

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n.43

**SCHEDA TECNICA PER
INDAGINI SULL'ORGANISMO NOCIVO**

Meloidogyne graminicola

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0	GDL per il Programma di indagine sugli organismi nocivi delle piante	CFN 26-27/07/2023	27/07/2023	

Indice

Premessa	3
1. Informazioni Generali	3
1.1 Tassonomia e inquadramento	3
1.2 Normativa vigente	4
1.3 Distribuzione geografica	5
1.3.1 Presenza in Italia	5
2. Aspetti biologici dell'organismo	6
2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo	6
2.2 Sintomi/segni	6
2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)	7
3. Siti di maggiore rischio	7
3.1 Aree a rischio/ Risk areas	7
4. Indagine/survey	9
4.1 Osservazione visiva	9
4.2 Campionamento	14
4.3 Indagine con trappole	15
5. Diagnosi	15
5.1 Campione/Matrice	15
5.2 Test per l'identificazione	15
Bibliografia	18

Premessa

La scheda tecnica di indagine per un organismo nocivo o gruppo di organismi nocivi affini riporta le informazioni sull'inquadramento tassonomico e normativo, la diffusione a livello mondiale e nazionale, gli aspetti di carattere generale sul ciclo biologico, le istruzioni su come condurre e quando rilievi visivi e campionamenti sulla base di ampie illustrazioni dei sintomi o danni causati sulle specie ospiti e, nel caso di insetti, le modalità di indagine attraverso l'uso di trappole. La scheda riporta anche le informazioni sulle metodologie diagnostiche per l'identificazione del singolo organismo nocivo o gruppo affine.

La scheda tecnica di indagine tiene conto dei **regolamenti comunitari** e/o **decreti nazionali**, dell'esperienza dei Servizi Fitosanitari Regionali (SFR) nel controllo del territorio, degli standard internazionali (**EPPO**, ISPM etc.). La scheda è uno strumento funzionale al riconoscimento dell'organismo nocivo in dotazione al personale tecnico impegnato nell'esecuzione delle indagini (Ispettori fitosanitari, Agenti fitosanitari, Assistenti fitosanitari, Tecnici rilevatori)

La scheda tecnica di indagine viene elaborata da un gruppo di lavoro di esperti (**SFR** e **CREA-DC**) per l'organismo nocivo considerato, con l'eventuale coinvolgimento di altri esperti di Enti di Ricerca e Università. La scheda di indagine viene approvata dal **Comitato Fitosanitario Nazionale** (CFN) e revisionata periodicamente per gli aggiornamenti normativi, distribuzione geografica e procedure di indagine.

1. Informazioni Generali

1.1 Tassonomia e inquadramento

Nome scientifico: *Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield, 1965

Nome comune: Nematode galligeno del riso; rice root-knot nematode.

Codice EPPO: MELGGC

Posizione tassonomica:

Phylum: *Nematoda* (1NEMAP)

Classe: *Chromadorea* (1CHROC)

Ordine: *Rhabditida* (1RHABO)

Famiglia: *Meloidogynidae* (1MELGF)

Genere: *Meloidogyne* (1MELGG)

Specie: *Meloidogyne graminicola* (MELGGC)

Categorizzazione *(se rilevante)*

EU: Misure di emergenza

EPPO: Alert list

1.2 Normativa vigente

EUROPEA:

- **Regolamento (UE) 2016/2031** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 26 ottobre 2016, relativo alle misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante, che modifica i regolamenti (UE) n. 228/2013, (UE) n. 652/2014 e (UE) n. 1143/2014 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga le direttive 69/464/CEE, 74/647/CEE, 93/85/CEE, 98/57/CE, 2000/29/CE, 2006/91/CE e 2007/33/CE del Consiglio;
- **Regolamento (UE) 2017/625** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15 marzo 2017, relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari, recante modifica dei regolamenti (CE) n. 999/2001, (CE) n. 396/2005, (CE) n. 1069/2009, (CE) n. 1107/2009, (UE) n. 1151/2012, (UE) n. 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio, dei regolamenti (CE) n. 1/2005 e (CE) n. 1099/2009 del Consiglio e delle direttive 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE del Consiglio, e che abroga i regolamenti (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE del Consiglio e la decisione 92/438/CEE del Consiglio (regolamento sui controlli ufficiali);
- **Regolamento delegato (UE) 2019/1702** della Commissione del 10 agosto 2019 che integra il regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio stabilendo l'elenco degli organismi nocivi prioritari;
- **Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072** della Commissione che stabilisce condizioni uniformi per l'attuazione del regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante e che abroga il regolamento (CE) n. 690/2008 della Commissione e modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2018/2019 della Commissione e ss.mm.ii.;
- **Regolamento di esecuzione (UE) 2022/1372** della Commissione del 5 agosto 2022 relativo a misure temporanee per prevenire l'ingresso, lo spostamento, la diffusione, la moltiplicazione e il rilascio nell'Unione di *Meloidogyne graminicola* (Golden & Birchfield).

NAZIONALE:

- **Decreto Legislativo 2 febbraio 2021, n. 19.** "Norme per la protezione delle piante dagli organismi nocivi in attuazione dell'articolo 11 della legge 4 ottobre 2019, n. 117, per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/2031 e del regolamento (UE) 2017/625"(GU Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana - Serie generale n.48 del 26 febbraio 2021) e s.m.i.

1.3 Distribuzione geografica

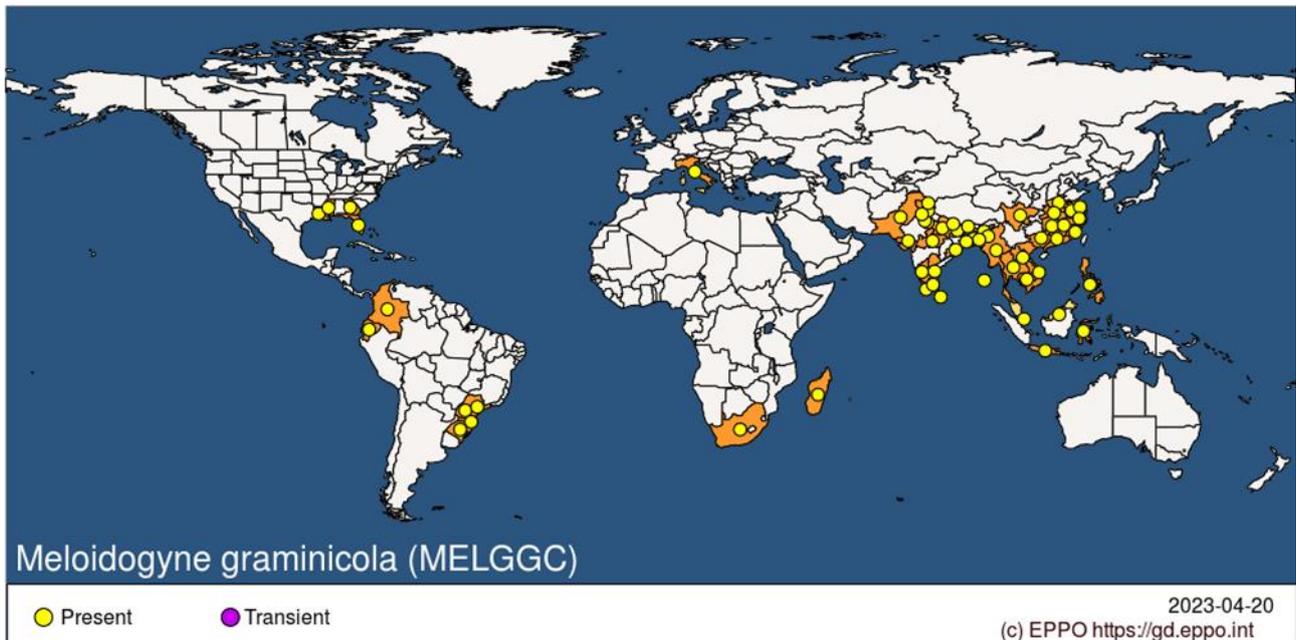
Africa: Madagascar, Sud Africa

America: Brasile, Colombia, Ecuador, Stati Uniti

Asia: Bangladesh, Cambogia, Cina, Filippine, India, Indonesia, Laos, Malesia, Myanmar, Nepal, Pakistan, Singapore, Sri Lanka, Thailandia, Vietnam

Europa: Italia

Oceania: non presente



<https://gd.eppo.int/taxon/MELGGC/distribution>

1.3.1 Presenza in Italia:

Presente in Italia dal 2016 con infestazioni in appezzamenti coltivati a riso in Piemonte nelle Province di Biella e Vercelli. Dal 2018 segnalato anche in Lombardia con infestazione in appezzamenti coltivati a riso nella Provincia di Pavia.

2. Aspetti biologici dell'organismo

2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo

Meloidogyne graminicola è una specie endoparassita sedentaria dell'apparato radicale. La sua forma di resistenza nell'ambiente è costituita dagli ammassi di uova, protetti da una secrezione gelatinosa, che si conservano nei suoli e nei residui colturali infestati. In presenza di potenziali ospiti e condizioni di umidità e temperatura adeguate, dalle uova schiudono le larve mobili (J2) che si portano rapidamente a ridosso dell'apparato radicale penetrandovi attivamente sino a raggiungere il cilindro centrale, laddove si fissano. In corrispondenza del sito di alimentazione si assiste alla proliferazione di ammassi cellulari degenerati (cellule giganti) che fungono da *pabulum*, oltre che da protezione, per l'esemplare in fase di sviluppo con la conseguente formazione di iperplasie (galle), tipico sintomo dell'attacco dei nematodi galligeni. All'interno delle galle le larve attraversano altri due stadi larvali (J3, J4) che assumono una forma tipicamente piriforme (Bridge & Starr, 2007).

Come tipico del Genere, anche *M. graminicola*, manifesta uno spiccato dimorfismo sessuale: infatti, all'interno dell'ultima esuvia della fase larvale gli individui maschi generano un adulto vermiforme, mobile, in grado di muoversi all'interno dei tessuti dell'ospite e intorno alla rizosfera, alla ricerca della femmina da fecondare, che, invece, si mantiene fissa al punto di fissaggio larvale con una forma tipicamente piriforme (Mulk, 1976). A maturità le femmine cominceranno a produrre nuovi ammassi di uova protetti da secrezioni gelatinose sino a riempire le galle stesse, spesso fuoriuscendo nel suolo della rizosfera.

Meloidogyne graminicola è un organismo policiclico, infatti, nel corso della stagione favorevole le uova potranno rapidamente schiudersi dando vita a diverse generazioni sovrapposte costituendo vaste popolazioni. Al contrario, nel corso della stagione avversa queste rimangono quiescenti sino al manifestarsi delle rinnovate idonee condizioni ambientali (Mulk, 1976; Bridge & Page, 1982).

La diffusione spaziale del parassita è affidata sia alla bassa efficacia del movimento attivo delle larve mobili (pochi metri all'anno) sia al movimento passivo, sfruttando qualsiasi movimentazione del suolo infestato (ad es. macchine, animali).

2.2 Sintomi/segni

Come tipico delle infestazioni da nematodi, i sintomi da *M. graminicola* sulle coltivazioni infestate sono aspecifiche. L'attacco alle radici riduce la funzionalità assorbente delle piante che si riflette sulla parte epigea nel generale deperimento, clorosi, nanismo, ridotta vigoria, accorciamento degli internodi, mancato accostamento nelle colture cerealicole, scarsa/assente fioritura, sino anche alla morte della pianta, in caso di infestazioni di eccezionale portata (Bridge & Page, 1982; Fanelli et al., 2017; 2022).

All'interno delle coltivazioni i sintomi possono distribuirsi in maniera casuale con manifestazioni circolari oppure mediante gradiente lineare, in linea con la direzione delle operazioni colturali che contribuiscono all'espansione (mediante trasporto passivo) dell'infestazione all'interno del medesimo appezzamento. Poiché la manifestazione del danno avviene in presenza di infestazione occorse da massicce popolazioni di *M. graminicola*, spesso capita che i sintomi siano distribuiti anche sull'intero appezzamento, dovute alla crescita esponenziale di una popolazione che sino alla campagna precedente non aveva le dimensioni tali da creare perdite rilevabili.

L'analisi visiva dell'apparato radicale può portare alla verifica dell'eventuale presenza dei sintomi più tipici prodotti dai nematodi galligeni. Un apparato radicale infestato manifesta una più o meno intensa presenza di iperplasie in funzione della dimensione della popolazione agente dell'infestazione.

Meloidogyne graminicola produce sia galle molto rigonfie rassomiglianti a noduli sia galle più estese lungo la direzione della radice generando dei rigonfiamenti a manicotto. Queste ultime galle, se presenti in corrispondenza dell'apice radicale, si possono incurvare generando le galle ad uncino, caratteristiche della specie.

2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)

Come tipico del Genere *Meloidogyne*, anche *M. graminicola* manifesta una elevata polifagia (Torrini et al., 2020). Isolata e descritta per la prima volta su *Echinochloa colonum*, tipica dei tappeti erbosi, il suo ospite elettivo è senza dubbio il riso (*Oryza* sp). Tra le colture di interesse agrario su cui è in grado di riprodursi, si segnala inoltre il frumento (*Triticum aestivum*), l'avena (*Avena sativa*), l'orzo (*Hordeum vulgare*) ma anche la canna da zucchero (*Saccharum officinarum*) e il mais (*Zea mays*). Nel corso della campagna 2021, un appezzamento coltivato a soia (*Glycine max*), in Lombardia, ha evidenziato una importante infestazione.

L'elevata polifagia di *M. graminicola* si manifesta anche nella sua capacità di svilupparsi a spese di essenze infestanti tipiche della risaia quali Cyperacee, *Heteranthera* sp., giavoni, alismatacee.

3. Siti di maggiore rischio

3.1 Aree a rischio/ Risk areas

Le aree di monitoraggio dovrebbero essere scelte tenendo conto della biologia di questa specie e dei suoi principali ospiti. In generale, l'habitat con una maggiore probabilità di infestazione da *M. graminicola* è la risaia, ma potrebbe essere rinvenuta anche in campi con altre piante ospiti coltivate o spontanee (soprattutto della famiglia delle Poaceae). Particolare attenzione va posta in risaie e seminativi a ridosso delle aree infestate oppure in aree coltivate soggette a lavorazioni procurate da terzisti provenienti da aree notoriamente infestate.

Nonostante che al momento non siano stati riportati casi di infestazioni di *M. graminicola* in ambiente controllato, esperimenti condotti in serra su riso, erbe infestanti e piante ornamentali in vaso, hanno dimostrato come sia possibile l'insediamento in condizioni protette di *M. graminicola* (Yik e Birchfield, 1979).

I siti a maggior rischio pertanto sono (secondo la codifica Europhyt):

1.1 campo (a seminativo, a pascolo)

2.1 giardini privati

3.1 serra

3.2 sito privato, diverso da una serra

4. Indagine/survey

Modalità di indagine previste

- ✓ Osservazione visiva – Visual Inspection
- ✓ Campionamento – Sample Taking
- ✓ Indagine con trappole - Trapping

4.1 Osservazione visiva

Aspetti generali: L'analisi visiva è condotta in appezzamenti coltivati a essenze suscettibili all'attacco di *M. graminicola* dando priorità alle coltivazioni di riso.

La valutazione visuale avviene osservando la campagna dall'esterno cercando di verificare l'eventuale presenza di aree circolari clorotiche e/o fallanze di crescita. Se individuate, è possibile procedere ad una prima ispezione visiva andando a prelevare piante sintomatiche e verificando l'eventuale presenza di galle sulle radici.

Sito di Indagine	Cosa guardare	Periodo di osservazione	Immagini
Risaia o campo (a seminativo, a pascolo)	Appezzamento e piante	Dall'emergenza della coltura sino all'accestimento	 <p>Appezzamento coltivato a riso in fase d'emergenza. Si notino, già in questa fase, la generale clorosi delle plantule e la presenza di diffuse fallanze all'interno dell'appezzamento (Foto: S. Sacchi)</p>



Plantule di riso in fase di emergenza estratte da suolo per l'analisi visuale dell'apparato radicale. Si noti la massiccia presenza di galle e la totale compromissione dell'apparato stesso (Foto: S. Sacchi)

Appezamento
e piante

Dalla levata



Appezamento coltivato a riso nella fase di fine accostimento, inizio levata. Si noti la presenza diffusa di aree subcircolari clorotiche e di fallanze riconducibili all'azione di nematodi (Foto: S. Sacchi)



Appezzamento coltivato a riso nella fase di fine accostimento, inizio levata: esito di pesantissima infestazione (Foto: S. Sacchi)



Apparato radicale di pianta culmo di riso infestato. Si noti la presenza di galle a nodulo oltre che di galle a manicotto con ripiegamento ad uncino (apice radice esposta a dx). (Foto: S. Sacchi)

Apparato
radicale

Maturazione e
Stoppie



App ezzamento coltivato a Riso infestato da *M. graminicola* ripreso in epoca di maturazione. L'infestazione si riflette nella ridotta capacit  riproduttiva della pianta e nella conseguente perdita di produzione (Foto: S. Sacchi)



Scarsa differenziazione di pannocchie in appezzamento di Riso (Foto: S. Sacchi)



Apparati radicale di piante infestate in epoca di maturazione. Si noti la massiccia presenza di galle. (Foto: S. Sacchi)

4.2 Campionamento

Aspetti generali: In caso di rinvenimento di sintomi attribuibili a nematodi galligeni occorre procedere al campionamento delle piante stesse, collezionando 15/20 piante comprese di apparato radicale e del suolo della rizosfera da inviare al Laboratorio Nematologico di riferimento per la conseguente conferma dell'infestazione e classificazione specifica.

In caso di appezzamenti asintomatici è possibile procedere al campionamento distribuendo il prelievo a 15/20 punti casuali in ciascun appezzamento andando a costituire un campione globale da sottoporre alle analisi di laboratorio.

Sito di Indagine	Cosa prelevare	Periodo di Prelievo	Come conservare	Immagini
Risaie e seminativi	Materiale vegetale - Plantule	Dall'emergenza alla levata	Sacchetto tenuto a temperatura massima 25°C	 <p>Campione rappresentativo costituito di plantule all'emergenza raccolta in appezzamento infestato (Foto: S. Sacchi)</p>
	Materiale vegetale – Apparato radicale			 <p>Campione rappresentativo di piante ridotte della loro parte epigea da sottoporre ad analisi di Laboratorio per la verifica dell'eventuale presenza di nematodi galligeni e conseguente classificazione specifica (Foto: S. Sacchi)</p>

4.3 Indagine con trappole

Aspetti generali: non applicabile

5. Diagnosi

Protocolli ufficiali SFN

Non disponibile

Standard di riferimento:

PM 7/119 (1). Nematode extraction. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2003) 43, 471-495.

5.1 Campione/Matrice

- Apparato radicale di piante ospiti
- Suolo della rizosfera

5.2 Test per l'identificazione

Tipologie diagnostiche previste all'interno del monitoraggio cofinanziato

- **Root-gall nematode inspection** (osservazione per la presenza di galle nelle radici)
- **Extration** (per campioni di terreno e radici completo di osservazione allo stereomicroscopio)
- **Microscopically identification** (per identificazione della specie di nematodi)
- **PCR**
- **PCR+Sequencing** (va indicato quando si fa insieme la PCR e si invia al sequenziamento)
- **Real time PCR**

Ispezione delle galle sulle radici:

L'ispezione si basa sull'analisi visiva di radici che mostrano un'evidente presenza di galle a forma d'uncino. Le radici devono essere delicatamente lavate, asciugate e osservate allo stereomicroscopio.

Estrazione:

L'estrazione delle forme immobili e delle masse di uova da radici può essere eseguita mediante dissezione diretta o centrifugazione. Mentre gli stadi mobili (J2 e maschi) possono essere estratti dal suolo mediante la tecnica dell'imbuto di Baermann, bacinelle di Oostenbrink, elutriatore di Oostenbrink, oppure semplicemente con i setacci di Cobb (Coolen, 1979; EPPO, 2013).

Identificazione morfologica:

L'identificazione morfologica a livello di specie non è semplice, dal momento che i caratteri morfologici di *M. graminicola* sono simili a quelli di altre specie di *Meloidogyne*, soprattutto quelle appartenenti al gruppo 'graminis'. Inoltre, non ci sono chiavi complete aggiornate del genere. In Fig. 1 sono riportati i disegni dei principali caratteri identificativi. Per i valori morfometrici di *M. graminicola*, invece, fare riferimento alla descrizione originale di Golden & Birchfield (1965) e alle misure del ceppo italiano, isolato in Piemonte (Fanelli et al., 2017)

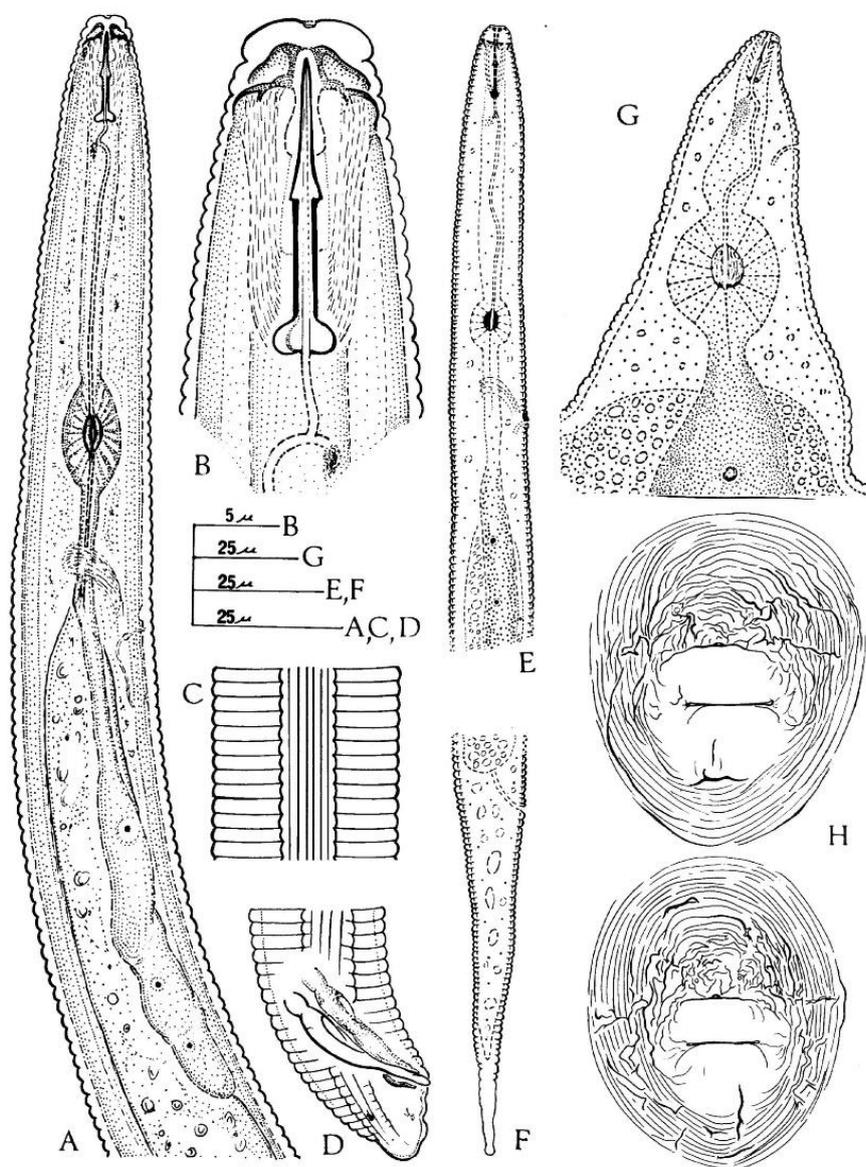


Fig. 1: *Meloidogyne graminicola*. A-D: maschio; A: regione faringea; B: regione anteriore; C: campi laterali; D: regione caudale; E-F: J2. E: regione faringea; F: regione caudale; G: regione anteriore di una femmina matura; H: impronta perineale (after Mulk, 1976)

Identificazione molecolare:

Al momento non c'è un protocollo diagnostico preciso, poiché i più comuni marcatori del DNA (18S rRNA, D2-D3 di 28S rDNA, ITS e mtDNA come COI e COII-16SrRNA) non possono distinguere facilmente *M. graminicola* da alcune specie strettamente correlate. Per maggiori informazioni, fare riferimento a Bellafiore et al., 2015, Htay et al., 2016; Mattos et al., 2019.

Bibliografia

- Bellafiore S, Jouglu C, Chapuis E, Besnard G, Suong M, Vu PN, De Waele D, Gantet P & Xuyen Ngo Thi (2015) Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. *Comptes rendus biologies* 338, 471-483.
- Bridge J & Page SJ (1982) The rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on deep water rice (*Oryza sativa* subsp. *indica*). *Revue de Nématologie* 5(2), 225-232.
- Bridge J & Starr JL (2007) *Plant nematodes of agricultural importance: A color handbook*. Academic Press, San Diego.
- Coolen WA (1979). Methods for extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. In F. Lamberti & C. E. Taylor (Eds.), *Root-knot nematodes (Meloidogyne species). Systematics, biology, and control* (pp. 317–329). New York: Academic Press.
- Fanelli E, Cotroneo A, Carisio L, Troccoli A, Grosso S, Boero C, Capriglia F, De Luca F (2017) Detection and molecular characterization of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* in Italy. *European Journal of Plant Pathology* 149, 467-76.
- Fanelli E, Gaffuri F, Troccoli A, Sacchi S, De Luca F. (2022) New occurrence of *Meloidogyne graminicola* (Nematoda: Meloidogyninae) from rice fields in Italy: Variability and phylogenetic relationships. *Ecology and Evolution* 12(9), e9326.
- Golden AM & Birchfield W (1965). *Meloidogyne graminicola* (Heteroderidae), a new species of root-knot nematode from grass. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 32, 228–231.
- Htay C, Peng H & Huang W (2016) The development and molecular characterization of a rapid detection method for rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*). *European Journal of Plant Pathology* 146, 281-291.
- Mattos VS, Mulet K, Cares JE, Gomez GM, Fernandez D, Grossi de Sá M, Carneiro RMDG & Castagnone-Sereno P (2019) Development of diagnostic SCAR markers for *Meloidogyne graminicola*, *M. oryzae*, and *M. salasi* associated with irrigated rice fields in Americas. *Plant Disease* 103, 83-88.
- Mulk MM (1976) *Meloidogyne graminicola*. *C.I.H. Descriptions of plant-parasitic Nematodes* 6(4), 1-7.
- EPPO (2013) EPPO Standard PM 7/119 (1). Nematode extraction. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 43, 471-495.
- Sacchi S, Torrini G, Marianelli L, Mazza G, Fumagalli A, Cavagna B, Ciampitti M, Roversi PF. (2021) Control of *Meloidogyne graminicola* a Root-Knot Nematode Using Rice Plants as Trap Crops: Preliminary Results. *Agriculture* 11(1),37.

- Torrini G, Roversi PF, Cesaroni CF, Marianelli L (2020) Pest risk analysis of rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) for the Italian territory. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 50, 330-339.
- Yik CP & Birchfield W (1979) Host studies and reactions of rice cultivars to *Meloidogyne graminicola*. *Phytopathology* 69(5), 497-499.