exigua</i> var. <i>linicola</i> , <i>Colletotrichum lini</i> e <i>Fusarium</i> spp.

Figura 3: Lista dei principali patogeni del lino e soglie di tolleranza per le varie categorie di sementi

Nel caso di sementi di lino oleaginoso, la normativa prevede che per tutte le categorie di sementi, la percentuale di semi infetti rilevata tramite analisi ufficiali debba essere inferiore o uguale al 5% per ciascuno dei cinque ORNQ normati (*Alternaria linicola*, *Boeremia exigua* var. *linicola*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum lini*, *Fusarium* spp). Oltre alla soglia individuale, la normativa prevede anche un limite cumulativo: la somma delle percentuali di infezione dovute ai singoli patogeni, escludendo *B. cinerea*, deve anch'essa essere inferiore o uguale al 5%. Questo doppio criterio – soglia individuale e soglia complessiva – garantisce un controllo fitosanitario rigoroso, pur tenendo conto della possibile presenza simultanea di più patogeni nel lotto.

Per il lino da fibra valgono gli stessi criteri, con una sola eccezione: la soglia di tolleranza per *B. exigua* var. *linicola* è più restrittiva e deve essere inferiore o uguale all'1%. Questa differenza riflette la maggiore sensibilità del lino da fibra a questo patogeno e si traduce in un requisito più severo per la certificazione fitosanitaria.

Protocollo di analisi

Il protocollo di analisi per la detection degli ORNQ del lino è definito dall'International Seed Testing Association (ISTA) nel Protocollo ISTA 7-007. Il CREA-DC è l'autorità competente in Italia per la certificazione della semente, inclusa quella di lino. I protocolli ufficiali CREA-DC per analisi fitosanitarie dei semi sono basati, come in questo caso, sui protocolli ISTA, aggiornati al 2025. Il presente protocollo rappresenta un adattamento del Protocollo ISTA 7-007, originariamente sviluppato per l'analisi di *Alternaria linicola*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum lini*. Il personale tecnico di CREA-DC ha utilizzato le proprie competenze per estendere l'applicazione del metodo, con modifiche minime, alla rilevazione di tutti e cinque gli organismi regolamentati non da quarantena (ORNQ) previsti dalla normativa: oltre ai tre già inclusi nel protocollo ISTA, sono stati integrati anche *Boeremia exigua* var. *linicola* e *Fusarium* spp. Questo adattamento consente di utilizzare un protocollo armonizzato per la valutazione fitosanitaria delle sementi di lino, in linea con i requisiti normativi vigenti.

Il seme da analizzare non deve essere trattato con sostanze che possano interferire con i risultati, pertanto, l'analisi viene eseguita su seme non conciato. Tuttavia, secondo il regolamento fitosanitario (UE) 2019/2072, l'analisi non è necessaria ai fini della commercializzazione se sul seme di lino è stato applicato un trattamento autorizzato per l'uso contro i funghi fitopatogeni *A. linicola*, *B. exigua* var. *linicola*, *B. cinerea*, *C. lini*, *F. spp*.

Preparazione del campione di analisi

L'analisi per la ricerca i funghi fitopatogeni *Alternaria linicola*, *Boeremia exigua* var. *linicola*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum lini*, *Fusarium* spp. viene effettuata su un campione costituito da 400 semi di lino prelevati dal campione medio finale di prelevamento giunto in laboratorio. I semi di ciascun campione di analisi vengono

mantenuti in contenitori sterili in attesa di essere sottoposti alle successive procedure. Per iniziare, è necessario disporre di almeno 400 semi di lino da analizzare. Questi verranno distribuiti su piastre Petri da 90 mm, in modo da avere circa 10 semi per piastra. Il terreno di coltura è a base di Potato Dextrose Agar (PDA), addizionato con streptomicina solfato (50 mg/L), che serve a inibire la crescita batterica senza interferire con quella fungina. Le piastre vanno preparate in modo sterile, versando circa 18–20 ml di PDA + antibiotico per ciascuna. Una volta solidificate, sono pronte per l'inoculo dei semi.

Incubazione e osservazione

Il seme non viene disinfettato superficialmente, perché la procedura interferirebbe con l'individuazione degli organismi target, ma viene adagiato immediatamente all'interno di capsule Petri contenenti PDA + antibiotico, preparate in precedenza, in numero pari a dieci per piastra, avendo cura di mantenerli il più possibile distanziati tra loro (Fig. 4a). Le piastre, oltre ad essere singolarmente numerate, riportano anche il numero con cui il campione è stato registrato in laboratorio nonché la data indicante l'inizio dell'incubazione. Dopo aver posto i semi al loro interno, le capsule vengono disposte in pile da dieci e avvolte in pellicola trasparente in modo da prevenire un eventuale disseccamento. Ogni campione sarà quindi costituito da 4 pile di piastre (Fig. 4b), corrispondenti a 400 semi analizzati. Le piastre vengono incubate a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ al buio per 9 giorni. Se dopo questo periodo non si osserva sporulazione sufficiente per identificare i patogeni, si può prolungare l'incubazione fino a 14 giorni, alternando 12 ore di luce NUV (Near Ultraviolet Light) e 12 ore di buio. Questo stimola la formazione di strutture fungine utili al riconoscimento.

Durante l'incubazione, è utile includere anche una coltura di riferimento per ciascun patogeno, da incubare in parallelo, così da avere un confronto diretto.

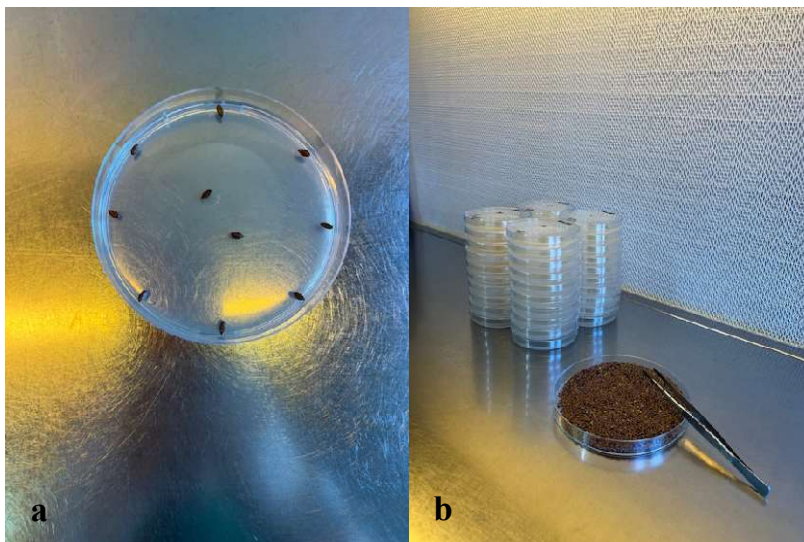


Figura 4. a) Semi di lino su terreno PDA+ antibiotico; b) Distribuzione dei 400 semi su 40 piastre

Identificazione dei patogeni

Dopo l'incubazione, si esaminano le piastre per individuare le colonie fungine appartenenti ad una delle cinque specie target.

Alternaria linicola:

Esaminare le piastre per individuare colonie dense di colore grigio-oliva (Fig. 5a), con diametro compreso tra 1,5 e 3 cm. Alcune colonie di specie saprofite di *Alternaria* possono somigliare a quelle di *A. linicola*, ma i conidi di *A. linicola* hanno una forma distintiva (Fig. 5b). Le colonie devono quindi essere esaminate al microscopio ottico con ingrandimento $\times 50$ – 100 . I conidi si formano singolarmente, hanno pareti lisce, sono di colore olivastro-bruno, di forma conica allungata, ellissoidale o clavata, e si assottigliano gradualmente verso il becco, che è lungo e talvolta ramificato. La dimensione dei conidi (corpo e becco) è indicativa ma non deve essere considerata un criterio obbligatorio per l'identificazione. La dimensione dei conidi dipende infatti dal terreno di coltura, dall'isolato e dalle condizioni di crescita.

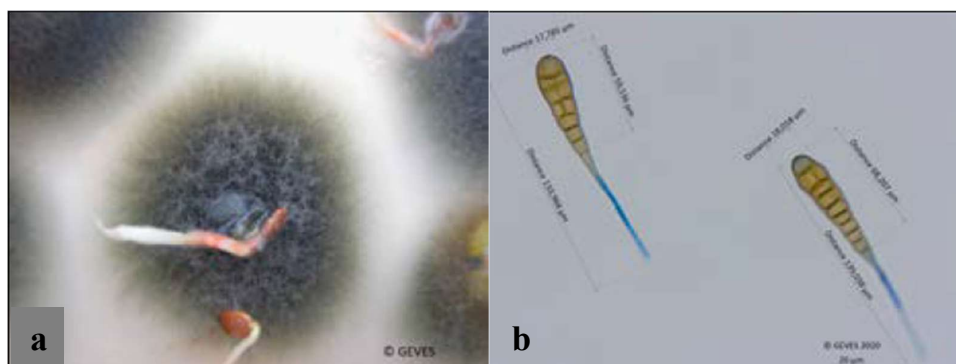


Figura 5. a) Tipica colonia di *A. linicola* su PDA; b) Tipici conidi allungati di *A. linicola*

Botrytis cinerea:

Esaminare le radici per verificare la presenza di marciume molle accompagnato da presenza di un abbondante micelio grigio (Fig. 6a), oppure solo micelio molto piatto, diffuso e non aereo, con possibile produzione di sclerozi. Le colonie su agar raggiungono fino a 5 cm di diametro dopo 5 giorni. L'identificazione può essere confermata allo stereomicroscopio, dove si evidenziano ife nere nastriformi che producono fasci di conidiofori ramificati, con conidi ovoidali, ialini (Fig. 6b). Quando gli analisti hanno familiarità con il fungo, l'esame a occhio nudo è sufficiente per l'identificazione.

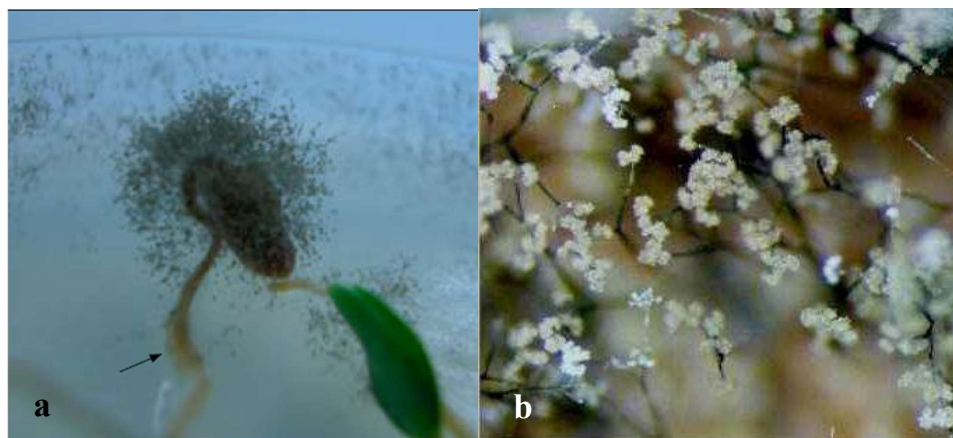


Figura 6. a) Radici di lino invase da *B. cinerea*; b) Grappoli di conidi ialini portati da ife nere

Colletotrichum lini:

È facilmente riconoscibile tramite esame visivo. Esaminare le piastre alla ricerca di colonie di colore rosa conchiglia fino a salmone (Fig. 7a). Le colonie di *C. lini* presentano un aspetto finemente lanuginoso-grigio al centro e rosa salmone ai margini. Corpi fruttiferi scuri e globosi (acervuli) possono essere sparsi nell'agar adiacente al seme (Fig. 7b). Dall'estremità di ciascun acervulo si originano caratteristici peli neri lunghi e affusolati (sete), con 2–5 setti, lunghi 60–120 µm e larghi 2–4 µm. Masse conidiche di colore arancione brillante compaiono sul seme e sull'agar adiacente. I conidi sono ialini; di forma oblunga o a manubrio, unicellulari, con estremità dritte, di dimensioni 9–15 × 3–4 µm.

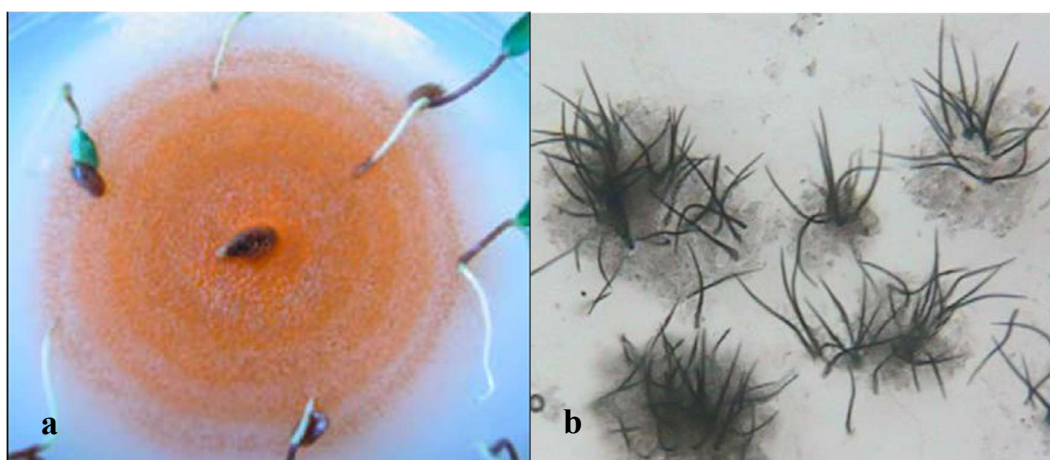


Figura 7. a) Colonie di *C. lini* di colore salmone; b) Immagine microscopica di acervuli di *C. spp.*

Fusarium spp. su lino:

Facilmente riconoscibile tramite esame visivo. Le colonie si presentano cotonose e di colore bianco sulla superficie dell'agar. La colorazione del fondo dell'agar varia in modo significativo a seconda della specie: può andare dal rosa al rosso, dal giallo all'arancio, fino al blu, violaceo (Fig. 8a) o marrone. I margini delle colonie sono generalmente regolari e ben definiti. In alcuni casi, la superficie delle colonie rimane bianca, mentre in altri casi può assumere progressivamente la stessa tonalità visibile sotto l'agar, man mano che matura (Fig. 8b). Sulle colonie mature possono comparire sporodochi e conidi in abbondanza. All'osservazione al microscopio, i macroconidi sono ialini, falciformi, multicellulari, con dimensioni variabili in base alla specie; in alcune specie possono essere assenti. I microconidi sono più piccoli, di forma ellittica o allungata, generalmente unicellulari (Fig. 8c), e anch'essi possono essere assenti.

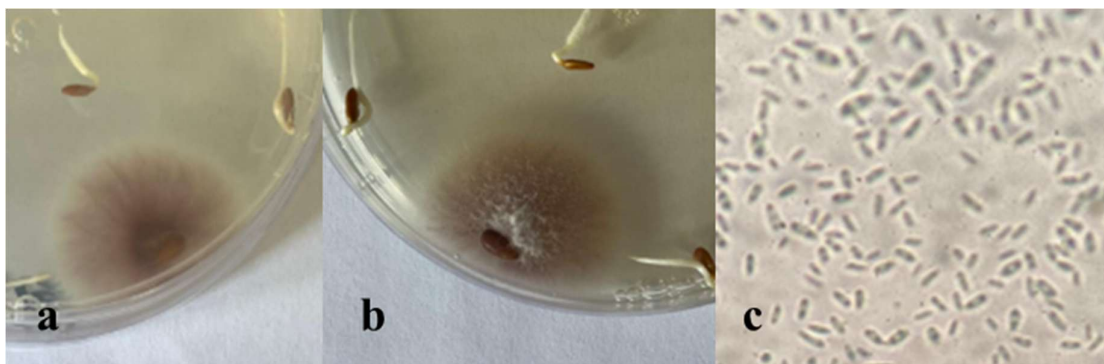


Figura 8. Colonia di *F. spp* su lino. a) Colorazione del fondo dell'agar; b) Colorazione sulla superficie dell'agar; c) Microconidi di *F. spp.* al microscopio ottico, ingrandimento 200x.

Boeremia exigua var. *linicola* su lino:

Le colonie di *B. exigua* var. *linicola* cresciute su PDA si presentano generalmente piatte, con superficie vellutata o leggermente cotonosa. Il colore della colonia, osservato dall'alto, varia dal grigio scuro al grigio-talpa o grigio-bruno (Fig. 9a). La superficie può apparire compatta o leggermente villosa. I margini delle colonie sono generalmente regolari e ben definiti. Sulle colonie mature possono comparire picnidi, visibili anche a occhio nudo come punti neri sulla superficie della colonia. Tuttavia, la sola osservazione macroscopica può portare a errori di valutazione, poiché altre strutture fungine o impurità possono simulare l'aspetto dei picnidi.

Per questo motivo, è raccomandata l'osservazione al microscopio ottico, a ingrandimenti di 40×–100×, per confermare la presenza di picnidi e valutarne la morfologia (Fig. 9b). I picnidi sono corpi fruttiferi asessuati, di forma globosa o sub-globosa, di colore scuro, spesso immersi o semi-immersi nell'agar. All'interno dei picnidi si formano i conidi, che sono ialini, unicellulari, di forma ellissoidale o cilindrica, con dimensioni variabili (Fig. 9c). La produzione di picnidi e conidi può essere più abbondante su substrati vegetali rispetto alla sola piastra.



Figura 9. Colonia di *B. exigua* var. *linicola*. a) Colorazione sulla superficie dell'agar; b) Picnidi visti al microscopio, ingrandimento 100x, c) Microconidi al microscopio ottico, ingrandimento 400x

Espressione del risultato finale

I risultati delle analisi vengono riportati su un'apposita scheda, indicando per ciascuna piastra il numero di semi infetti rilevati. La somma dei semi infetti di tutte le piastre, rapportata al totale di 400 semi analizzati, viene espressa in percentuale e rappresenta il valore finale del campione. Questa procedura deve essere ripetuta separatamente per ognuno dei cinque patogeni target. A partire dalle singole percentuali deve essere calcolata anche la percentuale cumulativa per i patogeni (esclusa *Botrytis cinerea*).

In base alle disposizioni legislative vigenti, un campione di lino oleaginoso viene considerato non idoneo alla certificazione, se anche solo una delle cinque percentuali individuali di semi infetti supera il 5%, oppure se la percentuale cumulativa dei semi infetti (esclusa *Botrytis cinerea*) supera il 5% sul totale dei semi analizzati. Per il lino da fibra valgono le stesse condizioni già descritte per il lino oleaginoso, con l'unica eccezione di *Boeremia exigua* var. *linicola* la cui soglia di tolleranza è più restrittiva: un campione viene considerato non idoneo se la percentuale di semi infetti da questo patogeno supera l'1%.

Principali strumenti e materiale di laboratorio occorrenti

- Coltura di riferimento per ciascuno dei cinque organismi target
- Becher di volume 250 mL e bottiglie Schott DuranTM da 500/1000 mL
- Carta da filtro
- Micropipetta a volume 20-200 µl con relativi puntali sterili
- Pinzette
- Piastre Petri monouso da 90 mm di diametro
- Bilancia analitica con sensibilità di 0,001 g
- Deionizzatore/distillatore acqua
- Autoclave
- Stufa a secco
- Frigorifero a 4°C
- Armadio termostatico a 20 ± 2°C
- Lampada NUV
- Cappa a flusso laminare orizzontale
- Sacchetti autoclavabili BioHazard per lo smaltimento delle piastre
- Stereomicroscopio e/o lente di ingrandimento
- Microscopio ottico

Norme di laboratorio

Al fine di evitare contaminazioni incrociate tra i campioni di seme, nonché inquinamento da agenti esterni, sarà di fondamentale importanza, nel corso di tutte le operazioni, seguire strettamente le norme igieniche di un laboratorio di microbiologia. In particolare, bisognerà provvedere alla disinfezione di tutte le superfici di lavoro e degli strumenti utilizzati tramite etanolo al 70%, sia prima che dopo la manipolazione del campione di seme, e utilizzare per ogni campione contenitori e materiali di consumo nuovi e/o sterilizzati in stufa a secco o in autoclave. La fase di riempimento delle capsule Petri rappresenta un punto critico relativamente al mantenimento della sterilità del substrato di coltura; risulterà fondamentale effettuare questa operazione nel più breve tempo possibile, lavorando sotto cappa sterile e con utilizzo di guanti da parte dell'operatore. Al termine di ogni sessione di lavoro, sarebbe opportuno sottoporre la cappa utilizzata a un trattamento con lampada UV germicida. Al termine delle analisi, dopo la lettura delle piastre, le stesse andranno smaltite in appositi raccoglitori previa inertizzazione in autoclave a 105 °C per 10 minuti.

Preparazione terreno di coltura (PDA)

Dosi per 800 mL di terreno	
Patata Destrosio Agar (PDA)	31,2 g
H ₂ O bidistillata	800 mL
Streptomicina	40 mg

- Per questa procedura di analisi si è scelto di utilizzare il terreno di coltura PDA DIFCO™ commercializzato dalla ditta Becton Dickinson. In questo modo è possibile uniformarsi al protocollo ISTA ed ai principali manuali di riconoscimento fungino. In caso di mancata osservanza di questo accorgimento, si otterranno colonie di colorazione non conforme a quella prevista.
- Mettere in bottiglie Duran da 1 L la quantità prescritta di PDA in polvere assieme all'acqua bidistillata e agitare la soluzione.
- Sterilizzare il terreno in autoclave a 121°C, 1 atm, per 20 minuti, in modo da avere una completa sterilizzazione.
- Una volta che il PDA è sciolto e sterilizzato, mantenere le bottiglie a temperatura ambiente per un tempo sufficiente ad arrivare a 50°C, al fine da poter procedere agevolmente con il riempimento delle capsule Petri e, nello stesso tempo, impedire la solidificazione dell'agar.
- Aggiungere, tramite pipetta, la quantità prescritta di streptomicina, precedentemente sterilizzata per filtrazione. Agitare le bottiglie delicatamente in modo da prevenire la formazione di schiuma e bolle d'aria.
- Procedere con il riempimento delle capsule Petri (Ø90mm) versando circa 18 mL di PDA in ciascuna capsula, lasciando raffreddare per alcuni minuti prima di chiuderle e, preferibilmente, mantenendo le stesse a temperatura ambiente per 24 ore prima dell'uso o prima di essere conservate a 4-5°C. L'operazione deve essere eseguita sotto cappa sterile per limitare i rischi di contaminazione. In questa fase sarà importante non chiudere le piastre prima che il PDA sia adeguatamente raffreddato, così da evitare la formazione di condensa.

Note degli autori:

La normativa prescrive di determinare la percentuale di semi infetti da qualsiasi specie appartenente al genere *Fusarium*, escludendo dal conteggio *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* e *F. circinnatum*. Tuttavia, la distinzione tra le diverse specie di *Fusarium* e, in particolare, tra le cosiddette “formae speciales” di *F. oxysporum* non può essere effettuata in modo affidabile con i soli criteri morfologici previsti dai protocolli micologici tradizionali per la certificazione sementiera. L'identificazione corretta delle specie di *Fusarium* richiede infatti l'impiego di tecniche di “DNA barcoding” e il sequenziamento di più geni contemporaneamente, strumenti non ancora previsti dai protocolli ufficiali. Inoltre, la stessa suddivisione in “formae speciales” di *F. oxysporum* è oggi superata poiché si tratta, in realtà di un complesso di specie distinte, riconoscibili solo tramite analisi molecolari avanzate.

Bibliografia:

Moyse, J.; Lecomte, S.; Marcou, S.; Mongelard, G.; Gutierrez, L.; Höfte, M. Overview and Management of the Most Common Eukaryotic Diseases of Flax (*Linum usitatissimum*). *Plants* 2023, 12, 2811. <https://doi.org/10.3390/plants12152811>.

Soil-Borne Diseases of Flax (*Linum usitatissimum*). [Scheda enciclopedica sulle principali malattie trasmesse dal suolo, tra cui Fusarium wilt, con dettagli su sintomi, epidemiologia e gestione]. <https://encyclopedia.pub/entry/47607>.

List of flax diseases – Wikipedia. [Elenco aggiornato delle principali malattie del lino, con riferimenti a patogeni fungini, batterici, virali e fitoplasmi]. https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_flax_diseases.

International Seed Testing Association (ISTA). (2025). 7-007: Detection of *Alternaria linicola*, *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum lini* in *Linum usitatissimum* (flax, linseed) seed. In International Rules for Seed Testing 2025: Validated Seed Health Testing Methods. Wallisellen, Switzerland: ISTA. <https://www.seedtest.org/api/rm/Y853KF9E7G454MC/ista-rules-2025-shmethods-7-007-en.pdf>.