





ト W N N N N N N N N

Giovedì 24 maggio 2012

- **9.00** Saluti dell'On. Angela Birindelli, Assessore alle Politiche Agricole della Regione Lazio e altre autorità
- **9.30** O. Cacioppo: Introduzione al Convegno
- **10.00 Sessione 1** La malattia in Italia e nel mondo Presiede C. Fideghelli
- **10.05** G. Blasi, direttore Dipartimento delle politiche competitive del mondo rurale e della qualità del MiPAAF *La legislazione italiana*
- **10.35** M. De Santis, direttore COSVIR XI MiPAAF *La diffusione della malattia in Italia e nel mondo*
- **11.05** E. Macchi, CSO Chiesuol del Fosso (Fe) Le ricadute sulle produzioni e sul commercio
- 11.35 Discussione
- 11.45 Caffè

M Z O I S S M N

12.00 SESSIONE 2 *Biologia, epidemiologia e diagnosi Presiede G. Cipriani,* CRA-FRU Roma

- **12.05** F. Spinelli, I. Donati, A. Cellini, G. Buriani, J. Vanneste, G. Tacconi, G. Costa Università di Bologna, CRA-GPG Fiorenzuola d'Arda, New Zealand I.P.F.Res. *Aspetti biologici ed epidemiologici*
- **12.35** S. Loreti, A. Gallelli, S. Talocci, N. Pucci, A. L'Aurora, CRA-PAV, Roma *Metodi di diagnosi di Pseudomonas syringae pv. actindiae da materiale sintomatico e asintomatico di actinidia*

Comunicazioni

- 13.05 P. Minardi, S. Ardizzi, C. Lucchese, U. Mazzucchi, Università di Bologna Pseudomonas syringae pv. actinidiae: colonizzazione della pianta ospite
- 13.20 Pausa pranzo
- **15.00** G. Tacconi, G. Vittone, CRA-GPG Fiorenzuola d'Arda, CRESO Studio sulla diffusione in pianta asintomatica di Pseudomonas syringae pv actinidiae via PCR
- **15.15** G. Tacconi, F. Spinelli, CRA-GPG Fiorenzuola d'Arda, Università di Bologna *Monitoraggio via PCR della diffusione di Pseudomonas syringae pv actinidiae in frutteto neo-infetto ed effetto della capitozzatura*
- M. Renzi, P. Copini, A.R. Taddei, A. Rossetti, L. Gallipoli, A. Mazzaglia, G.M. Balestra, Università della Tuscia, Università di Wageningen (Olanda)
 Cancro batterico dell'actinidia: strategie d'infezione e
 - Cancro batterico dell'actinidia: strategie d'infezione e reazioni delle piante di Actinidia spp.
- 15.45 Ferrante P., Fiorillo E., Marcelletti S., Marocchi F., Mastroleo M., Simeoni S., Scortichini M., CRA-FRU Roma, Apofruit Italia Relazione tra parametri ambientali e comparsa dell'epidemia di Pseudomonas syringae pv. actinidiae in Italia e ciclo della malattia su Actinidia deliciosa e A. chinensis
- 16.00 Discussione



- **16.10 SESSIONE 3** *Diversità genetica e patogeneticità del PSA Presiede L. Varvaro*, Università della Tuscia
- **16.15** M. Scortichini, CRA-FRU Roma *Il genoma di Pseudomonas syringae pv. actinidiae:* patogenicità, virulenza ed adattamento ambientale
- 16.45 A. Mazzaglia, D.J. Studholme, M.C. Taratufolo, R. Cai, N.F. Almeida, T. Goodman, D.S. Guttman, B.A. Vinatzer, G.M. Balestra Università della Tuscia, Università di Exeter (UK), Virginia Tech. (USA), Università del Mato Grosso do Sul (Brasile), Università di Toronto (Canada)

 Il genoma di Pseudomonas syringae pv. actinidiae: acquisizioni per la caratterizzazione molecolare delle principali popolazioni

Comunicazioni

- 17.15 G.M. Balestra, M.C. Taratufolo, B.A. Vinatzer, A. Mazzaglia
 Università della Tuscia, Virginia Tech. (USA)
 Riconoscimento molecolare di Pseudomonas syringae pv. actinidiae
 e contemporanea attribuzione a popolazioni del patogeno di
 differente provenienza e grado di virulenza tramite multiplex-PCR
- 17.30 G. Cipriani, M. Terlizzi, D. Bevilacqua, A. Di Cintio, T. Rosato, S. Bompard, A. Sartori, CRA-FRU Roma La selezione di genotipi tolleranti a PSA di A. chinensis e A. deliciosa presso CRA-FRU
- 17.45-18.00 Discussione

出るのでは出る

Venerdi 25 maggio 2012

- 9.00 **S**ESSIONE 4 *Strategie di contenimento*
 - Presiede U. Palara, SOI Frutticoltura
- 9.05 G. Costa, I. Donati, F. Spinelli, S. Graziani, G. Vittone, R. Onorato, V. Bucci, G. Donati, F. Pelliconi, Università di Bologna Ruolo delle tecniche agronomiche sul cancro batterico dell'actinidia
- **9.35** M.L. Gullino, A. Brunelli, G. Vittone, Università di Torino, Università di Bologna, CRESO La difesa da Pseudomonas syringae pv. actinidiae

Comunicazioni

- 10.05 R. Bianconi, L. Gallipoli, P. Laranci, G. Tramontana, C. Belli, G.M. Balestra Università della Tuscia, Terrasystem srl

 Tecniche non invasive di monitoraggio del cancro batterico dell'actinidia (Psa) mediante dati telerilevati multispettrali: Progetto SIMBAKI Regione Lazio
- 10.20 G.M. Balestra, A. Mazzaglia, L. Gallipoli, M. Renzi, M.C. Taratufolo, A. Quattrucci, A. Anselmi, A. Ercolani

 Strategie di contemineto di Pseudomonas syringae pv. actinidiae:

 i risultati ad oggi conseguiti dall'Università degli Studi della Tuscia

Iniziative Regionali

- **10.35** A. Bianchi, Servizio Fitosanitario Regione Lazio *Le iniziative della Regione Lazio*
- **11.00** C. Morone, G. Michelatti, Regione Piemonte Settore Fitosanitario *Le strategie di contenimento di P.s.a. in Piemonte*
- **11.25** A. Contessi, Servizio Fitosanitario Regione Emilia Romagna *Le iniziative della Regione Emilia Romagna*
- 11.50 M.G. Tommasini, CRPV

 Il progetto di ricerca finanziato dalla Regione Emilia Romagna
- **12.00** C. Frausin, Servizio Fitosanitario Regione Friuli Venezia Giulia *Le iniziative della Regione Friuli Venezia Giulia*
- **12.25** G. Zanin, Servizio Fitosanitario Regione Veneto *Le iniziative della Regione Veneto*
- 12.50 Discussione
- **13.00** R. Testolin, Università di Udine *Principali risultati emersi dal Convegno e prospettive per il futuro*
- 13.30 Chiusura del Convegno



COMITATO SCIENTIFICO

COMITATO ORGANIZZATORE

Carlo Fideghelli

presidente

Giorgio Balestra

Ottavio Cacioppo

Guglielmo Costa

Maria Lodovica Gullino

Stefania Loreti

Marco Scortichini

Emilio Stefani

Raffaele **Testolin**

Graziano Vittone

Ottavio Cacioppo

presidente

Enrico Barcella

Rocco Barone

Francesco Baroncini

Carlo Fideghelli

Carmelo Mennone

Alvaro Morganti

Ugo Palara

Mario **Prova**

CONTATTI

Carlo Fideghelli

carlo.fideghelli@entecra.it

Tel. 06 79348110

Fax 06 79348160

Mobile 328-2490864

CONTATTI

Ottavio Cacioppo

ottaviocacioppo@gmail.com

Mobile 348-3313812



Si ringraziano

VIVAI ACTINIDIA KIWIPLANTS
FRUIT CONTROL EQUIPMENTS

GRENA S.R.L.

DAL PANE VIVAI

AGRISYSTEM

APOFRUIT

APOCONERPO

INTRACHEM

ARMA

CONVIVIVAI

COMITATO PER LA TUTELA IGP KIWI LATINA

24-25-26 MAGGIO 2012 **ESPOSIZIONE SPONSOR**



CONVEGNO NAZIONALE SULLA BATTERIOSI DELL'ACTINIDIA

(Pseudomonas syringae pv. actinidiae)

Latina 24-25 Maggio 2012

Riassunti delle relazioni e comunicazioni

Introduzione al Convegno

OTTAVIO CACIOPPO già Capo dell'Ispettorato Agrario della Provincia di Roma

Nel 2008 gli actinidieti della specie *A. chinensis* (Hort 16 A e Jintao) della provincia di Latina furono colpiti da una forma molto aggressiva di batteriosi da *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae (Psa). Questa batteriosi fu segnalata per la prima volta nella stessa Provincia nel 1993 (Scortichini, Simeoni, 1993). Nel 1989, in Provincia di Roma, era stata segnalata, per la prima volta, la batteriosi da *Pseudomonas viridiflava* (Cacioppo, Scortichini, 1990) sulla cultivar Hayward.

Dal 2008 in poi, il Psa ha interessato, seppure in misura minore rispetto alle varietà di *A. chinensis*, anche le cultivar della specie *A. deliciosa*.

Prima del 2008 il batterio Psa, così come lo *P. viridiflava*, non ha causato danni degni di nota (lievi avvizzimenti di rami e fiori con emissione di essudati), mentre, a partire da quell'anno ed in misura crescente, i danni hanno assunto carattere di estrema gravità. Si stima che 750 ettari di actinidieti di Hort 16 A (600/ha) e Jintao (150/ha) siano stati capitozzati sotto il punto d'innesto od estirpati. Nel primo caso per recuperare la cultivar Hayward o altra varietà di *A. deliciosa* utilizzate come portinnesto.

Per avere un'idea delle dimensioni delle per-

dite subite a carico della Hort 16 A basti ricordare che, nel 2009, la produzione di 760 ha, esistenti in Provincia, è stata di 15 mila tonnellate, con una PLV di 15 milioni di euro e che nel 2011 la produzione è scesa drasticamente a 3-4 mila tonnellate.

Molti suggerimenti agronomici per affrontare la malattia, come la capitozzatura delle piante e l'asportazione dei tralci e delle branche infette, non hanno dato risultati positivi significativi. Anche i numerosissimi incontri tecnici, seminari, relazioni che si sono tenuti e la presentazione di prodotti che, nelle dichiarazioni dei relatori, avrebbero dovuto contenere le perdite causate dalla batteriosi non hanno dato, al momento, risultati univoci.

Gli actinidicoltori, oltre a subire le perdite produttive e sostenere spese aggiuntive, si sono trovati disorientati e confusi, incapaci di adottare una strategia comune per il controllo della fitopatia.

La superficialità e l'improvvisazione che hanno spesso accompagnato l'affrettata immissione in commercio di prodotti chimici dichiarati e registrati come "miracolosi toccasana" contro la terribile avversità hanno provocato delusione e rabbia tra gli actinidicoltori.

Nonostante ciò, si deve rilevare che la ricerca

14



effettuata sul territorio nazionale negli ultimi anni ha prodotto importanti risultati, sia in termini di conoscenze di base sul patogeno che come ricadute applicative.

Sul territorio è possibile trovare esempi di actinidieti vicini tra loro, ma contraddistinti da una diversa gestione del frutteto e della malattia, nei quali è riscontrabile una diversa incidenza della batteriosi.

In un simile contesto è nata l'idea di promuovere un convegno nazionale allo scopo di

raccogliere le esperienze dei maggiori studiosi italiani e presentare i risultati, molto attesi, di tali ricerche avviate, con tanti sacrifici e scarsi contributi finanziari, dopo l'esplosione della malattia che, dalla provincia di Latina, si è rapidamente diffusa in tutte le regioni più importanti di coltivazione. Si auspica così di fare chiarezza sullo stato dell'arte e di poter mettere a punto una strategia condivisa per combattere la fitopatia con la quale si dovrà convivere, verosimilmente, ancora a lungo.





Sessione 2 Biologia, epidemiologia e diagnosi

Aspetti biologici ed epidemiologici

Francesco Spinelli¹, Irene Donati¹, Antonio Cellini¹, Giampaolo Buriani¹, Joel Vanneste², Gianni Tacconi³, Guglielmo Costa¹

- 1: Dipartimento di Colture Arboree, Alma Mater Studiorum- Università di Bologna Viale Fanin 46, 40127 – Bologna
- 2: The New Zealand Institute for Plant & Food Research Ltd. Ruakura Research Centre, Private Bag 3123, Hamilton 3240 New Zealand
- 3: CRA-GPG. Via S. Protaso, 302, CAP I-29017 Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia. gianni.tacconi@entecra.it

Pseudomonas syrinage pv actinidiae (Psa) infetta, pur se con gravità della sintomatologia differente, tutte le specie del genere Actinidia comprese l'A. deliciosa e l'A. chinensis, che sono quelle maggiormente coltivate. Nonostante il forte impatto economico, a tutt'oggi, le conoscenze scientifiche riguardanti questa patologia sono ancora incomplete. Al fine di sviluppare efficaci e sostenibili strategie di intervento per ridurre i danni causati dalla Psa è cruciale conoscere la biologia del patogeno, i meccanismi di patogenesi, l'epidemiologia della malattia e le risposte della pianta all'infezione.

Lo scopo di questo lavoro è riesaminare e presentare in maniera organica le conoscenze attuali sull'epidemiologia del patogeno e in particolare su:

- come il patogeno penetri all'interno della pianta e quale sia l'importanza relativa dei diversi siti di infezione
- come il patogeno colonizzi i diversi tessuti della pianta
- come il patogeno migri all'interno della pianta
- come il patogeno si diffonda da una pianta all'altra
- come e per quanto tempo il patogeno

sopravviva nell'ambiente

 quale sia l'importanza delle tecniche agronomiche e delle attività umane nella diffusione della malattia

In parallelo all'analisi della letteratura sull'argomento, sono sati eseguiti diversi esperimenti per chiarire i principali aspetti del processo infettivo della Psa. Le prove sono state inizialmente condotte tramite inoculazione sperimentale, e, successivamente, in condizioni naturali. Le piante, mantenute in serra in condizioni controllate, sono state inoculate con diversi ceppi del patogeno marcati GFPuv, una proteina autofluorescente.

L'infezione e la colonizzazione dei tessuti dell'ospite sono state monitorate, in tempo reale e in vivo, tramite stereo microscopia a fluorescenza e microscopia confocale (CLSM). Inoltre, il batterio è stato reisolato dai tessuti infetti.

Nelle prove in condizioni di campo, la colonizzazione dei tessuti della pianta è stata invece studiata esclusivamente tramite re isolamento del patogeno e sua identificazione molecolare.

La Psa può penetrare attraverso qualsiasi apertura naturale od artificiale. Un ruolo primario sembra essere giocato dalle aperture stomatiche e dai nettaroidi fiorali. L'infezione



tramite gli stomi causa, a temperature moderate e, in condizioni di alta umidità, le maculature foliari. E' però interessante notare, come queste possano anche essere sintomi secondari, non dovuti ad un'infezione diretta della lamina foliare attraverso gli stomi. In quest'ultimo caso, le lenticelle possono essudare piccole goccioline composte da aggregati batterici che hanno probabilmente un ruolo nel diffondere il batterio da una pianta all'altra.

I fiori rappresentano un altro importante sito di infezione. Il batterio può colonizzare lo stigma dove raggiunge un alta densità di popolazione, da lì, o penetrare direttamente nel canale stilare o migrare ai nettaroidi. I fiori infetti, pur se allegati, generalmente cascolano prematuramente e non generano frutto. Non di meno, questo tipo di infezione spesso diviene sistemica, in quanto il patogeno migra il pedicello fiorale fino al germoglio prima della caduta del fiore stesso.

Non è ancora del tutto chiaro come il patogeno penetri nei fiori maschili. E' però interessante notare come, in piante maschili infette, i patogeno possa migrare acropetamente fino a raggiungere le antere, generando così polline infetto.

Gli esperimenti condotti con polline infettato sperimentalmente e con polline infetto prelevato in campo hanno dimostrato come questo possa essere un importante vettore per la malattia. In mancanza di dati organici sul ruolo dell'impollinazione artificiale, si ipotizza che questa possa essere stata una delle cause primarie della rapida diffusione della malattia in diversi areali produttivi.

In condizioni sperimentali, anche le lenticelle possono essere un possibile sito di infezione. Le lenticelle giovani sono costituite da un ammasso protendente di stomi. Col passare del tempo tendono ad appiattirsi e a suberificare. Le lenticelle adulte, infine, sono costituite da strati sovrapposti di tessuto morto. La probabilità biologica di infezione tramite le giovani lenticelle è paragonabile a quella sto-

matica, mentre, nelle lenticelle adulte risulta piuttosto bassa. Le lenticelle rivestono comunque un ruolo importante nel ciclo della malattia. Infetta esse, presentano una minore resistenza meccanica rispetto ad altri tessuti, sono uno dei principali organi da cui fuoriesce l'essudato batterico che rappresenta la fonte primaria di inoculo per il ciclo della malattia.

Per quel che riguarda le ferite causate dall'attività umana, la raccolta e la potatura rappresentano le fase di maggior rischio. Pertanto, si consiglierebbe di limitare e concentrare quanto più possibile la potatura. È, inoltre, interessante notare come i tagli di potatura, in condizioni sperimentali, e, soprattutto in inverno, possano essere una via di penetrazione per oltre un mese dopo la loro esecuzione.

È stato dimostrato come la Psa possa sopravvivere relativamente a lungo sia in acqua, sia sulla lettiera del frutteto (i.e. foglie, residui di potatura). Inoltre Psa è stata isolata anche nell'acqua di irrigazione di frutteti infetti. Ciò nonostante, l'infezione attraverso il sistema radica, pur se possibile, rimane di scarsa o nulla importanza biologica.

Infine, nonostante le ferite causate dall'ovoposizone delle cicale possano essere un importante sito per l'infezione, al momento non è noto alcun vettore. Inoltre la Psa non sembra sopravvivere a lungo su altre essenze vegetali oltre alle piante del genere Actinidia. Numerosi sono gli aspetti ancora da chiarire nell'epidemiologia di questa malattia. Tra i molti, ricordiamo:

- quali siano i fattori ambientali e fisiologici che inneschino lo sviluppo dei sintomi
- quale sia l'influenza della giunzione tra nesto e portainnesto nella migrazione del patogeno
- in quali organi e tessuti il batterio rimanga latente
- quale sia l'influenza dell'età della pianta sulla suscettibilità e sullo sviluppo della sintomatologia

- ...



Metodi di diagnosi e rilevamento di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* da materiale sintomatico e asintomatico di actinidia

Stefania Loreti, Angela Gallelli, Silvia Talocci, Nicoletta Pucci, Alessia L'Aurora

CRA - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, via C. G. Bertero 22, - 00156 Roma

Il cancro batterico dell'actinidia, causato da Pseudomonas syringae pv. actinidiae (Psa), si è manifestato con un'improvvisa ondata di infezione nelle principali aree di coltivazione di questa specie determinando gravi danni a carico delle cultivar a polpa gialla (Actinidia chinensis) e verde (A. deliciosa), al punto da essere stata definita come una vera e propria pandemia (Scortichini et al., 2012). L'effettiva disponibilità di strumenti diagnostici validi rappresenta il presupposto per un adeguato controllo di questa malattia al fine di proteggere il territorio dall'ingresso o dalla disseminazione del batterio. Negli ultimi tre anni c'è stato un grande impulso sia allo sviluppo di metodi molecolari basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR), attraverso la messa a punto di saggi di PCR specifica per Psa, sia alle metodologie più convenzionali, attraverso l'individuazione, ad esempio, di terreni semi-selettivi in grado di favorire il buon esito dell'isolamento diretto.

Al momento dello scoppio epidemico della malattia, nel 2007-2008, la diagnosi di Psa poteva avvalersi di metodi di convenzionali come l'isolamento su terreno generico, l'identificazione delle colture pure mediante test biochimici, nutrizionali, fisiologici, la patogenicità sull'ospite (Takikawa *et al.*, 1989), il sequenziamento di 16S rDNA e 16S–23S ITS rDNA (Balestra *et al.*, 2009) e infine la PCR di Koh and Nou (2002), rivelatasi, tuttavia, aspecifica, non consentendo di distinguere Psa da altre Pseudomonadi (Rees-George et al., 2010).

La messa a punto di un protocollo di diagno-

si molecolare deve *in primis* tenere conto della biodiversità presente all'interno della stessa specie e delle correlazioni filogenetiche con altre specie batteriche, al fine di ridurre il rischio di risultati falsi positivi o falsi negativi. Di fatto l'isolamento, il rilevamento e l'identificazione di Psa da materiale sintomatico sono di facile esecuzione.

L'applicazione di saggi tradizionali (es. idrolisi dell'esculina, fluorescenza su substrato B di King), può facilitare la cernita di colonie Psasospette (o *Psa-like*) ottenute dall'isolamento, e successivamente analizzate con tecniche di PCR specifica per la loro identificazione (Kou and Nou, 2002; Rees-George *et al.*, 2010; Gallelli *et al.*, 2011a). Le procedure di Kou and Nou (2002) e Rees-George *et al.*, (2010) sono utili per un'identificazione preliminare, poichè possono determinare dei falsi positivi con la specie *P.s.* pv. *theae*.

L'identificazione definitiva delle colonie sospette può avvalersi di metodi di PCR specifica, come la duplex-PCR (Gallelli *et al.*, 2011a) che distingue Psa dalle pseudomonadi correlate (Gallelli *et al.*, 2011a; Gallelli *et al.*, 2011b) o attraverso l'applicazione della rep-PCR (primer BOX o ERIC) in grado di produrre profili genomici caratteristici (Ferrante e Scortichini, 2009; Mucini *et al.*, 2011).

Da ultimo può essere verificata la patogenicità dei ceppi attraverso l'inoculazione artificiale di piantine di actinidia (Minardi v, 2011; Everett *et al.*, 2011).

La duplex-PCR (Gallelli *et al.*, 2011a) può essere utilizzata inoltre per la diagnosi di Psa direttamente da legno, foglie, fiori, piccioli,

18



frutti e polline infetti (Gallelli *et al.*, 2011a; Gallelli *et al.*, 2011b; Scortichini et al., 2011). Importante è applicare più metodiche in parallelo, siano esse di tipo molecolare o convenzionale. Ciò è tanto più vero per l'analisi di campioni asintomatici che presuppongono la presenza di una bassa carica di infezione del patogeno. Sono state recentemente pubblicate delle procedure per il rilevamento di Psa da frutti e rami asintomatici (Gallelli *et al.*, 2011b; Minardi *et al.*, 2011), nonché dal polline (Vanneste *et al.*, 2011; Stefani e Giovanardi, 2011; Gallelli *et al.*, 2011b).

Al fine di uniformare le procedure per il rilevamento del patogeno applicabili dai vari laboratori presenti sul territorio nazionale è stato organizzato un ring-test che ha coinvolto cinque laboratori afferenti ai Servizi Fitosanitari (Emilia Romagna, Piemonte, Friuli Venezia Giulia, Sardegna, Trentino) e due Università (Balestra et al., 'La Tuscia' di Viterbo e Minardi et al., 'Alma Mater' di Bologna).

Attraverso l'elaborazione dei parametri di specificità, sensibilità, accuratezza delle procedure prese in considerazione – isolamento su terreno generico e semi-selettivo, PCR specifiche (Rees-George *et al.*, 2010; Gallelli*et al.*, 2011), rep-PCR – è possibile evidenziare i limiti e le potenzialità di ciascuna metodologia. Inoltre, dalla Nuova Zelanda si apprende che stanno sviluppando un metodo per l'identificazione e la distinzione di ceppi di Psa virulenti (Psa-V) da ceppi di Psa 'low virulent' (Psa-LV), afferenti a due popolazioni del batterio riscontrate ad oggi in Nuova Zelanda (http://www.kvh.org.nz).

Parallelamente, presso il CRA-PAV è in corso di sviluppo una metodica di real time-PCR in grado di identificare gli isolati di Psa responsabili dei recenti attacchi epidemici. Infine il recente sequenziamento del genoma di tre ceppi del batterio (Marcelletti *et al.*, 2011) potrà fornire nuovo impulso anche allo sviluppo di metodiche diagnostiche specifiche e sensibili.

Bibliografia citata

Balestra, G.M., Mazzaglia, A., Quattrucci, A., Renzi, M. and Rossetti, A. (2009) Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australas. Plant Pathol.*4, 34–36.

Everett, K.R., Taylor, R.K., Romberg, M.K., Rees-George, J., Fullerton, R.A., Vanneste, J.L. and Manning, M.A. (2011) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Aust. Plant Dis. Notes*, 6, 67–71. Ferrante, P. and Scortichini, M. (2009) Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. *J. Phytopathol*. 157, 768–770.

Gallelli, A., L'Aurora, A. and Loreti, S. (2011a) Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols. *J. Plant Pathol.* 93, 425–435.

Gallelli, A., Talocci, S., L'Aurora, A. and Loreti, S. (2011b) Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of bacterial canker of kiwifruit, from symptomless fruits, and twigs, and from pollen. *Phytopathol. Medit.* 50, 473–483.

Koh, J.K. and Nou, I. (2002) DNA markers for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae. Mol. Cells*, 13, 309–314.

Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., Firrao, G. and Scortichini, M. (2011) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* draft genome comparisons reveal strain-specific features involved in adaptation and virulence to *Actinidia* species. *PLoS ONE*, 6, e27297. Minardi, P., Lucchese, C., Ardizzi, S. and Mazzucchi, U. (2011) Evidence against the presence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in fruits of *Actinidia* orchards affected by bacterial canker. *J. Plant Pathol.* 93 (Supplement 4), 43.

Mucini S., Biondi E., Lucchese C., Mazzucchi U. e Minardi P. (2011) "Bacterial Canker of



Kiwifruit (*Actinidia* spp.): Preliminary Bacteriological Studies in Asymptomatic Plant Materials in Northeastern Italy". *Acta Horticulturae* 913: 509-516.

Rees-George, J., Vanneste, J.L., Cornish, D.A., Pushparajah, I.P.S., Yu, J., Templeton, M.D. and Everett, K.R. (2010) Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S–23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathol.* 49, 453–464.

Scortichini M., S. Marcelletti, P. Ferrante, M. Petriccione and G. Firrao, 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae:* a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Mol. Plant Pathol.* (DOI: 10.1111/j.1364-3703.

2012.00788.x)

Stefani, E. and Giovanardi, D. (2011) Dissemination of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through pollen and its epiphytic life on leaves and fruits. *Phytopathol. Medit.* 50, 501–505.

Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S. and Goto, M. (1989) *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 55, 437–444.

Vanneste, J.L., Giovanardi, D., Yu, J., Cornish, D.A., Kay, C., Spinelli, F. and Stefani, E. (2011b) Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in pollen samples. *N. Z. Plant Protect.* 64, 246–251.



COMUNICAZIONI

Pseudomonas syringae pv. actinidiae: colonizzazione della pianta

P. MINARDI¹, S. ARDIZZI², C. LUCCHESE² E U. MAZZUCCHI²

- 1: Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie DSMVet, Università di Bologna, via Tolara di Sopra 50, 40064, Ozzano Emilia (BO).
- 2: Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali DiSTA, Università di Bologna, viale Fanin 42, 40127, Bologna.

Introduzione

Pseudomonas syringae pv. actinidiae (Psa), agente del cancro batterico dell'actinidia (CBA), appartiene alla specie *P. syringae* e verosimilmente rappresenta una popolazione batterica che, dotandosi di appropriati fattori di virulenza, si è patoadattata all'actinidia sotto l'effetto di una pressione selettiva di diversi fattori, naturali e antropici (Stavrinides *et al.*, 2008).

In letteratura è noto che *Pseudomonas syringae* può albergare all'interno di piante adulte allo stato endofita senza indurre alcun sintomo (Crosse, 1959; Cameron, 1970; Hirano & Hupper, 2000).

In Italia, recenti studi hanno evidenziato che Psa può essere isolato da tronchi e germogli di piante asintomatiche di actinidia (Galelli *et al.*, 2011).

Analogamente a quanto è stato evidenziato per *P. syringae* pv. *syringae* (Pss), agente del cancro delle drupacee, Psa potrebbe causare infezioni sistemiche asintomatiche o ad espressione differita. Per saggiare questa ipotesi è stato allestito un impianto sperimentale di *Actinidia chinensis* cv. Hort16A per studiare le modalità di colonizzazione della pianta ospite da parte di Psa.

Materiali e metodi

Piante ospiti. 60 piante di *A. chinensis* cv. Hort16A di due anni allevate in vaso all'aperto in due doppie file.

Contaminazione batterica delle piante.

Una sospensione di Psa DiSTA8181 isolato nel 2009 da Actinidia chinensis cv. Hort16A, resistente alla rifampicina ed con il gene per la GFP (Psa::gfp-Rif^{res}, Minardi et al., non pubblicato) è stata calibrata per ottenere ≈ 1x108 UFC/ml. L'uso del ceppo marcato consente di distinguere la presenza di eventuali ceppi di Psa pre-esistenti o introdotti successivamente nelle piante in esame. Il 7-10-2010, 40 piante sono state inoculate con Psa::gfp-Rif^{res}. In ciascuna pianta, i germogli da inoculare sono stati selezionati e siglati. Ciascun germoglio è stato tagliato trasversalmente a 40 cm dall'inserzione sul fusto. Sulla superficie di taglio sono stati depositati 20 µl di sospensione batterica e subito dopo l'apice del germoglio è stato coperto con una busta di plastica per 24 ore. In 9 piante di controllo scelte a caso all'interno delle file, sono state effettuate le stesse operazioni, ma sui germogli tagliati sono stati depositati 20 µl di acqua distillata sterile.



Progressione dei cancri sui germogli inoculati. Dopo l'inoculazione, i primi rilievi dei sintomi indotti da Psa sono stati fatti a partire dalla primavera del 2011, circa ogni 15 giorni, fino ad aprile 2012. Per ogni pianta è stata misurata la lunghezza (mm) dei cancri presenti nei germogli trattati e in quelli di controllo.

Analisi microbiologiche delle piante sintomatiche. Le piante con sintomi evidenti di CBA sono state sacrificate in toto per le analisi di laboratorio. Segmenti di fusto di 20 cm fino al colletto della pianta sono stati prelevati in campo ed in laboratorio ogni segmento è stato sterilizzato con NaClO diluito 1/4 (v/v) sotto vuoto parziale per 10 min. Da ciascun campione sono stati preparati frammenti di 1 cm riposti in beuta con 150 ml PBS e lasciati 30 min in agitatore. Il liquido di lavaggio è stato centrifugato a 8000 rpm per 20 min a 4°C. Il pellet risospeso è stato centrifugato 10 min a 11000 q. Il pellet finale risospeso in acqua distillata sterile e due sue diluizioni decimali sono state: a) inseminate su piastre di KBC (Mohan e Schaad, 1987) con Rif⁵⁰ riposte a 27°C per 48-72 ore; b) conservate a -20°C per successiva analisi PCR (Rees-George et al., 2010); c) osservate al microscopio a fluorescenza per rilevare l'espressione del gene *qfp*. Per ulteriori isolamenti in altri substrati (ad es. KB+Km50 Rif50) al volume di ciascun campione rimanente è stato aggiunto glicerolo 30% per la conservazione a -80°C.

Saggi di laboratorio. Tutti i campioni sono stati saggiati per:

- 1) <u>Isolamento.</u> Le analisi batteriologiche sono state effettuate su substrati selettivi (NSA-SAM, KBC, KBC+Rif50, KBC+Km⁵⁰ Rif⁵⁰).
- 2) <u>Test di patogenicità del ceppo Psa::gfp-Rif</u>res re-isolato è stato effettuato in piantine di A. deliciosa cv. Hayward (clone 8) (Minardi *et al.*, 2011).
- 3) <u>Capacità del ceppo Psa::gfp-Rif^{res} re-isolato di indurre HR</u> è stata verificata in foglie di

piante di tabacco White Burley. 4) <u>Analisi PCR.</u> (Rees-George *et al.*, 2010).

Risultati e conclusioni

Le lunghezze dei cancri sono state misurate a partire da maggio 2011 a maggio 2012. Per ogni data sono state calcolate le medie delle lunghezze dei cancri sui germogli trattati e su quelli di controllo. Il confronto tra i due campioni ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le loro medie e le loro distribuzioni. In ciascuna data sono state acquisite le temperature massime e minime (ARPA). L'andamento della progressione dei cancri sarà correlato con le temperature registrate nei periodi dei rilievi.

Nei germogli trattati la lunghezza media dei cancri è cresciuta linearmente da maggio a novembre 2011, con andamento parabolico tra novembre e inizio aprile 2012 e con incrementi quasi nulli o minimi tra novembre e fine gennaio 2012; l'incremento delle lunghezze ha iniziato a manifestarsi chiaramente dai primi di marzo 2012 in poi.

Questi risultati indicano che nelle nostre condizioni Psa si sia riattivato nei tessuti corticali ai primi di marzo 2012. Studiando la correlazione con le variazioni delle temperature saranno possibili informazioni più complete. Durante il 2011, i primi sintomi su fusto, foglie e fiori si sono manifestati a inizio maggio nella pianta trattata n° 7.

Il ceppo Psa::gfp-Rifres è stato reisolato con successo su substrato selettivo da frammenti provenienti dai tre germogli inoculati e fino a 40 cm dall'apice del fusto in direzione basipeta. Il risultato è stato confermato sia dalle prove *in planta* e dall'analisi PCR. In data 1-6-2011, la seconda pianta trattata a mostrare una progressione dei sintomi di CBA su fusto e foglie è stata la n° 9.

Durante i tentativi di reisolare il ceppo Psa::gfp-Rif^{res}, al termine di tutti i cicli di purificazione ed isolamenti selettivi e prima di eseguire l'analisi PCR, è stato evidenziato che dall'unico germoglio inoculato e fino a 120



cm dall'apice del fusto in direzione basipeta sono stati isolati ceppi incapaci di crescere su KBC+Km⁵⁰ Rif⁵⁰ mentre in KBC non hanno mostrato una morfologia Psa-like; non si è proceduto pertanto all'analisi PCR.

L'analisi PCR del DNA estratto dai campioni vegetali ha evidenziato la presenza di Psa::gfp-Rif^{res} nel campione estratto dal germoglio inoculato e non negli altri frammenti del fusto.

In data 17-11-2011, la terza pianta trattata in cui si è vista una progressione dei sintomi di CBA su fusto e foglie è stata la n° 20. L'analisi PCR del DNA estratto dai campioni vegetali ha evidenziato la presenza di Psa::gfp-Riffes nel campione estratto dai due germogli inoculati fino a 100 cm dall'apice del fusto in direzione basipeta. Nella stessa data anche la pianta di controllo n° 2C è stata analizzata a causa di completo disseccamento di uno dei due germogli.

Per questa pianta, l'isolamento su KBC ha prodotto numerosi endofiti Psa-*like* e non fluorescenti. Negli isolamenti su KBC+Km⁵⁰ Rif⁵⁰ è stata accertata l'assenza del ceppo Psa::gfp-Rif^{res}: trattandosi di una pianta di controllo questo risultato era atteso. L'analisi PCR degli endofiti Psa-*like* cresciuti su KBC non ha portato ad alcuna amplificazione confermando l'assenza di Psa.

L'allungamento delle necrosi non è stato pertanto attribuito al ceppo di Psa.

L'incremento dell'area necrotica nei germogli di riferimento e l'avvizzimento di uno di essi non è da attribuire ad un ceppo di Psa ma verosimilmente ad altre cause legate a fattori abiotici.

I nostri risultati indicano che a seguito di inoculazioni autunnali Psa possa sopravvivere endofita:

- 1) durante l'inverno e colonizzare attivamente i tessuti durante la seguente stagione vegetativa;
- 2) durante l'inverno successivo e riattivarsi già prima della ripresa vegetativa.

Bibliografia citata

Stavrinides J., McCann H.C., Guttman D.S. (2008). *Cellular Microbiology* 10 (2): 285-292.

Cameron H.R. (1970). *Phytopathology* 60: 1343-1346.

Crosse J.E. (1959). *Annals of Applied Biology* 47: 306-317.

Hirano S.S. & Upper C.D. (2000). *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 624-653.

Gallelli, A., Talocci, S., L'Aurora, A., Loreti, S. (2011). *Phytopathologia Medit.* 50: 473–483. Mucini S., Biondi E., Lucchese C., Mazzucchi U., Minardi P. (2011). *Acta Hort.* 913: 509-516. Minardi P. Lucchese C., Ardizzi S., Mazzucchi U. (2011). *Journal of Plant Pathology* 93: S4-43.

Mohan S. K., Schaad N. W. (1987). *Phytopathology* 77: 1390-1395.

Rees-George J. *et al.* (2010). *Plant Pathology* 59: 453-464.

Ringraziamenti

Ricerca finanziata dalla Regione Emilia-Romagna, Progetto "Cancro batterico dell'actinidia (Pseudomonas syringae pv. actinidiae): messa a punto di strategie di difesa" e dal CRPV, Progetto "Batteriosi dell'actinidia".



Studio sulla diffusione in pianta asintomatica di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* via PCR

TACCONI GIANNI¹, GRAZIANO VITTONE²

1: CRA-GPG. Via S. Protaso, 302, CAP I-29017 Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia. gianni.tacconi@entecra.it

2: CReSO. Via Falicetto, 24 Manta 12030 (CN) Italia. graziano.vittone@cresoricerca.it

Scopo

La batteriosi dell'actinidia ha la particolarità di permanere asintomatica per un periodo di tempo estremamente variabile facendo presumere sane piante in realtà già infettate. L'analisi PCR è una tecnica estremamente sensibile ampiamente utilizzata anche nella diagnostica vegetale che permette di rilevare la presenza di agenti patogeni anche in piante asintomatiche. Nel caso specifico sono stati analizzati diversi tessuti, sia sintomatici che a sintomatici, provenienti da pianta infetta: lo scopo del lavoro è evidenziare la presenza del batterio e la sua diffusione nei tessuti asintomatici adiacenti o distali rispetto alle foglie sintomatiche, sia preesistenti che sviluppatesi successivamente all'infezione.

Materiali e metodi

Materiale vegetale

I campioni sono stati prelevati nell'agosto del 2010 da piante di actinidia cultivar Hayward dell'età di circa 20 anni provenienti da un frutteto in provincia di Cuneo. Sono state campionate foglie sia sintomatiche che asintomatiche, tralci a frutto e germogli estivi suddivisi in epidermide e tessuto legnoso, frutti ovvero buccia, polpa e columella.

Analisi molecolare

I diversi tessuti sono stati polverizzati in mortaio con azoto liquido ed il DNA è stato estrat-

to secondo le indicazioni del kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen).

L'analisi PCR è stata effettuata con primer specifici per Pseudomonas syringae pv. actinidiae PsaF1e PsaR2, PsaF3 e PsaR4 (Rees-George, et al. 2010) secondo il seguente protocollo: Go-Taq-buffer (Promega), DMSO 5%, dNTPs 0.2mM, MqCl2 1.5mM, primer 05uM, Go-Taq (Promega) 0.1U, DNA 40nq, acqua fino a 20ul. Condizioni di reazione: denaturazione iniziale 3 min. 94°C, 45 cicli a 94°C 15 sec., 60°C 15 sec, 72°C 30 sec, estensione finale 72°C 15 min. Come controllo positivo è stato utilizzato DNA batterico, come controllo negativo è stato utilizzato DNA estratto da tessuto sano. La bontà dell'estrazione di DNA e della reazione di amplificazione è stata confermata con l'utilizzo di primer NEST specifici per geni tessuti vegetali (gene tRNA-Leu e trnL-trnF intergenic spacer cloroplastico).

Risultati e discussione

Il protocollo riportato in letteratura è stato validato anche in situazioni di campo su diversi tipi di tessuto. Nell'anno 2011 inoltre sono stati analizzati campioni sintomatici, asintomatici e sani con confronto in parallelo della analisi molecolare e dell'isolamento microbiologico seguito da PCR su colonie batteriche, a confermare la corrispondenza dei risultati ottenibili direttamente da PCR su DNA estratto da tessuto.



Sono risultati positivi ai primers specifici per Psa: polpa del frutto, columella con semi, legno dei tralci primaverili (decorticati), legno dei tralci del 2009 (decorticati), midollo di germoglio estivo erbaceo (rigetto), epidermide del germoglio estivo, foglia adulta asintomatica. Sono risultati negativi: buccia dei frutti, epidermide tralcio 2009 ed epidermide del germoglio primaverile.

L'insieme di queste osservazioni sembra indicare che il batterio sia presente nei tessuti con maggiore afflusso di acqua ovvero i germogli estivi, emersi dopo la comparsa dei sintomi sulle foglie (indice di infezione primaria da parte del batterio), nei germogli primaverili nonché nei frutti (columella e polpa).

Il batterio è presente anche nelle foglie asintomatiche. Inoltre la presenza del batterio nei germogli estivi indica che il batterio si muove nella pianta anche durante l'estate non dando tuttavia sintomi.

Il batterio è presente anche nel legno dell'anno precedente (analisi fatta su legno scortecciato) il quale indica una sua diffusione sistemica nella pianta.

Non pare essere presenti invece sui tessuti esterni bruni quali l'epidermide del frutto e l'epidermide del tralcio fruttifero, i quali in effetti presentano tricorni morti: è presente invece sull'epidermide dei germogli estivi ancora di consistenza erbacce.

Si può supporre quindi che il batterio quindi si muova all'interno della pianta con il flusso d'acqua xilematico e si localizzasi soprattutto nei tessuti in attiva crescita e su superfici vive mentre appare assente su tessuti o superfici morte o non sufficientemente idratate.

Bibliografia

Rees-George, et al. 2010

J. Rees-George, J. L. Vanneste, D. A. Cornish, I. P. S. Pushparajah, J. Yub, M. D. Templeton and K. R. Everett. The New Zealand Institute for Plant & Food Research Ltd, PB 92169, Auckland 1142; and bPB 3123, Hamilton 3240, New Zealand. "Detection of Pseudomonas syringae pv. actinidiae using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S–23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions". Plant Pathology 59, 453–464



Monitoraggio via PCR della diffusione di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in frutteto neo-infetto ed effetto della capitozzatura

TACCONI GIANNI¹, FRANCESCO SPINELLI²

1: CRA-GPG. Via S. Protaso, 302, CAP I-29017 Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia. gianni.tacconi@entecra.it

2: Dipartimento di Colture Arboree, Alma Mater Studiorum- Università di Bologna, Viale Fanin 46, 40127 – Bologna

Scopo

Lo scopo del presente lavoro è quello studiare la diffusione all'interno della pianta del batterio a partire dalla comparsa dei primi sintomi sui rami a frutto ed in diversi punti della pianta, e di valutare l'efficienza della capitozzatura nelle risanamento di piante sintomatiche in zona a bassa pressione di malattia. La presenza del batterio è stata valutata con sistemi molecolari basate su analisi di DNA (PCR). L'analisi è iniziata dalla comparsa dei primi sintomi (febbraio 2011) e proseguita durante la ricostruzione dell'intera pianta negli anni successivi.

Materiali e metodi

Materiale vegetale

Lo studio ha preso in considerazione 4 actinidieti contigui in provincia di Verona, tutti impiantati nel 2009 con piante dello stesso lotto (eccetto uno) con cultivar Hayward e maschi Tumuri: frutteto A (700 piante in 29 filari) con fronte strada ad ovest ed l'orientamento dei filari da E-O; frutteto B (500 piante in 12 filari) ad ovest del precedente con orientamento N-S; frutteto C (24 filari) ad ovest del precedente con orientamento N-S composto per le ultime 17 file da maschi Summer Faenza; frutteto D (60 piante 1 filare) in testata a Nord del precedente piantato nel 2002. Tutti gli actinidieti sono allevati a pergoletta ad arco pendente, con protezione

antigrandine (eccetto D) e sistema d'irrigazione a microjet e scorrimento. Tutti gli actinidieti sono condotti nelle medesime condizioni dalla stessa azienda agricola e durante tutta la stagione 2010 non sono stati osservati sintomi fogliari.

Da aprile ad ottobre 2010 sono stati effettuati 9 trattamenti preventivi a base di ipoclorito di potassio. Durante la stagione vegetativa 2010 le piante perimetrali esposte ad ovest (fronte strada frutteto A) sono state colpite da grandine.

I prelievi hanno riquardato essenzialmente l'appezzamento A e sono stati effettuati alla prima comparsa dei sintomi (febbraio 2011) ed appena dopo la capitozzatura con intervalli di circa 2 mesi fino ad ottobre e nuovamente a partire dalla ripresa vegetativa in febbraio 2012. Alla comparsa dei sintomi (2011) sotto forma di essudato bianco sono stati prelevati campioni di essudato e di tralci o fusti in diversi punti della pianta: gemme presentati gli sudati, gemme su tralci frutto adiacenti, porzioni di cordone permanente e di tronco. Dopo la capitozzatura sono state prelevate porzioni di tronco e liquido linfatico. Alla comparsa di nuovi germogli sono state campionate foglie e apici sino a riposo vegetativo mentre a fine inverno sono state prelevati campioni di gemme legnose. Sono state monitorate 10 piante scelte in diversi punti dell'appezzamento: zona con basso (fila 1 pianta 13, 20, 21, fila 3 pianta 6), medio (fila 14 pianta 8) ed alto (fila 16 pianta 1, fila 17

28



pianta 5 e 11) livello di infezione ovvero numero di piante sintomatiche per filare: 0%, 50% e 100%.

Analisi molecolare:

L'estrazione di DNA totale è stata effettuata a partire da porzioni di tralcio o fusto in tutta la sezione (corteccia e legno) o di foglia tramite polverizzazione con mortaio in azoto liquido e purificazione con sistema CTAB modificato (Aldrich and Cullis 1993). L'analisi PCR è stata effettuata secondo il protocollo Rees-George (Rees-George, *et al.* 2010) modificato.

Come controllo positivo è stato utilizzato DNA estratto da pianta infetta, come controllo negativo è stato utilizzato DNA estratto da tessuto sano.

La bontà dell'estrazione di DNA e della reazione di amplificazione è stata confermata con l'utilizzo di primer NEST specifici per geni tessuti vegetali (gene tRNA-Leu e trnL-trnF intergenic spacer cloro plastico, Laube *et al.*, 2010).

Risultati e discussione

Lo studio è stato svolto in uno dei primi casi di batteriosi in provincia di Verona, in una zona senza altre fonti di inoculo nelle vicinanze: questo ha permesso di valutare l'effetto della ricostruzione delle piante capitozzate in presenza di basso o nullo potenziale di inoculo ambientale, il quale altrimenti vanificherebbe l'eventuale risanamento a causa di un reinoculo ambientale successivo all'intervento (come osservato in zone fortemente infette) I primi sintomi sono comparsi nell'appezzamento A sotto forma di esudato bianco a partire dalle gemme distali di tralci a frutto (stadio ingrossamento gemme) il 15 febbraio 2011 a partire dalle piante presenti sul fronte esterno ovest, l'andamento della comparsa dei sintomi è stato rilevato visivamente e si è rivelato prosequire lungo i filari con una velocità di circa 10 m al giorno, a partire dal filare 17 in tutte le direzioni.

Dopo 15 giorni di osservazione la zona delle piante colpite si era espansa a macchia d'olio con il 100% delle piante sintomatiche (250): a quel punto è stata effettuata la capitozzatura dell'intero appezzamento (gemma allo stadio di foglie affioranti).

Questa operazione è stata effettuata previa irrorazione con agenti di disinfezione (acido per-acetico) ed asportazione del materiale fino a 10 cm da terra effettuando l'ultimo taglio con attrezzature sterilizzata a fiamma. Le piante che presentavano sintomi all'interno del legno sottoforma di striature rossastre a meno di 1 m da terra (sul tronco) sono state estirpate completamente (in totale 30 piante). L'intero appezzamento è stato irrorato nuovamente con agenti disinfettanti ed i ceppi sono stati trattati con sospensione dei microrganismi prodotti in azienda, a partire da starter commerciale, e protetti con busta in nylon. La ferita è stata trattata ad intervalli di 7 giorni e poi con intervalli di 21 giorni con lo stesso prodotto.

La protezione è stata rimossa dopo 45 giorni. Durante tutta la stagione vegetativa sono stati effettuati trattamenti con la medesima sospensione di microrganismi ad intervalli di 21 giorni ed ogni 45 giorni durante il riposo invernale. Le piante capitozzate sono state riallevate, dalle piante estirpate sono stati riallevati in alcuni casi germogli originatesi dei residui radicali. Nel caso della pianta monitorata il nuovo germoglio è risultato negativo a PCR per tutto il periodo di osservazione. Durante la stagione 2011 non sono stati osservati sintomi su nessuna pianta ricostruita. L'analisi molecolare effettuata a partire da febbraio 2011 ha confermato la presenza di Psa nelle piante sintomatiche sia su esudati che su tessuti sintomatici. Alla comparsa dei sintomi nell'appezzamento, sulle 10 piante scelte per lo studio (alcune sintomatiche ed altre asintomatiche) sono stati prelevati campioni in diversi punti della pianta a partire dai tralci inseriti allestremità del cordone permanente sino al fusto: questo ha permesso di stimare



la velocità di movimento basipeto del batterio a partire dai tralci apicali verso il fusto in circa 15 giorni. Inoltre in alcune piante presenti nella zona di maggiore infezione è stata confermata la presenza di Psa a livello del liquido linfatico presente dopo capitozzatura, nonché sulle radici delle piante estirpate.

Ad inizio marzo 2012 sono comparsi sintomi sottoforma di esudati inizialmente al livello delle gemme di rami distali (solo su 3 piante) e successivamente nell'arco di tutto il mese a livello dei fusti, su circa il 10% delle piante: queste sono state capitozzate e igienizzate in loco senza asportarle. Alla comparsa dei primi sintomi sono stati effettuati due trattamenti igienizzanti (a base di acido per-acetico) a distanza di sette giorni e successivamente, in assenza di nuovi esudati, si è proceduto come nell'annata precedente con sospensione di microorganismi.

La presenza di esudati a livello dei fusti potrebbe indicare una infezione a partire dalla parte basale della pianta e quindi dal batterio ancora presente nell'apparato radicale. Questo potrebbe essere dovuto alla infezione antecedente la capitozzatura che non mostrava sintomi nel legno oppure ad una infezione presente in alcune piante prima dell'impianto.

L'ipotesi di una infezione pre-impianto potrebbe essere supportata anche dalla constatazione che la maggior parte dei casi di malattia in diverse regioni d'Italia sono ascrivibili a piante dell'annata vivaistica 2009.

Nell'actinidieto B nel 2011 sono state estirpate circa 50 piante (10%) sintomatiche. 10 piante sparse nell'appezzamento adiacenti a queste sono state analizzate, 4 sono risultate positive ma sono rimaste asintomatiche per tutta la stagione vegetativa. Durante la stagione vegetativa non sono stati notati nuovi sintomi sulle piante rimaste mentre a marzo 2012 circa il 70% delle piante è risultato infetto con sintomi sottoforma di esudati sul cordone principale e sui fusti.

L'appezzamento C nel 2011 non ha mostrato

sintomi mentre nel 2012 sono stati osservati solo alcuni tralci sintomatici su 3 piante (0.6%). Nel filare D nel 2011 sono comparsi sintomi su cordone permanete di 2 maschi, nel 2012 il 40% delle piante presentava sintomi simili.

L'appezzamento B può essere quindi considerato come controllo negativo testimone non trattato (non capitozzato) rispetto all'appezzamento A capitozzato. La capitozzatura appare quindi una tecnica efficiente se applicata molto rapidamente rispetto alla comparsa dei sintomi ovvero nell'arco di 10-15 giorni presumibilmente prima che il batterio invada anche l'apparato radicale: se applicata tardivamente o durante la stagione vegetativa e estiva essa infatti risulta non avere alcun effetto come dimostrato in esperienze condotte in altre regioni.

Inoltre la ricrescita della nuova vegetazione da ceppi apparentemente sani ha fatto sì che l'eventuale presenza di batterio sia stato diluita enormemente tanto che anche le piante rivelatesi sintomatiche nel 2012 sono rimaste asintomatiche nel 2011, nelle quali comunque l'infezione pare di origine endogena più che dall'esterno (sintomi alla base del fusto). L'analisi molecolare condotta sulle piante del appezzamento A è servita, oltre al monitoraggio del batterio nei vari punti della pianta, a confermare la presenza di batterio in alcune piante asintomatiche e a valutare l'effetto della rapida crescita della pianta rispetto alla colonizzazione del batterio nella stessa: gli apici e le foglie della pianta 11 del filare 1 è risultata negativa a PCR per tutta la stagione 2011 mentre è risultata positiva all'inizio del 2012, indicando quindi una più ampia diffusione del batterio all'interno della pianta. La pianta risulta ancora asintomatica.

In generale si può osservare anche che la comparsa dei sintomi appare essere correlata ad eventi di stress quali grandine ed esposizione ad agenti atmosferici a carico delle piante presenti sul fronte stradale ovest dell'appezzamento A e su quelle dell'appezza-



mento D non protetto dagli eventi grandigeni significativi verificatesi sia nel 2010 che nel 2011. In particolare nell'appezzamento A gli eventi di stress sembrano avere innescato la comparsa dei sintomi in direzione est di tutta la zona oggetto di studio (l'appezzamento C risulta ancora praticamente asintomatico)

Non completamente chiaro rimane invece il comportamento della manifestazione dei sintomi nell'appezzamento D costituito dai piante più anziane e certamente non infette prima dell'impianto (2002).

Ouesto caso tuttavia coincide a molti altri casi osservati in altre regioni d'Italia in cui i primi sintomi sono apparsi a carico di piante maschili adulte puoi espansi nell'anno successivo alle piante femminili: è comunque da considerare che questo appezzamento è sprovvisto di copertura antigrandine ed è stato quindi soggetto ad eventi di stress, a differenza dell'impianto C adiacente protetto.

Nel corso del 2012 continueranno le osservazioni sull'intera area oggetto di studio e le analisi molecolari nell'appezzamento A al fine di seguire l'evolvere dell'infezione sia in pianta che tra le piante.

L'appezzamento B rimasto in essere permetterà di valutare il comportamento delle piante ammalate durante la stagione vegetativa, a meno che non venga estirpato per l'aggravarsi della situazione o per ridurre la possibile fonte di nuovi inoculi.

Bibliografia

Aldrich, J. and C.A. Cullis (1993) RAPD analysis in flax: Optimization of yield and reproducibility using KlenTaq1 DNA polymerase, Chelex 100, and gel purification of genomic DNA. Plant Mol. Biol. Rep. 11: 128–141.

Rees-George J., Vanneste J. L., Cornish D. A., Pushparajah I. P. S., Yub J., Templeton M. D. and Everett K. R. (2010). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S–23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. Plant Pathology 59, 453–464

Laube I., Hird H., Brodmann P., Ullmann S., Schöne-Michling M., Chisholm J., Broll H. (2010)Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey Food Chemistry 118 979–986



Cancro batterico dell'actinidia: strategie d'infezione e reazioni delle piante di *Actinidia* spp.

Marsilio Renzi¹, Paul Copini², Anna R. Taddei³, Antonio Rossetti¹, Lorenzo Gallipoli¹, Angelo Mazzaglia¹, Giorgio M. Balestra¹

- 1: Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia (DAFNE), Università della Tuscia, 01100 Viterbo.
- 2: Forest Ecology and Forest Management Group, Centre for Ecosystem Studies, Wageningen University, PO Box 47, 6700AA Wageningen, Olanda.
- 3: Centro Interdipartimentale di Micr. Elettronica (CIME), Università della Tuscia, 01100 Viterbo.

Introduzione

Il cancro batterico causato da *Pseudomonas* syringae pv. actinidiae (Psa) rappresenta attualmente il maggiore problema fitosanitario dell'actinidia a livello mondiale. Differenti aspetti inerenti la biologia e l'epidemiologia di Psa devono essere ancora studiati e chiariti. Le vie d'infezione utilizzate dal patogeno (stomi, ferite, ecc.) ad oggi sono state ipotizzate, ma non ancora confermate/avvalorate da studi scientifici (Mazzaglia et al., 2010). Il presente studio, pertanto, ha analizzato su piante naturalmente affette da Psa ed inoculando artificialmente Psa in piante sane, quali sono i fattori abiotici e biotici che permettono al batterio di penetrare ed innescare il proprio ciclo infettivo all'interno di piante di Actinidia spp., ed investigare sulle risposte che le piante di Actinidia spp. evidenziano a seguito di un attacco da parte di questo batterio fitopatogeno.

Materiali e metodi

Nell'area di Cisterna di Latina (LT), da piante di *Actinidia* spp. (cv. Hayward, Jin Tao, Hort 16A) di 3-4 anni di età naturalmente affette da Psa, venivano prelevati ed analizzati campioni vegetali al fine di studiare i differenti tessuti interni (es.; xilema, floema). I campionamenti venivano effettuati nel periodo 2010-2001. Si prelevavano singole sezioni sagittali (rotelle) tutte ad 1 m di altezza, da 10 piante

di A. chinensis (Hort16A, Jin Tao) e da 10 di A. deliciosa (Hayward); le erano condotte mediante microtomo (G.S.L.-1, WSL, Birmensdorf, Switzerland) e specifico programma (ImageJ 1.40g, Wayne Rasband, NIH, USA), per misurare l'ampiezza degli anelli, la densità e le sezioni dei vasi,. I dati raccolti venivano sottoposti all'analisi statistica dell'ANOVA ad una via. Mediante microscopia ottica (DM2500, Leica, Cambridge, (UK), venivano inoltre studiate le lenticelle e, al di sotto delle stesse, eventuali alterazioni a carico del periderma, del floema, del cambio, la formazione di calli, di tille e repentini cambiamenti a livello degli anelli di accrescimento e dell'anatomia del legno. Inoltre veniva effettuata una ricostruzione dendrocronologia al fine di esaminare i tessuti interni dal momento dell'infezione in poi (Schneuwly and Stoffel 2008; Scweingruber, 1996; Steel *et al.*, 2010). In ambiente controllato (fitotrone con fotoperiodo di 16h e T °C 25, e 8h in assenza di luce e T °C15; % UR rispettivamente 60% e 70%), si impiegava un isolato noto di *P. s.* pv. actinidiae (Psa), CFBP 7286 (107 ufc/ml) opportunamente reso resistente alla rifampicina, mediante inoculazioni artificiali (senza ferita, con ferita, e mediante infiltrazione), su piante in vaso di 1 anno di età (Hayward e Hort 16A). Quindi, mediante l'ausilio della microscopia elettronica (ESEM, SEM, TEM, Ottico), veniva osservato se e come il batterio fitopatogeno penetra nell'ospite e quali com-

32



ponenti interni colonizza.

Risultati e discussione

Dalle microsezioni di piante naturalmente affette da Psa, durante il primo anno d'infezione non si osservano particolari alterazioni a carico delle strutture anatomiche del legno (dimensioni e densità dei vasi, ampiezza degli anelli) e le caratteristiche dello stesso non differiscono tra piante sane e piante malate.

Nelle stesse piante naturalmente affette da cancro batterico, mediante le indagini di microscopia elettronica, la presenza di Psa sia all'interno delle lenticelle come il suo rinvenimento in strati vegetali sottostanti (periderma), evidenziano come le lenticelle rappresentino una delle principali vie naturali d'infezione utilizzate da questo patogeno; similarmente, anche mediante le inoculazioni artificiali, si evidenzia come per penetrare, Psa utilizzi gli stomi, i tricomi e le ferite.

Inoltre, in piante naturalmente affette da cancro batterico, la riduzione in ampiezza degli anelli di crescita come una riduzione delle dimesioni dei vasi, sono elementi caratteristici e seguito di un infezione di questo batterio fitopatogeno in stato avanzato e pertanto si evidenzia uno spazio temporale tra i sintomi classici risontrabili a livello fogliare e le alterazioni all'interno delle piante di Actinidia spp. A seguito delle infezioni da Psa sono stati osservate dei cambiamenti nel legno delle piante di A. chinensis e di A. deliciosa; nel legno delle stesse, nella stagione vegetativa successiva a quella dove venivano riscontrati i primi sintomi, veniva riscontrata la formazione di numerose tille. Evidente era l'elevato numero delle stesse riscontrato nel legno di piante di A. deliciosa affette da Psa, rispetto ad altre non malate. Similarmente, anche se con minor differenze quantitative, si registrava una situazione analoga in piante di A. chinensis. Le inoculazioni artificiali, indipendetemente dal metodo impiegato e le cv utilizzate, permettevano di ottenere i classici sintomi (necrosi fogliari ed avvizzimento degli organi

vegetativi) entro 3 settimane.

A seguito delle inoculazioni artificiali si evidenzia che il batterio, nelle fasi avanzate dell'infezione, dopo aver colonizzato il floema, è in grado di penetrare nel cambio e quindi di arrivare allo xilema.

La capacità di Psa di penetrare, colonizzare e moltiplicarsi sia a livello del floema, sia dello xilema, evidenziano inequivocabilmente come la pratica della capitozzatura sia inutile ed anzi dannosa in quanto, raggiungendo agevolmente anche l'apparato radicale, questo batterio fitopatogeno, può così sopravvivere e, successivamente, perpetuare il proprio ciclo biologico colonizzando i vasi conduttori delle nuove emissioni vegetative.

Studi sullo sviluppo temporale di questa batteriosi possono quindi permettere, tramite un'analisi a livello del cambio, di datare l'inizio dell'infezione che, solitamente, sembra avvenire durante la stagione vegetativa.

Lo studio dimostra come le aperture stomatiche, i tricomi, le lenticelle, come le ferite, casuali o causate (potatura), risultino le vie preferite da questo patogeno per penetrare ed innescare il proprio ciclo infettivo all'interno dell'ospite.

In virtù dei risultati conseguiti, vengono evidenziati ulteriori aspetti meritevoli di approfondimento al fine di sviluppare nuove strategie di controllo di questo patogeno sistemico.

Ringraziamenti

Ricerca finanziata dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MIPAAF), progetto OIGA n° 247, ed in parte dalla Regione Lazio, Assessorato Agricoltura.

Bibliografia citata

Mazzaglia *et al.*, 2010. Rivista di Frutticoltura 9: 66-76.

Schneuwly, D. M., and Stoffel, M. 2008. Natural Hazards Earth System of Science 8: 203-211. Scweingruber, F.H. 1996. Tree rings and environment: Dendroecology. Berne Haupt Publishers. Steele, H., *et al.*, 2010. Plant Pathology 59: 1005-1013.



Relazione tra parametri ambientali e comparsa dell'epidemia di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Italia e ciclo della malattia su *Actinidia deliciosa* e *A. chinensis*.

Ferrante P, Fiorillo E., Marcelletti S., Marocchi P2, Mastroleo P3, Simeoni P3, Scortichini P4.

- 1: C.R.A. Centro di ricerca per la Frutticoltura, Roma
- 2: Apofruit-Italia, Ufficio tecnico Aprilia (LT)

Introduzione

La recente epidemia di "cancro batterico" dell'actinidia ha fatto la sua comparsa in Italia nella primavera del 2008, allorché, su diversi ettari di Actinidia chinensis cv. Hort16A e Jintao, coltivati nel Lazio, furono osservati i primi sintomi (maculature fogliari, avvizzimenti dei rami). L'agente causale della malattia fu subito identificato come Pseudomonas syringae pv. actinidiae. Successivamente la malattia fu riscontrata in Emilia-Romagna, Veneto e Piemonte non solo su A. chinensis ma anche su A. deliciosa. Nel Lazio l'epidemia ha causato la forte riduzione della coltivazione di kiwi giallo e sta interessando, provocando gravi perdite, anche gli impianti di kiwi verde. Al fine di accertare quali potrebbero essere stati i fattori scatenanti l'epidemia nel Lazio, è stato ricostruito l'andamento climatico del periodo 2007-2011 mettendo in evidenza come le gelate precoci dell'autunno 2007 e l'andamento estremamente piovoso del 2008 hanno contribuito alla comparsa e diffusione su vasta scala dell'infezione nei confronti di un ospite particolarmente sensibile e coltivato in un area ristretta.

Nel corso dello stesso periodo, inoltre, sono stati effettuati numerosi sopralluoghi in campo al fine di rilevare l'incidenza e la severità della malattia e di prelevare materiale vegetale infetto ed asintomatico per verificare quali sono i principali siti della pianta che il batterio colonizza. Tale attività ha consentito di stabilire, con estrema chiarezza, il ciclo della malattia che *P. s.* pv. *actinidiae* svolge a carico di *A. deliciosa* ed *A. chinensis* in un ambiente caratterizzato da clima tipicamente mediterraneo.

Materiali e metodi

Nel corso del periodo 2007-2011, mediante apposite stazioni climatiche permanenti dell'A.R.S.I.A.L. (Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione dell'Agricoltura nel Lazio) dislocate nelle province di Latina e Roma, sono state registrate le temperature massime e minime e l'andamento pluviometrico in alcuni comuni (Aprilia, Cisterna, Latina, Velletri) caratterizzati dall'estesa coltivazione sia di kiwi verde che di kiwi giallo. I parametri climatici sono stati messi in relazione con i rilievi di laboratorio, effettuati fin dal primo rinvenimento di sintomi (maculature fogliari) osservati nel maggio 2008 a carico di Hort16A e proseguiti per tutti gli anni successivi, sulla comparsa e diffusione della malat-

Per verificare la capacità infettiva di *P. s.* pv. *actinidiae* a carico di *A. deliciosa* e *A. chinensis* a seguito di gelate, sono state effettuate prove di infezione artificiale su piante e/o parti pianta, sottoposte a differenti periodi di permanenza al disotto degli 0°C,



mediante inoculazioni di sospensione batterica di concentrazione nota. E' stato verificato, in particolare, il periodo di "scongelamento" del tessuto dopo una gelata in funzione della migrazione del batterio all'interno dei ramo. Il comportamento di P. s. pv. actinidiae è stato messo a confronto con quello di un isolato di *P. s.* pv. *syringae* "ice⁺", isolato da *A*. chinensis. E' stato, inoltre, verificato se le "irrigazioni antigelo", effettuate in pieno campo per ridurre i rischi delle gelate, possano o meno innescare processi di moltiplicazione del batterio presente nei rami. Il ciclo della malattia è stato stabilito mediante isolamenti effettuati da tutti gli organi della pianta (gemme, foglie, fiori, rami in accrescimento, rami di un anno, lenticelle, peduncoli del frutto, cordoni, tronco, "ricacci"). Inoculazioni artificiali e successivi re isolamenti su piante di A. deliciosa e A. chinensis, effettuate in ambiente chiuso e controllato, hanno consentito di confermare la capacità di colonizzazione e di moltiplicazione del batterio a carico dei diversi organi della pianta e di delineare il ciclo della malattia del patogeno.

Risultati

Un evento che molto probabilmente è risultato decisivo nell'innescare l'epidemia di "cancro batterico" dell'actinidia è rappresentato dalle due gelate consecutive del 4 e 5 novembre 2007, quando la temperatura ha raggiunto valori variabili tra i -5°C di Cisterna e i -9°C di Aprilia per periodi consecutivi compresi tra le 4 e le 6 ore.

E' bene mettere in evidenza come in questo periodo la pianta non sia ancora in dormienza e, conseguentemente, risulta più esposta ai danni da gelo.

Una gelata altrettanto forte (-5°C, -9°C), inoltre, si è verificata il 17 febbraio 2008, per periodi consecutivi di 6-7 ore. L'andamento pluviometrico del 2008, inoltre, è stato particolarmente elevato raggiungendo, nell'area

in esame i 1.210 mm di pioggia, oltre il 30-35% in più dell'andamento medio della zona. I mesi più piovosi sono stati marzo, maggio, ottobre e novembre, proprio quelli molto favorevoli alla diffusione del batterio. Le infezioni dei rami di *A. chinensis* e *A. deliciosa*, infettati e sottoposti a – 10°C per un periodo di 6 ore, hanno evidenziato che il batterio può colonizzare, dopo lo scongelamento dei tessuti in 5 minuti, fino a 2 cm al di sopra e al disotto del punto di inoculazione. L'irrigazione "antigelo" riduce non molto la capacità di moltiplicazione di *P. s.* pv. actinidiae su *A. chinensis* a confronto con i rami che non ricevono tale trattamento.

Sia per quanto riguarda il kiwi verde che il kiwi giallo, il batterio, lungo l'arco dell'anno, va incontro ad una forte diffusione negli e tra gli impianti durante i mesi primaverili. Successivamente la sua pericolosità decresce con l'inizio della stagione estiva e l'innalzamento delle temperature. In autunno, da dopo la raccolta fino alla fine dell'inverno, si ha un lungo periodo dove, se intervengono eventi climatici avversi (forti e/o prolungate piogge, grandinate, gelate), le possibilità di ulteriore colonizzazione e diffusione di *P. s.* pv. *actinidiae* aumentano di nuovo.

Gli essudati, soprattutto quelli di color bianco-latte, sono i maggiori responsabili della diffusione del batterio negli e tra gli impianti. E' stato dimostrato che *P. s.* pv. *actinidiae* può migrare dalla maculatura fogliare, attraverso le nervature della foglia e il picciolo fogliare, per raggiungere il germoglio in accrescimento, fino a raggiungere l'inserzione di questo sul ramo di due anni. Questa fase è particolarmente pericolosa in quanto consente al patogeno di instaurare la fase "endofitica" (sopravvivenza e moltiplicazione all'interno dei tessuti della pianta) e di dare inizio alla formazione dei cancri lungo il ramo. In estate, nelle condizioni che contraddistinguono ampie aree della nostra penisola, si ha un forte rallentamento della diffusione del patogeno.



Ciò è dovuto alle elevate temperature che ne inibiscono fortemente la moltiplicazione.

Un altro periodo critico durante il quale *P. s.* pv. *actinidiae* inizia una nuova fase di attiva moltiplicazione e diffusione è l'autunno.

Le piogge e le operazioni di raccolta, infatti, favoriscono l'ulteriore dispersione del patogeno.

La raccolta, ovviamente necessaria, offre, nel contempo, numerosi siti di penetrazione dal momento che la superficie di distacco del peduncolo del frutto può essere raggiunto da cellule del batterio. Da qui, durante i mesi invernali, *P. s.* pv. *actinidiae* può migrare all'interno del peduncolo stesso fino a raggiungere il ramo. Le lenticelle, inoltre, offrono altre importanti vie di colonizzazione.

Nei mesi invernali sono le forti gelate che, soprattutto per il kiwi giallo, possono rappresentare un grande pericolo in quanto provocano lesioni, anche piccole, che potrebbero essere facilmente raggiunte, in seguito, da cellule del batterio.

Il batterio ha la capacità di moltiplicarsi attivamente nei tessuti della pianta anche durante i periodi di gelo. Inoltre, come già verificato per altri patogeni batterici che colpiscono le colture arboree, può migrare sistemicamente all'interno dei tessuti soprattutto nei minuti successivi allo scongelamento di questi.

Da un punto di vista epidemiologico questo risulta molto importante perché consente al patogeno di colonizzare rapidamente ampie porzioni di pianta.

Le irrigazioni antigelo non sembrano decisive, in presenza del batterio sulla pianta, nel ridurre drasticamente la sua presenza all'interno dei rami di *A. chinensis*.

Le conoscenze acquisite nel corso di questi anni sul ciclo della malattia del batterio consentono di ottimizzare la prevenzione e i trattamenti di difesa che vanno effettuati in momento precisi quando si deve necessariamente ridurre la carica batterica presente nell'impianto al fine di poter salvaguardare la produzione.

Discussione

E' molto probabile che l'epidemia di "cancro batterico" dell'actinidia abbia assunto un andamento epidemico nel Lazio in seguito alle gelate del novembre 2007 e febbraio 2008.

Soprattutto quelle invernali potrebbero aver causato numerose ferite alla pianta, non ancora in fase di dormienza, che, successivamente, sono state colonizzate dal patogeno. Osservazioni di campo effettuate dai tecnici che operano nelle province di Latina e Roma, inoltre, testimoniano di sintomi ascrivibili a *P. s.* pv. actinidiae (maculature fogliari) osservati, sia pure in misura ridotta, già nel corso del 2007. Risulta plausibile, quindi, che il batterio fosse già presente nella zona e che gli scoppi epidemici siano stati possibili a causa delle forti gelate dell'autunno-inverno 2007-2008.



Sessione 3

Diversità genetica e patogenicità del PSA

Il genoma di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae:* patogenicità, virulenza ed adattamento ambientale

Marco Scortichini

C.R.A. – Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

Una recente epidemia di "cancro batterico" dell'actinidia, causata da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, sta interessando tutte le maggiori aree di produzioni di kiwi del mondo. In Italia, il batterio dapprima ha colpito gli impianti di kiwi giallo *(Actinidia chinensis)* nel Lazio, in seguito, ha indotto danni rilevanti anche su kiwi verde *(A. deliciosa)* nella stessa regione e in tutte le maggiori aree di produzione del nostro Paese.

Al fine di mettere in evidenza le caratteristiche genetiche del patogeno è stato effettuato, mediante sequenziamento (Illumina Genome Analyser IIx), un approfondito studio sul genoma di tre ceppi del batterio rappresentativi di epidemie e rinvenimenti segnalati 20 anni fa in Giappone ed in Italia centrale nonché della recente e più distruttiva pandemia. L'analisi comparativa dei genomi ha evidenziato sostanziali differenze tra i ceppi per quanto riguarda la presenza/assenza di plasmidi, profaqi, effettori, nonché di fattori di virulenza quali la faseolotossina. In particolare, i ceppi delle passate epidemie hanno un plasmide di 50 kb non presente nella popolazione attuale che, però, possiede un megaplasmide di circa 160 kb.

Otto effettori, quattro per ognuna delle due popolazioni del patogeno, sono risultati specifici per la loro differenziazione. I tre ceppi variano anche nella composizione differenziale delle loro proteine.

Tutti e tre i ceppi, tuttavia, posseggono geni che possono esprimere resistenza nei confronti del rame e degli antibiotici. Inoltre, il batterio possiede un serie di siderofori molti efficaci nel "sequestrare" il ferro che si rende disponibile nell'ambiente "pianta" nonché set di geni in grado di colonizzare e degradare i composti fenolici dell'albero.

E' stato, altresì, evidenziato che il ceppo che attualmente sta causando danni rilevanti in tutte le aree di coltivazione del kiwi del mondo non si è originato dai ceppi delle precedenti epidemie presenti in Giappone ed in Italia ma si è evoluto separatamente.

E' stato evidenziato come un parte considerevole del genoma potrebbe essere stato acquisito mediante "trasferimento genico orizzontale". Inoculazioni artificiali su foglie di kiwi giallo e kiwi verde effettuate con i ceppi sequenziati hanno dimostrato come la popolazione attuale di *P. s.* pv. *actinidiae* sia in grado di moltiplicarsi molto efficacemente sia su kiwi giallo che su kiwi verde.

I ceppi delle passate epidemie, al contrario, si mostrano più adattati al kiwi verde. Il sequenziamento del genoma di *P. s.* pv. *actinidiae* consente di mettere in evidenza i "punti forti" ed i "punti deboli" del batterio in modo di migliorare le strategie di prevenzione e di difesa.



Il genoma di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae:* acquisizioni per la caratterizzazione molecolare delle principali popolazioni

Angelo Mazzaglia¹, David J. Studholme², Maria C. Taratufolo¹, Rongman Cai³, Nalvo F. Almeida⁴, Tokia Goodman³, David S. Guttman⁵, Boris A. Vinatzer³, Giorgio M. Balestra¹

- 1: Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia, Università della Tuscia, Viterbo, Italia;
- 2: Biosciences, University of Exeter, UK;
- 3: Department of Plant Pathology, Physiology, and Weed Science, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA;
- 4: School of Computing, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil;
- 5: Center for the Analysis of Genome Evolution & Function, University of Toronto, Toronto Ontario, Canada

La diffusione su scala mondiale delle malattie "emergenti" delle piante è una delle minacce più gravi per l'agricoltura moderna; tra queste, un caso emblematico è rappresentato dal cancro batterico del kiwi (Actinidia deliciosa e A. chinensis) causato da Pseudomonas syringae pv. actinidiae (PSA). Le prime segnalazioni di questa malattia batterica risalgono all'inizio degli anni '80 in Cina ed in Giappone; poi negli anni '90 la malattia è stata segnalata anche in Corea ed in Italia, seppure in maniera sporadica.

Dal 2008 però, in Europa si è diffusa una forma più aggressiva di questo patogeno, che ha causato danni ingentissimi dapprima in l'Italia e poi in Portogallo, Spagna, Francia e Svizzera.

Inoltre la malattia ha fatto la sua comparsa anche in Nuova Zelanda, Australia e Cile, minacciando così la sopravvivenza dell'intero comparto produttivo del kiwi in tutto il mondo.

Vista la rapidità della diffusione e la gravità di quella che ormai è considerata una vera e propria pandemia, si è ritenuto opportuno effettuare delle ricerche mirate a chiarire, investigando sulle relazioni genetiche intercorrenti tra le diverse popolazioni del patogeno, i possibili percorsi e le modalità di trasmissione del batterio su scala internazionale ed intercontinentale.

A tale scopo sono stati sequenziati i genomi di nove ceppi isolati in diversi paesi colpiti dalla malattia; in particolare sono stati analizzati due ceppi provenienti dalla Cina, che è il paese di origine del genere *Actinidia*, due dal Giappone, uno dalla Corea, tre dall'Italia ed uno dal Portogallo. Inoltre, come riferimento è stato sequenziato anche il genoma della pathovar geneticamente più affine, *P. syringae* pv. *theae*.

Da colture di questi ceppi è stato estratto il DNA genomico che è stato frammentato mediante sonicazione in porzioni da circa 300 bp, le cui estremità 5' e 3' sono state riparate e adenilate in 3' secondo gli standard Illumina; a tali estremità sono stati aggiunti degli adattatori. I prodotti di ligazione, aventi dimensione di circa 400 bp, sono stati selezionati su gel di agarosio al 1%, purificati e pre-amplificati mediante PCR (16 cicli), con primers compatibili con gli adattatori. Dopo una ulteriore corsa elettroforetica, i prodotti finali sono stati analizzati mediante corsa



su Chip DNA 1000 con Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA. USA). Il sequenziamento paired-end è stato effettuato in 1 canale per 76 cicli con un Illumina GAllx con modulo PE ottenendo un numero totale di 49.050.122 di clusters.

I valori di copertura genomica sono risultati compresi tra 60 e 267 e i genomi assemblati sono risultati essere costituiti da 431 a 513 contigs con valori di N50 compresi tra 24,213 nt e 37,924 nt. Le reads ottenute sono state analizzate e assemblate con CLC Genomics Workbench versione 4 (Arhus, Denmark).

I genomi assemblati sono stati annotati con RAST e i repertori di proteine predetti sono stati confrontati mediante OrthoMLC con quelli di altri ceppi di *P. syringae* disponibili in NCBI. I risultati hanno permesso di identificare 1.186 famiglie di proteine che avevano esattamente 1 membro della famiglia per genoma in tutti i genomi di *P. syringae*.

Le sequenze di queste proteine sono state concatenate ed allineate per costruire un albero filogenetico che chiarisse la posizione tassonomica di PSA.

Si è scelto inoltre di analizzare le relazioni genetiche tra questi isolati sulla base degli SNPs (polimorfismi di un singolo nucleotide). Le sequenze reads sono state quindi allineate sul genoma di riferimento della patovar theae per rilevare la presenza di SNPs tra le sequenze genomiche allineate ed il genoma di riferimento.

È stato costruito un allineamento multiplo tra le sequenze costituite dalla concatenazione delle posizioni genomiche dove era stato individuato uno SNP in almeno uno dei ceppi sequenziati e sulla base di questo è stato costruito un albero filogenetico NJ con PAUP 4.0.

Sono inoltre stati costruiti dei primers che amplificassero le zone comprendenti SNPs di particolare interesse filogenetico per applicare l'analisi anche ad altri ceppi il cui genoma non è stato sequenziato.

Su un totale di 21.494 SNPs, 7.625 sono risultati polimorfici tra i ceppi di PSA: la maggior parte di essi distingue gli isolati Giapponesi/Coreani (separati tra loro da circa 150 SNPs) da tutti gli altri;

I ceppi provenienti da Cina, Italia e Portogallo sono risultati far parte della stessa linea clonale in quanto è stato possibile identificare solo 6 SNPs in grado di distinguere i ceppi cinesi dai ceppi europei, mentre solamente due SNPs sono risultati diversi tra gli isolati italiani da quello portoghese.

È stata effettuata una analisi basata su 11 SNPs selezionati per essere particolarmente informativi, anche su altri ceppi europei e su alcuni ceppi Neozelandesi virulenti, da cui è emersa la loro appartenenza alla stessa linea genetica dei ceppi italiani e cinesi.

I risultati della ricerca sono poi stati interpretati in relazione alle possibili direzioni di movimento del patogeno tra i paesi, al fine di proporre una prima ipotesi sulle fonti e sulle vie di trasmissione dell'attuale pandemia del cancro del kiwi.

Ringraziamenti

Ricerca finanziata dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MIPAAF), progetto OIGA n° 247, ed in parte dalla Regi

Gennaio/Marzo 2012 41



COMUNICAZIONI

Riconoscimento molecolare di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* e contemporanea attribuzione a popolazioni del patogeno di differente provenienza e grado di virulenza tramite multiplex-PCR

Giorgio M. Balestra¹, Maria C. Taratufolo¹, Boris A. Vinatzer², <u>Angelo Mazzaglia</u>¹

- 1: Dipartimento di Scienze e Tecnologie perl'Agricoltura, le Foreste, la Naturae l'Energia, Università della Tuscia, Viterbo, Italia;
- 2: Department of Plant Pathology, Physiology, and Weed Science, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA

Introduzione

Pseudomonas syringae pv. actinidiae (PSA) è responsabile delle gravi epidemie di cancro batterico del kiwi che attualmente si verificano in tutto il mondo. Alle prime segnalazioni negli anni '80 in Asia (Cina, Korea e Giappone) ed ad una sporadica apparizione in Italia nel 1992 senza particolari conseguenze, è seguita nel 2008, la diffusione di un "tipo" del patogeno molto più aggressivo e virulento che ha improvvisamente dato origine ad una gravissima epidemia con effetti devastanti in tutti i principali areali di coltivazione dell'Actinidia nel mondo.

Infatti, oltre ai citati Paesi Asiatici, in rapida successione la malattia si è diffusa nei paesi dell'areale mediterraneo (Italia, Francia, Spagna, Portogallo, Svizzera, Turchia) ed in Oceania (Nuova Zelanda ed Australia).

L'osservazione dei sintomi non è purtroppo sufficiente a fare una diagnosi precisa della malattia ed è invece strettamente necessario ricorrere ad una conferma di laboratorio.

Tra i metodi molecolari diagnostici descritti fino ad oggi per il patogeno, non ci risulta che ve ne siano in grado di ottenere contemporaneamente due obiettivi rispetto agli isolati analizzati: il riconoscimento della patovar actinidiae, unitamente all'attribuzione dell'isolato ad una delle popolazioni ad oggi note del patogeno, che sembrano peraltro essere caratterizzate da diversi livelli di

aggressività. Con l'obiettivo di soddisfare questi requisiti, è stato sviluppato un saggio di PCR multiplex (m-PCR).

Materiali e metodi

Tra i batteri presenti nella collezione del DAFNE dell'Università della Tuscia sono stati scelti 32 isolati di PSA di diversa provenienza geografica: tutti gli isolati a nostra disposizione provenienti rispettivamente da Giappone (6), Corea (3), Cina (3) e Nuova Zelanda (4) e 16 europei selezionati invece sui circa 150 isolati disponibili (7 dalle diverse regioni italiane, 2 dalla Spagna, 3 dal Portogallo 3 dalla Francia e 1 dalla Svizzera). Ad essi, come termine di confronto, sono stati aggiunti 10 isolati appartenenti ai sequenti taxa: P. syringae pv. theae (2 isolati), P. syringae pv. papulans, P. syringae pv. tomato, P. syringae pv. syringae (2 isolati), P. syringae pv. lachrymans, P. syringae pv. aptata, P. syringae pv pisi ed un isolato di P. viridiflava ottenuto da tessuti vegetali di Actinidia.

Il DNA batterico è stato estratto con il PureLink™ Genomic DNA kit (Invitrogen, USA) da singole colonie cresciute per 48 ore a 27°C su Nutrient Agar (NA), ne è stata valutata la concentrazione, questa è poi stata uniformata per tutti a 50 ng/ µl ed il DNA è stato conservato a -20 °C per le fasi successive.

Dai risultati ottenuti in un precedente studio sul genoma di isolati di provenienza diversa,



è stato possibile identificare delle sequenze aventi caratteristiche di unicità sia per il patogeno stesso che per le sue principali popolazioni. In particolare è stata scelta una parte della sequenza che codifica per l'effettore HopZ3 per la diagnosi specifica del patogeno, mentre per il riconoscimento delle popolazioni sono state identificate delle sequenze caratteristiche all'interno di un'isola genomica con caratteristiche simili a quelle dell'isola PPHGI-1 descritta per *P. syringae* pv. *phaseo*licola (Pitman et al., 2005) Su tali seguenze sono state quindi disegnate 4 coppie di primers specifici con caratteristiche tali da poter essere usate contemporaneamente in una sola reazione di PCR ed in grado di amplificare selettivamente il patogeno e le sue diverse popolazioni. Oltre alle prove di selettività, sono state svolte anche delle prove di sensibilità su DNA purificato, su sospensioni batteriche e su tessuti di Actinidia infettati artificialmente.

Risultati e Discussione

Il saggio molecolare, oltre ad identificare correttamente tutti i ceppi del patogeno in oggetto, ne ha anche assegnato l'appartenenza alle tre principali popolazioni di PSA (una prima popolazione "giapponese/coreana" di media virulenza, una "europea" ad alta virulenza, e una "cinese", anch'essa ad alta virulenza), dando quindi contemporaneamente importanti indicazioni circa la relativa origine geografica, ed in seconda battuta, anche sulla virulenza degli isolati.

Tra i ceppi analizzati, come accennato, quattro provengono dalla Nuova Zelanda, dove si è sviluppato dal 2010 un gravissimo focolaio di malattia; due di essi, appartenenti al gruppo degli isolati altamente virulenti, hanno mostrato lo stesso profilo di amplificazione del gruppo "cinese", mentre gli altri due, appartenenti ad una tipologia a bassa virulenza reperibile solamente in Nuova Zelanda, non hanno dato luogo ad alcuna amplificazione. Lo stesso è avvenuto, come atteso, per tutti gli isolati appartenenti a pseudomonadi affini.

Il saggio di m-PCR ha mostrato un limite di sensibilità compreso tra 5 e 50 pg di DNA purificato o di 5 x 102 batteri/reazione PCR, usando come materiale di partenza delle sospensioni batteriche. Inoltre il saggio ha mostrato di essere in grado di identificare correttamente il patogeno anche utilizzando materiale genetico estratto da tessuti di piante artificialmente infette.

Il metodo descritto, per la sua semplicità, rapidità e sensibilità rappresenta un nuovo strumento diagnostico particolarmente adatto alla individuazione del patogeno ed alla simultanea attribuzione dello stesso ad una delle popolazioni di Psa.

Il limite di sensibilità mostrato è adeguatamente basso, ed è comparabile con quello delle altre principali strategie diagnostiche ad oggi descritte per questo patogeno (Gallelli et al., 2011; Rees-George et al., 2010), cui questo saggio si va ad affiancare.

Ouesta ricerca contribuisce dunque a mettere a disposizione dei tecnici specializzati del settore degli strumenti diagnostici sempre più efficaci su cui fare affidamento nelle attività di sorveglianza e prevenzione dalla malattia, in particolare quando si debba sottoporre ad accertamento un elevato numero di campioni.

Ringraziamenti

Ricerca è stata finanziata dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MIPA-AF), progetto OIGA n° 247 per la parte svolta all'Università della Tuscia (Italia) e da NSF (IOS-0746501) per la parte svolta presso il Virginia Polytechnic Institute and State University (Virginia Tech) (USA). Gli Autori ringraziano sentitamente tutti i colleghi che hanno fornito gli isolati batterici usati nella ricerca.

Bibliografia

Gallelli A et al., 2011. *Journal of Plant Pathology* 93(2), 425-435.

Pitman et al., 2005. *Current Biology.* 15, 2230-2235.

Rees-George et al., 2010. *Plant Pathology* 59(3), 453-464.

Gennaio/Marzo 2012 43



La selezione di genotipi tolleranti a PSA di *A. chinensis* e *A. deliciosa* presso CRA-FRU

Guido Cipriani, Massimo Terlizzi, Daniele Bevilacqua, Angelo Di Cintio, Teresa Rosato, Sara Bompard, Alisea Sartori

CRA-FRU Centro di Ricerca per la Frutticoltura, via di Fioranello, 52 – 00134 Roma e-mail: guido.cipriani@entecra.it; alisea.sartori@entecra.it

Parole chiave: Cancro batterico, Actinidia, breeding, pomologia

Introduzione e scopi

Il CRA-FRU sin dagli anni 80 si è occupato di Actinidia, reperendo del materiale da varie missioni in Cina e procedendo ad incroci per ottenere nuove selezioni e potenziali nuove cultivar che potessero ampliare il ristretto panorama varietale mondiale.

A partire dal 2006 presso i campi sperimentali del CRA-FRU, è stato fatto per i 607 semenzali di *A. chinensis* e i 289 semenzali di *A. deliciosa*, per un totale di 447 piante maschili e 436 piante femminili, un lavoro di valutazione con particolare attenzione alle varietà a polpa gialla, verde e rossa e alla precocità di raccolta.

Nel 2009, 848 nuovi semenzali derivati dal lavoro di breeding, sono stati piantati, per un totale di 402 genotipi appartenenti alla specie *A. chinensis* e 446 ad *A. deliciosa*.

Nella primavera del 2011, sono stati osservati in campo i primi sintomi di un attacco batterico dovuto a *Pseudomas syringae* pv. *actinidiae* (PSA). Successivamente test di laboratorio hanno confermato la diffusione di tale malattia nei campi sperimentali.

Da allora, il primo obiettivo del programma di miglioramento relativo all'Actinidia presso il Centro, è stato quello di individuare materiale tollerante al cancro batterico.

Materiale e metodi

I 1741 genotipi, di cui 1001 di *A. chinensis* e 740 *A. deliciosa*, presenti nei campi sperimentali del CRA-FRU, sono stati monitorati e tuttora sono in osservazione sin dalla comparsa dei primi sintomi nella primavera del 2011. Si è proceduto con l'eliminazione delle piante che presentavano l'emissione di abbondante essudato rosso fuoriuscente dal tronco, dai cordoni e dai tralci.

Si è praticata la capitozzatura, a circa 40 cm da terra, di quelle piante che presentavano sintomi quali la presenza di essudati lattiginosi con conseguente comparsa di muffe in corrispondenza sia dei tagli sui tralci potati, o di fessurazioni e scorticature.

Tutto il materiale vegetale derivato dall'eliminazione e dalle potature è stato bruciato prontamente e calce spenta è stata distribuita sul terreno negli spazi creati.

Le osservazioni sui sintomi si sono protratte anche dopo il germogliamento fino alla completa fioritura, procedendo con l'eradicazione dell'intera pianta nei casi più gravi di disseccamento rameale o con la capitozzatura, per la presenza di avvizzimento di germogli e comparsa successiva di macchie necrotiche sulla lamina fogliare e sui boccioli dei fiori.



Risultati e Discussione

Dopo due anni dalla diffusione della PSA, nei campi sperimentali sono attualmente presenti il 15% del totale dei semenzali piantati, di cui ben 143 genotipi (pari al 9,3%) non hanno manifestato alcun sintomo pur essendo in piena esplosione della malattia. Il restante 5,7% è dato da materiale che non ha manifestato alcuna infezione secondaria, vale a dire che dopo essere stato capitozzato i nuovi ricacci non risultano colpiti da cancro rameale (*Tab.1*).

Fortunatamente in questo gruppo di piante sane, ci sono anche delle selezioni avanzate che hanno caratteri pomologici e fenologici molto interessanti. Cinque sono i maschi tutti appartenenti alla specie *A. chinensis*, che

hanno fioriture precoci tra il 10 e il 20 aprile con un'entità molto elevata. Le selezioni avanzate femminili sono in totale quattro, una di *A. chinensis* caratterizzata da polpa gialla e un peso di circa 72 g che viene raccolta verso la metà di settembre (-40 giorni da Hayward) e tre di *A. deliciosa*, con peso tra i 90 e 120 g che vengono raccolte entro la prima decade di ottobre (-21 giorni da Hayward).

Un'osservazione da aggiungere riguarda le origini del materiale che è risultato poco sensibile alla malattia e cioè quello che dopo due anni non ha presentato sintomi: M CUO 3, M CUO 12, M CUO 16 appartenenti alla specie *A. chinensis* e i figli di una selezione denominata R XII 130 di *A. deliciosa* hanno il numero più alto di individui sani (*Tab. 2*).

	Ann	o 2011	Anno 2012		
Semenzali	N.	%	N.	%	
in osservazione	1741		1537		
capitozzati	905	52,0	0	0	
con ricacci sani	0	0	88	5,7	
eliminati	207	11,9	1306	85,0	
P.te Vive	1532	88,0	231	15,0	
P.te Sane	609	35,0	143	9,3	
A. chinensis	1001	57,5	832	54,1	
A. deliciosa	740	41,5	705	45,9	
A. chinensis malate	737	42,3	659	42,9	
A. deliciosa malate	364	20,9	645	42,0	

Tab. 1 - Numero e percentuali dei semenzali in osservazione per i sintomi da PSA nei due anni 2001 e 2012.

Origini	N semenzali	N. con ricacci sani	N. Estirpate	N. Sane	% Ricacci sani	% Sane con stessa origine	% Sane sul n. tot. semenzali
M CUO 3	19	2	1	16	11	84	2
M CUO 12	2 31	1	8	22	3	71	3
M CUO 16	5 33	2	9	22	6	67	3
R XII 130	28	0	0	12	0	43	1

Tab. 2 - Entità numerica e percentuali dei semenzali relativamente alle origini con più materiale sano.



Sessione 4 Strategie di contenimento

Ruolo delle tecniche agronomiche sul cancro batterico dell'actinidia

G. Costa, I. Donati, F. Spinelli, S. Graziani, G. Vittone, R. Onorato, V. Bucci, G. Donati, F. Pelliconi

Dipartimento di Colture arboree, Alma mater Studiorum, Università di Bologna Viale G. Fanin 46, 40127 Bologna

Le principali tecniche agronomiche per la corretta gestione di un actinidieto e per l'ottenimento di un prodotto di elevate qualità organolettiche sono rappresentate dalla nutrizione (concimazione ed irrigazione), dalla potatura e dall'impollinazione. Fra le pratiche agronomiche va anche considerato l'impiego dei bioregolatori, che vengono normalmente utilizzati negli impianti di Actinidia per influenzare la morfogenesi dei frutti. In considerazione della diffusione della batteriosi e delle diverse condizioni climatiche e colturali che in modo differenziato appaiono influenzare l'evoluzione della malattia, si è ritenuto opportuno approfondire gli studi sul ruolo e sulle possibili ripercussioni che alcune pratiche agronomiche potrebbero avere sull'incidenza e sulla gravità del cancro batterico dell'Actinidia. Questo aspetto è stato recentemente affrontato in un progetto di ricerca finanziato dalla Regione Emilia-Romagna che ha dedicato una specifica azione allo studio di questi aspetti "Valutazione di fattori agronomici che possono influenzare la diffusione e la gravità del cancro batterico".

Peraltro, le prove sono iniziate da poco tempo e non è possibile esprimere giudizi definitivi sul ruolo svolto dalle diverse pratiche agronomiche sulla base dei risultati sperimentali ottenuti. Inoltre, va considerato che nelle prove condotte in campo; le piante possono essere ammalate ma asintomatiche, per cui, se la malattia si manifesta durante lo svolgimento delle prove, è possibile giungere a

conclusioni errate. Per tali motivi le prove vengono anche ripetute in condizioni controllate su piante sicuramente sane che vengono successivamente inoculate con il batterio al fine di aggiungere informazioni certe sul possibile ruolo delle pratiche agronomiche. Infine, si è ritenuto opportuno coinvolgere nel presente lavoro alcuni tecnici che operano nelle regioni più importanti per la coltivazione della specie e la batteriosi si è manifestata con l'intento di apportare una serie di considerazioni pratiche che sono fondamentalmente quelle che vengono trasferite ai soci appartenenti alle organizzazioni produttori per le quali i tecnici lavorano.

Allo stato attuale delle sperimentazioni, né l'irrigazione, né la fertilizzazione sembrano avere un effetto prominente sulla patologia. In particolare, non si è avuto nessun riscontro sull'incidenza della malattia in relazione ai diversi trattamenti. L'unica differenza significativa è stata riscontrata per la concentrazione di Manganese che sembra essere più alta negli impianti infetti. Inoltre, le piante con un maggior contenuto di Ferro sono risultate leggermente più colpite anche se le differenze non sono state significative.

Per quel che riguarda l'irrigazione, la disponibilità idrica può avere sulla patologia tre diversi effetti. Il primo è una più prolungata e costante apertura stomatica che potrebbe facilitare la penetrazione del batterio sebbene i risultati ottenuti indichino che l'apertura stomatica ha un ruolo limitato nell'infezione; il

46



secondo è la possibilità per la pianta di formare un maggior numero di germogli giovani e vigorosi che potrebbero essere più suscettibili all'infezione, e, il terzo è un effetto, dovuto al potenziale idrico, che potrebbe favorire la migrazione del patogeno all'interno dei tessuti vegetali. Per quanto riguarda la potatura, le prove sono tuttora in corso e mirano, in primo luogo, a determinare per quanto tempo il taglio sia infettabile e a stimare che influenza abbia l'epoca di potatura sull'incidenza della malattia. Purtroppo, sino a questo momento non si è verificata nessuna infezione nelle diverse tesi.

Per quanto riquarda il ruolo esercitato dai bioregolatori, le prove sono in corso sia in condizioni di pieno campo che in condizioni controllate e non sono ancora disponibili i risultati. Si stanno valutando, oltre ai formulati commerciali a base di auxine e citochinine e gibberelline (Maxim, Sitofex e Spray Dunger Global) impiegati per influenzare la morfogenesi dei frutti, anche altre sostanze di crescita quali l'acido giasmonico, l'acido salicilico e l'acido abscissico che potrebbero svolgere una potenziale azione di controllo sulla malattia essendo formulati che la pianta usa per difendersi dall'attacco di patogeni. Le considerazioni che emergono dal gruppo tecnico sulle diverse tecniche colturali sono le sequenti:

a) per quanto riguarda la concimazione, si deve evitare di effettuare apporti elevati di concimi, e, in particolare, di azoto per non favorire un lussureggiamento vegetativo. Peraltro questa situazione è la norma, infatti, i quantitativi suggeriti sono contenuti, in regola con quanto riportato nei disciplinari regionali e delle diverse OP. E' stato osservato che le piante vigorose con la presenza di germogli poco lignificati tendono ad ammalarsi più facilmente. Per quanto riquarda il manganese, le cultivar appartenenti alla A. chinensis sono spesso carenti di questo elemento e per questo motivo si effettuano programmi di concimazione che prevedono anche questo elemento. Una differenza sottolineata dal gruppo tecnico, che può valere la pena di sottolineare, è la diversità nella tecnica della concimazione fra l'ambiente settentrionale e meridionale. Al Nord si effettuano applicazioni con concimi fogliari mentre al Centro-sud questa pratica non è così frequente.

- **b)** per quanto riguarda l'irrigazione, la tecnica oggi prevalentemente diffusa è quella "a goccia" o "a microportata". Gli impianti soprachioma e sottochioma sono poco usati, oppure solamente con una funzione "antibrina". Eccessi di umidità vanno sicuramente evitati anche perché laddove esiste un'elevata umidità (zone vicine a fiumi e canali di irrigazione) è stata riscontrata una maggiore presenza della malattia.
- c) per quanto riguarda la tecnica della potatura emergono queste indicazioni. La potatura verde va effettuata solo quando c'è asciutto, bassa umidità ambientale.

Un'osservazione che merita di essere riportata consiste nel numero limitato di tagli "al verde" che si eseguono sulle cv dell'A. deliciosa (meno colpita) rispetto al numero maggiore di interventi che si eseguono sulle cv di A. chinensis (più colpita). Un'altra considerazione interessante è la seguente: conviene estirpare le piante ammalate piuttosto che effettuare tagli più o meno intensi mantenendo la pianta colpita; le piante capitozzate si riammalano dopo uno od anche due anni e le piante vicine vengono spesso infettate a loro volta.

d) per quanto riguarda l'uso dei bioregolatori, l'argomento è dibattuto da tempo e sono state sollevate delle perplessità da parte di alcuni tecnici. Al momento attuale, peraltro, non vi sono elementi che indichino un loro coinvolgimento nella batteriosi.

Per quel che riguarda l'impollinazione, pratica utilizzata per ottenere una buona pezzatura dei frutti, si è dimostrata un potenziale veicolo per la diffusione del cancro batterico. Il patogeno è stato, infatti, riscontrato sul polline proveniente da fiori infetti e, il medesimo, è stato in grado di diffondere la malattia verso fiori sani e verso le foglie. Ciò nonostante, allo stato attuale non è possibile concludere la plausibilità biologica di trasmissione dell'infezione in condizioni di pieno campo, ossia non è da considerarsi come prova sufficiente alla validazione dello studio, ma solo come prova a favore.



La difesa da Pseudomonas syringae pv. actinidiae

Maria Lodovica Gullino¹, Agostino Brunelli² e Graziano Vittone³

- 1: Agroinnova, Università di Torino,
- 2: Diproval, Università di Bologna,
- 3: C.R.E.S.O

La recente epidemia di "cancro batterico" dell'actinidia, causata da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, che sta interessando tutte le maggiori aree di produzione di kiwi del mondo, tra cui quelle italiane, è particolarmente problematica sia per la virulenza del patogeno sia a causa delle difficoltà di contenimento legate alla mancanza di prodotti dotati di specifica attività battericida e alla ridotta disponibilità i principi attivi registrati sulla coltura.

Su queste basi la difesa deve basarsi soprattutto su interventi di tipo preventivo, seguendo tre linee strategiche principali.

1. Riduzione dell'inoculo del patogeno attraverso interventi agronomici

Il patogeno ha dimostrato di potersi propagare con estrema rapidità per cui vanno messi in atto interventi di riduzione dell'inoculo non appena venga individuato un focolaio di infezione.

La prima operazione da adottare consiste nella rimozione e distruzione di tutte le parti di pianta sintomatiche.

In presenza di cancri lungo il tronco è consigliabile estirpare completamente la pianta, apparato radicale incluso.

Nel caso si asportino soltanto germogli colpiti, bisogna disinfettare subito i tagli di potatura e distruggere i rami tagliati.

Accanto alle operazioni di eradicazione, va ricordata l'importanza dell'uso di pratiche agronomiche corrette come la regolazione della concimazione azotata e della disponibilità idrica, per limitare il vigore delle piante e ridurne la sensibilità nei confronti del batterio, la disinfezione degli strumenti di taglio, la protezione delle piante dal freddo invernale, per evitare danni da gelo.

2. Trattamenti con prodotti rameici

I derivati rameici sono lo strumento chimico più importante per i trattamenti preventivi, anche perché appartengono al ristretto gruppo di prodotti registrati sulla coltura per i trattamenti sul bruno, inoltre, per alcuni di essi, dal 2011 c'è stata l'estensione all'impiego in vegetazione.

I formulati che possiedono una buona resistenza al dilavamento, come le poltiglie bordolesi a reazione neutra o alcalina e i formulati a base di ossido rameoso, sono adatti ai trattamenti effettuati nel periodo che va dalla fine della raccolta al germogliamento per disinfettare le ferite causate dal distacco dei frutti e dalle operazioni di potatura secca.

I trattamenti con i prodotti rameici possono essere ripetuti in vegetazione ogni volta che si creino ferite sulla pianta causate da operazioni di potatura verde o in seguito a grandinate, scegliendo i formulati che apportano la minor quantità di rame metallo per ha, come quelli a base di idrossido.

I formulati a base di rame hanno spesso mostrato effetti fitotossici, quando sono stati usati in vegetazione.



3. Trattamenti con altri prodotti

Negli ultimi anni particolare attenzione è stata rivolta alla valutazione dell'efficacia di prodotti in grado di stimolare nella pianta la produzione di sostanze di difesa e verso microrganismi antagonisti.

Tra questi ultimi va ricordato *Bacillus amyloli-quefaciens* subspecie *plantarum* recentemente registrato sulla coltura, il cui uso è consigliato durante la fioritura. Tra i cosiddetti induttori di resistenza, non ancora registrati sulla coltura, ci sono numerosi prodotti in fase di sperimentazione, tra i quali si ricordano i fosfonati, fosetyl-Al e derivati dell'acido fosforoso, i prodotti che sequono nella pian-

ta il percorso dell'acido salicilico (acybenzolar-S-methyl), gli estratti di piante o alghe, come la laminaria.

Alcune perplessità, soprattutto sotto il profilo normativo, suscita poi l'impiego di prodotti commercializzati come concimi fogliari e di alcuni disinfettanti suggeriti da alcuni.

La strategia migliore, in questo momento, per la lotta alla batteriosi resta la combinazione delle tre strategie di difesa: eradicazione dei focolai, trattamenti rameici sul bruno e per la disinfezione delle ferite e trattamenti periodici, durante la stagione vegetativa, con prodotti in grado di stimolare i meccanismi di resistenza dell'ospite.



Le strategie di contenimento di P.s.a. in Piemonte

C. Morone, G. Michelatti

Regione Piemonte – Settore Fitosanitario

La coltivazione dell'actinidia in Piemonte riveste una grande importanza dal punto di vista economico coinvolgendo circa 2.600 aziende con una superficie investita che nel 2010 aveva raggiunto i 5.500 ettari (con un andamento di crescita dal 2007 di 300 ettari annui) e con un fatturato annuale che ammonta a circa 120 milioni di euro.

A partire dal 2010 il Piemonte ha dovuto fronteggiare una nuova emergenza fitosanitaria: la batteriosi dell'actinidia indotta dal batterio *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae (P.s.a.), a causa della quale la superficie investita ad actinidia in Piemonte ha subito una riduzione nel 2010 di 38 ettari, nel 2011 di circa 300 ettari e nel 2012 di circa 400 ettari. La malattia si è manifestata per la prima volta in modo contemporaneo in actinidieti geograficamente lontani tra loro ma quasi sempre collegabili ad impianti recenti, facendo ipotizzare una diffusione legata all'introduzione di materiale vivaistico infetto seguita da un andamento climatico favorevole allo scatenarsi dell'infezione.

Nel 2011, all'impegno del Settore Fitosanitario nell'attuazione delle disposizioni previste dai decreti di lotta obbligatoria, si è aggiunta l'attività legata alla nuova emergenza: vigilanza sul territorio con ispezioni in campo e nei vivai, attività di diagnostica presso i laboratori regionali, attività amministrativa per l'applicazione del Piano regionale di profilassi fitosanitaria della batteriosi, inclusa l'erogazione di contributi a sostegno delle aziende agricole coinvolte nell'applicazione delle misure d'emergenza.

Manifestazione della batteriosi ed attività di vigilanza

Il Settore Fitosanitario ha intrapreso l'attività di vigilanza e monitoraggio della batteriosi dell'actinidia in anticipo rispetto alla sua comparsa negli impianti piemontesi grazie ai contatti tecnico-commerciali con il Lazio, prima regione italiana che ha dovuto confrontarsi con l'emergenza. Gli accertamenti sono, infatti, cominciati grazie ai tecnici coordinati dal CReSO (Consorzio di ricerca, sperimentazone e divulgazione per l'ortofrutticoltura piemontese) all'inizio del 2009, mentre la manifestazione dei sintomi è avvenuta in primavera 2010 e la presenza del batterio confermata con certezza solo a metà del mese di maggio 2010.

Le ispezioni negli actinidieti nel 2011 hanno seguito l'evoluzione dei sintomi e si sono quindi concentrate da gennaio ad aprile. Le squadre di ispettori fitosanitari hanno cercato di garantire una presenza costante nelle zone colpite nel periodo di massima diffusione e manifestazione dei sintomi sia per vigilare sull'applicazione delle misure di emergenza sia per fornire supporto tecnico alle aziende. Al lavoro delle squadre in campo è stata affiancata, per tutto il periodo, l'attività di diagnostica svolta presso i laboratori del Settore per l'esame dei casi sospetti.

Durante il periodo estivo, in conseguenza della riduzione dell'attività del batterio tipica della stagione, l'attività di vigilanza sull'applicazione delle misure d'emergenza si è spostata dagli impianti ai vivai.



Andamento dell'epidemia nel periodo 2010-2011

La stagione invernale-primaverile 2010-2011 ha visto l'esplosione in forma epidemica della batteriosi. Al momento della sua comparsa in Piemonte, nel maggio 2010, i sintomi erano rilevabili quasi esclusivamente sulle foglie degli impianti realizzati nel 2009 con materiale vivaistico infetto (di provenienza extraregionale) e l'inoculo risultava ancora contenuto. Nella primavera 2010 il sintomo più evidente e rilevante consisteva nella comparsa di maculature necrotiche con alone giallo sulle foglie, mentre risultavano poco numerose le piante colpite gravemente, cioè che evidenziavano cancri corticali e produzione di essudati. L'evoluzione dei sintomi durante l'estate era stata contenuta dalle temperature elevate, sfavorevoli al batterio, e la progressione della malattia si era limitata al disseccamento di parte delle foglie già colpite.

A partire dal mese di ottobre 2010, con il ritorno di temperature più basse e con l'aumento dell'umidità relativa causata da piogge prolungate durante tutto il periodo di raccolta, la moltiplicazione del batterio era ripresa aumentando di molto l'inoculo..

Nel mese di marzo 2011, a differenza di quanto si era verificato all'inizio della primavera 2010, la batteriosi si è manifestata con gravi sintomi a livello corticale ed ha compromesso un numero molto elevato di piante: a distanza di un anno, infatti, grazie alla facilità di diffusione del batterio nell'ambiente, l'inoculo è aumentato esponenzialmente aggravando l'infezione sia dal punto di vista del numero di impianti colpiti sia della gravità dei sintomi. Inizialmente sugli impianti recenti, più sensibili all'infezione, e poche settimane dopo su quelli più vecchi, è stata osservata l'emissione di essudato denso ("mieloso") di colore bianco-trasparente (che evolve in rossastro in seguito al contatto con l'aria) in corrispondenza delle gemme e dell'inserzione dei rami sulle branche più vecchie. La corteccia sottostante, inoltre, è risultata imbrunita (alterazione definita "cancro").

Durante l'estate 2011, in seguito alle alte temperature ed alla bassa umidità relativa, l'attività di P.s.a. è diminuita con conseguente riduzione dei tipici sintomi sulle foglie (maculature necrotiche con alone giallo); si sono invece evidenziate tacche necrotiche estese ("brusone") provocate dalla condizione di eccessiva traspirazione e non riconducibili quindi alla batteriosi.

A partire dal mese di **settembre** negli appezzamenti colpiti dalla batteriosi sono stati osservati frequenti casi di collassamento e completa filloptosi di piante produttive; il fenomeno, in presenza di cancri del legno, è stato indirettamente ricondotto alla presenza del batterio.

Le condizioni climatiche calde e secche si sono protratte fino alla fine di dicembre 2011 e per tutto il mese di **gennaio 2012**. Prima dell'inizio delle operazioni di raccolta, verso la metà di ottobre, la situazione dal punto di vista della manifestazione dei sintomi è apparsa, all'apparenza, migliore rispetto ai mesi precedenti. Nei mesi invernali alcune segnalazioni di impianti che manifestavano gravi sintomi corticali con abbondanti colature hanno però evidenziato che, nonostante le condizioni climatiche non predisponenti, il batterio si è comunque mantenuto attivo e si è diffuso sulle ferite dei distacchi fogliari. Il freddo intenso che ha caratterizzato la prima metà di febbraio (in alcune zone del Cuneese le temperature sono scese sotto i -20 °C) ha inferto un ulteriore colpo agli impianti di actinidia (sono stati stimati danni alla produzione del 70% in media, con punte del 90-100%). Il gelo, oltre a provocare la morte di intere piante o parti di esse ha infatti provocato ferite che costituiscono per P.s.a. un'ulteriore via di penetrazione nella pianta. Con la ripresa vegetativa primaverile è in corso di valutazione l'effettiva progressione e diffusione della malattia e l'entità dei danni provocati dall'azione congiunta di queste due avversità.



Applicazione delle misure d'emergenza

Nel mese di febbraio 2011 (in attesa della pubblicazione sulla Gazzetta ufficiale del decreto ministeriale che avrebbe definito le misure di emergenza contro la batteriosi) è stato dichiarato con decreto regionale lo stato di allerta su tutto il territorio regionale per la presenza del batterio; sono inoltre state definite le sequenti misure urgenti di prevenzione: asportazione delle parti colpite, capitozzatura rasoterra oppure estirpazione delle piante infette o dell'intero frutteto (a seconda della gravità dei sintomi); distruzione mediante incenerimento o interramento profondo in loco del materiale derivante dalle operazioni di rimonda, capitozzatura o estirpo; divieto di rimpiazzo delle singole piante e di reimpianto dei frutteti estirpati; protezione dei tagli prodotti sulle piante; controlli periodici, rimonde e trattamenti per mantenere i frutteti privi di cancri; divieto di utilizzo di api per l'impollinazione e di macchine per la raccolta del polline nelle aree ad elevato rischio e in quelle distanti meno di 1 km da appezzamenti risultati infetti.

Nell'area più colpita, il Cuneese, dai 60 impianti infetti nel 2010 si è arrivati a circa 600 casi nei primi mesi del 2011, alla fine di aprile 2012 si stima che la fitopatia interessi il 35% degli actinidieti cuneesi. La gravità della situazione ha reso necessaria l'attuazione rapida di tutte le misure utili a ridurre e contenere l'inoculo del batterio ed ha portato all'approvazione del Piano regionale di profilassi fitosanitaria della batteriosi dell'actinidia, che ha indirizzato le azioni contro la batteriosi in Piemonte per tutto il 2011.

Il Piano ha definito nel dettaglio le misure di profilassi sanitaria obbligatorie, stabilendo in particolare le misure d'intervento per la gestione degli impianti e le regole per la produzione vivaistica.

Le misure d'intervento prevedono, tra l'altro, l'esecuzione di trattamenti e l'utilizzo di tecniche di buona pratica agronomica secondo modalità stabilite nelle linee guida permanenti predisposte dal Settore Fitosanitario in collaborazione con il CReSO e tenute costan-

temente aggiornate sulla base delle nuove conoscenze acquisite sulla batteriosi e delle osservazioni effettuate in campo.

Sul territorio regionale l'attività vivaistica legata alla produzione di piante di actinidia costituisce una realtà produttiva consolidata; per tale motivo il Piano regolamenta con specifiche misure di profilassi fitosanitaria la produzione e la moltiplicazione del materiale vegetale nei vivai di produzione e nei campi di piante madri per assicurare idonee garanzie fitosanitarie. Tutte le aziende vivaistiche che producono actinidia in Piemonte sono state direttamente ispezionate dal Settore Fitosanitario al fine di concedere l'autorizzazione all'emissione dell'etichetta che deve accompagnare le piante all'atto della vendita.

Il Piano regionale di profilassi 2011 ha dato anche attuazione ad un bando a favore delle aziende agricole che per realizzare le misure d'emergenza hanno dovuto fare fronte a costi aggiuntivi; sono state quindi sostenute le aziende che hanno estirpato o capitozzato gli impianti infetti e quelle che hanno sospeso l'impianto degli actinidieti in cui erano già stati messi a dimora i pali ed i fili; è stato inoltre riconosciuto un contributo a compensazione del mancato reddito dovuto alla perdita della produzione.

Il bando, emanato e gestito dal punto di vista amministrativo dal Settore Fitosanitario regionale, ha coinvolto le amministrazioni provinciali nelle fasi di istruttoria delle domande di aiuto, di accertamento e controllo. La maggior parte delle domande di aiuto è stata presentata da aziende della provincia di Cuneo, che si conferma quindi come la zona del Piemonte maggiormente penalizzata dall'infezione.

Alla fine di marzo, vista l'evoluzione epidemica della batteriosi durante i mesi invernali, l'intero territorio piemontese è stato definito zona ad elevato rischio fitosanitario e sono stati sospesi fino al 31 dicembre 2011 in tutto il Piemonte i nuovi impianti e la messa a dimora di singole piante anche da parte di soggetti non impegnati professionalmente in agricoltura. La sospensione ha trovato giustificazione nell'esigenza di tutelare le superfici



investite ad actinidia esistenti in Piemonte messe a rischio dalla realizzazione di nuovi impianti che, essendo molto più sensibili agli attacchi della batteriosi, diventano causa importante di diffusione della malattia. Con la misura sospensiva è stata evitata la possibile introduzione di materiale infetto proveniente da vivai extra-regionali contaminati.

Per dare piena applicazione al decreto ministeriale sulle misure di emergenza contro la batteriosi e sulla base degli esiti dei monitoraggi dello stato fitosanitario del territorio regionale eseguiti nel 2011, nel mese di dicembre 2011 è stato approvato il Piano regionale di applicazione 2012 delle misure di emergenza contro la batteriosi dell'actinidia, che ha stabilito l'aggiornamento delle misure di profilassi, le disposizioni per i nuovi impianti 2012, le sanzioni e la delimitazione del territorio. Il Piano 2012 costituirà la naturale continuazione del piano precedente.

Alle azioni realizzate nel 2011 dovrà infatti essere data continuità, vista la virulenza e la diffusibilità del batterio, per mantenere basso l'inoculo e ridurlo dove possibile sia con l'azione a monte presso i vivai sia con l'azione in campo in fase di gestione dei frutteti ad actinidia.

Divulgazione delle conoscenze sulla batteriosi dell'actinidia e degli aggiornamenti tecnici

Il Settore Fitosanitario regionale, fin dall'inizio dell'emergenza batteriosi ha curato la divulgazione delle conoscenze sulla batteriosi e degli aggiornamenti tecnici per la gestione dell'emergenza. Per lo svolgimento di questa importante attività la collaborazione con il CReSO è risultata fondamentale in quanto il consorzio, operando attraverso propri tecnici specialistici e coordinando i tecnici frutticoli delle organizzazioni dei produttori e delle organizzazioni professionali agricole, costituisce un importante punto di riferimento per la frutticoltura piemontese.

Dal mese di giugno 2010 e per tutta la campagna frutticola 2011 sono state predisposte schede tecniche informative riguardanti le conoscenze della batteriosi e le indicazioni per la difesa.

Le **schede informative** e le linee guida permanenti per l'esecuzione dei trattamenti previste dal Piano regionale di profilassi 2011 sono state distribuite in occasione degli incontri di aggiornamento rivolti ai tecnici frutticoli attivi nell'assistenza alle aziende agricole.

Sono stati inoltre organizzati numerosi e capillari incontri tecnici e riunioni per informare gli altri soggetti interessati dall'emergenza batteriosi: vivaisti, aziende agricole, amministrazioni comunali.

I comuni, in particolare, diventano a loro volta soggetti attivi nell'attività di divulgazione delle informazioni e di sensibilizzazione nei confronti della pericolosità della malattia, che chiama in causa anche quanti, coltivando a livello hobbistico piante di actinidia, non vengono raggiunti dai servizi di assistenza tecnica ma devono comunque essere informati. In ogni comune fra quelli più colpiti, circa una decina, sono state organizzate riunioni che hanno visto la partecipazione di 100-150 agricoltori per ogni incontro.

Tutta la documentazione consegnata durante gli incontri è stata pubblicata sul sito della Regione Piemonte e sul sito del CReSO, che hanno dedicato alla batteriosi sezioni specifiche dalle quali è possibile consultare e scaricare contenuti vari e completi.

I due siti web sono diventati, a partire dal 2010, il punto di riferimento per la consultazione degli aggiornamenti e di tutta la documentazione relativa all'emergenza batteriosi in Piemonte.

Ricerca e sperimentazione

La gestione dell'emergenza provocata dalla batteriosi dell'actinidia ha comportato, per il Settore Fitosanitario, un impegno anche sul fronte dell'individuazione di mezzi che potessero contenere la malattia e per questo motivo è diventato coordinatore di un progetto di ricerca a regia regionale a che vede impegnati il CReSO ed il centro di competenza Agroinnova dell'Università degli Studi di Torino ed è cofinanziato dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Torino.



COMUNICAZIONI

Strategie di contenimento di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae:* i risultati ad oggi conseguiti dall'Università degli Studi della Tuscia

GIORGIO M. BALESTRA¹, ANGELO MAZZAGLIA¹, LORENZO GALLIPOLI¹, MARSILIO RENZI¹, MARIA CLAUDIA TARATUFOLO¹, ALESSIO QUATTRUCCI¹, ANDREA ANSELMI¹, ANTONIO ERCOLANI¹

1: DAFNE, Università degli Studi della Tuscia, Via S. Camillo de Lellis - 01100, Viterbo

Introduzione

Dal 2008, il Gruppo di Fitobatteriologia dell'Ateneo di Viterbo ha avviato differenti linee di ricerca inerenti l'agente causale del cancro batterico dell'actinidia, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) quali: contenimento, epidemiologia, biologia, genetica, genomica, identificazione. Tra queste, nell'ambito di un Progetto della Regione Lazio, Assessorato Agricoltura, ad oggi sono state sviluppate differenti strategie per un contenimento di questa batteriosi.

Materiale e Metodi

Tre sono ad oggi le strategie analizzate in laboratorio e successivamente sperimentate, per più anni consecutivi in pieno campo, nel Lazio. Per le differenti strategie attuate si è valutata la loro attività sviluppando preventivamente una scala dell'incidenza della malattia, rispetto ai sintomi a livello fogliare/% rami con sintomi. I protocolli sperimentali sono stati applicati su una superficie di 1 ha per ciascun impianto, utilizzando come termine di confronto (testimone) una superficie equivalente dello stesso frutteto, gestita secondo procedure aziendali; il tutto in 6 impianti di kiwi di differente età (4 a polpa verde e 2 a polpa gialla), dove nel 2008 era stata accer-

tata la presenza di Psa. In particolare, si effettuavano campionamenti in 4 diversi momenti della stagione (in primavera, estate e autunno). Ad ogni campionamento, da 2 sub-parcelle (2 filari da 20 piante ciascuno) scelte all'interno delle aree esaminate, sono state prelevate 200 foglie a random (10 foglie/pianta su 10 piante/parcella), per ognuna delle 2 tesi (sperimentale e testimone). Le strategie sperimentate si distinguono tra di loro per:

- **a)** nutrire in maniera opportuna e stimolare le difese endogene delle piante di *Actinidia* spp.;
- **b)** proteggere le differenti fasi fenologiche dell'actinidia mediante Sali di rame;
- c) prevenire e competere con l'agente causale del cancro batterico dell'actinidia, mediante l'impiego di un antagonista naturale.

La strategia prevalentemente nutrizionale (a), al 4° anno consecutivo di sperimentazione, si caratterizza per la somministrazione per via fogliare ed in fertirrigazione, di complessi aminoacidici, umati di potassio, ac. fosforoso, ac. solforico e sostanza organica, come per l'impiego di rame minerale (nitrato), unitamente a microelementi. Durante la pserimentazione di questa strategia, oltre ai paramtrei descrittvi si investigava anche sul pH e l'elettroconducibilità della linfa prelevata da 4 piante (malate e sane)/parcella/azienda durante la stagione vegetativa.

Gennaio/Marzo 2012



La strategia costituita da Sali di rame (b), è al 2° anno di sperimentazione in campo. Si tratta di Solfato di rame neutralizzato al 10.0% pari a 124 g/l. Nelle sperimentazioni sono impiegati 2 dosaggi (250ml/hl e 400ml/hl) e le applicazioni sono effettuate in marzo (1), aprile (3), maggio (1), giungo (1), settembre (1), ottobre (1). Quindi, la sua applicazione si caratterizza per applicazioni constante durante l'intera stagione vegetativa al fine di mantenere una protezione continua delle differenti porzioni vegetative aree da infezioni/reinfezioni da Psa, verificando anche eventuali danni fitotossici.

Per prevenire infezioni da Psa e competere con questo batterio fitopatogeno, è stata inoltre sviluppata un'altra strategia **c**), caratterizzata dall'impiego di un antagonsita naturale (Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum (ceppo D747). L'isolato in questione è stato prima studiato in dettaglio in laboratorio (inibizione di Psa, Pss, Pv; resistenza ad antibiotici ed a formulati rameici) e quindi sperimentato in pieno campo, nel biennio 2010-2011, con 2 applicazioni (dosaggio 1.5 Kg/10 q.li H20), nel periodo della fioritura, a rottura bottni fiorali, e dopo una settimana.

Risultati e Discussione

Nel contesto considerato, la prevenzione è la base imprescindibile prima di avviare qualsiasi intervento di contenimento/controllo della batteriosi causata da Psa.

Dagli studi ad oggi effettuati il patogeno evidenzia la capacità di muoversi per via sistemica all'interno dell'ospite e pertanto, nel caso del rinvenimento di sintomi a carico del tronco, è fondamentale l'estirpazione dell'intera pianta, incluso l'apparato radicale, ed un nuovo riempianto deve essere effettuato solo nella stagione successiva. Unitamente, la costante chiusura dei tagli di potatura, la distruzione dei residui da essa derivanti, come la disinfezione degli utensili impiegati

in queste operazioni, sono pratiche da cui non si può prescindere per far fronte ad un'elevata pressione dell'inoculo batterico, qual'è oggi quello presente nella maggior parte delle aree italiane coltivate ad actinidia. Effettuata quindi una robusta potatura/significativa estirpazione di piante compromesse (non la capitozzatura delle stesse) per ridurre la persistenza di Psa, le strategie di difesa sviluppate nel corso di questi anni si sono caratterizzate per essere tutte a basso impatto ambientale e per permettere di convivere con Psa.

La strategia "nutrizionale" (a) ha permesso, tramite numerosi incontri tecnici come mediante differenti pubblicazioni, sia di evidenziare come il rame è a tutt'oggi un elemento indispensabile per proteggere la piante di *Actinidia* spp. da questa fitopatia sia, se utilizzato in opportuni momenti e dosaggi, di essere impiegabile anche durante la stagione vegetativa.

La stessa strategia ha evidenziato inoltre, come sia possibile convivere con Psa ed al contempo ottenere produzioni quali-quantitative di kiwi di tutto rispetto. (Fratarcangeli et al., 2010, Quattrucci et al., 2010; Mazzaglia et al., 2011).

Nello specifico, negli impianti di kiwi a polpa verde, l'applicazione del protocollo ha fatto registrare, in media, riduzioni dei sintomi fogliari a maggio, giugno, luglio e settembre rispettivamente del: 54,3%; 64,3%; 73,1% e 62% e, negli impianti di kiwi a polpa gialla, maggio –10,5%; giugno –35,1%; luglio –65,4% e settembre –48,3%, rispetto a quanto rilevato nelle parcelle testimoni.

L'analisi della linfa evidenzia come, a seguito del trattamento i valori del pH si riducano e l'elettroconducibilità aumenti, sfavorendo quindi il patogeno ed, al contempo, ottimizzando la veicolazione degli elementi nutritivi. Inoltre, dal punto di vista delle produzioni, il peso medio dei frutti di kiwi a polpa verde nelle tesi dove è stato applicato il protocollo sperimentale era di 95 g, e di 110 g per i frut-



ti di kiwi a polpa gialla, rispetto agli 80 g e agli 87 g, ottenuti rispettivamente per i kiwi verdi e gialli nelle tesi testimoni.

L'applicazione del sale di rame solfato neutralizzato, strategia *(b)*, sta portando un agrofarmaco contenete questo sale di rame ad una sua registrazione in etichetta da parte del MIPAAF per un suo impiego anche in vegetazione. La riduzione/contenimento dell'incidenza della malattia è stata meno marcata in impianti di *A. deliciosa*, per la ridotta pressione del patogeno. Su piante di *A. chinensis*, l'indice di malattia è aumentata da maggio (0.4) a settembre (0.8) sulle piante di controllo, rispetto al trattato (0.3 e 0.6, rispettivamente).

Similarmente, rispetto alla % di rami sani, questi diminuivano progressivamente nel corso delle stagioni sulle piante di controllo (dall'85% ad aprile, al 38% a settembre), rispetto al trattato (dal 88% al 60%).

Inoltre, non è stato registrato nessun effetto indesiderato (fitotossico) sulle piante come sui frutti.

L'antagonista naturale studiato, strategia (c), in laboratorio ha evidenziato come lo stesso sia in grado di inibire efficacemente lo sviluppo di Psa, come anche quello degli altri 2 batteri (P. s. pv. syiringae, P. viridiflava) responsabili, a volte, di danni di rilievo a carico degli organi vegetativi aerei di Actinidia spp.

Lo stesso isolato di *Bacillus* risulta in grado di sopravvivere e di moltiplicarsi anche in presenza di rame, senza al contempo assorbirlo e non è resistente agli antibiotici.

Successivamente in pieno campo, l'antagonista naturale ha evidenziato di essere in grado di proteggere efficacemente da Psa per l'intera fase della fioritura e, l'insieme dei dati/risultati conseguiti, ha permesso la sua registrazione (Amylo X) a livello europeo, come unico agrofarmaco, biologico, attivo nei confronti di Psa.

In tutte le prove la % relativa all'incidenza della malattia è stata sempre inferiore sul trattato rispetto al controllo, come sul trattato risulta sempre maggiore la % di rami sani (dall'8.8% al 40.4% e dal 3% al 25%); nel frattempo, ulteriori sperimentazioni sono in corso per verificare la sua capacità di colonizzazione/protezione delle piante di *Actinidia* spp, durante l'intera stagione vegetativa mediante l'antagonista naturale.

Ottenuti i differenti risultati sopra descritti, il Gruppo di Ricerca del DAFNE sta comunque proseguendo le ricerche in questo settore ed ulteriori strategie di contenimento/difesa da Psa sono in fase di studio (in laboratorio) e di sperimentazione (in pieno campo).

Ad oggi, risulta fondamentale effettuare prima un'adeguata "pulizia"/azione preventiva, all'interno di actinidieti non compromessi a causa di Psa (incidenza non superiore al 30%).

Quindi, mediante le differenti strategie di difesa/contenimento sviluppate, complementari tra di loro, se le stesse vengono applicate compiutamente, si ritiene possibile convivere con Psa e quindi fornire un concreto aiuto per i produttori di kiwi italiani per superare questo difficile momento.

Ringraziamenti

Ricerche in parte finanziate dalla Regione Lazio, Assessorato Agricoltura, Progetto 2009-2011: "Cancro batterico dell'actinidia (Pseudomonas syringae pv. actinidiae): messa a punto di strategie di difesa".

Bibliografia citata

Fratarcangeli *et al.,* 2010. L'Informatore Agrario Mazzaglia *et al.,* 8: 52-55.

Ouattrucci *et al.,* 2010. L'Informatore Agrario Mazzaglia *et al.,* 16: 53-57.

Mazzaglia *et al.*, 2011. L'Informatore Agrario Mazzaglia *et al.*, 16: 54-77.

http://www.freshplaza.it/news_detail.asp?id =40683



Tecniche non invasive di monitoraggio del cancro batterico dell'actinidia (Psa) mediante dati telerilevati multispettrali: Progetto SIMBAKI – Regione Lazio

Roberto Bianconi², Lorenzo Gallipoli¹, Pietro Laranci², Gianluca Tramontana³, <u>Claudio Belli</u>², Giorgio M. Balestra¹

- 1: Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia (DAFNE), Università della Tuscia Via S. Camillo de Lellis 01100, Viterbo.
- 2: Terrasystem s.r.l, Spin Off dell'Università degli Studi della Tuscia.

Via Pacinotti 5 - 01100 Viterbo, www.terrasystem.it.

3: Dipartimento per l'Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali (DIBAF) Università della Tuscia - Via S. Camillo de Lellis – 01100, Viterbo.

Introduzione

Nell'ambito del Progetto "Cancro batterico dell'actinidia (Pseudomonas syringae pv. actinidiae): messa a punto di strategie di difesa" della Regione Lazio, è stata sviluppata un'analisi relativa alla possibilità di utilizzare tecnologie innovative e non invasive di monitoraggio del cancro batterico dell'actinidia utilizzando dati aerei-satellitari multispettrali e analisi spaziale e geostatistica.

Lo studio ha valutato quali regioni dello spettro elettromagnetico della luce riflessa discriminio presenza e grado di malattia (Psa) a livello di singola pianta ed a livello di porzioni aeree della stessa (canopy), le *performance* ed applicabilità degli indici di vegetazione per realizzare mappe tematiche e le interferenze possibili con falsi positivi.

Altri aspetti indagati legati all'applicabilità della tecnica hanno riguardato il livello della scala di analisi e la migliore risoluzione geometrica e temporale dei dati da impiegare.

Materiali e Metodi

L'analisi ha interessato un'area del comune di Cisterna di Latina (LT) ed è stata condotta su aziende produttrici di kiwi a polpa verde, *Actindia deliciosa* ed a polpa gialla, *A. chinensis*.

Venivano individuate 36 piante test affette da un diverso grado di malattia, monitorandone poi l'incidenza ad intervalli di circa 30 giorni, mediante analisi visiva in campo e misure spettroradiometriche acquisite con spettroradimetro FieldSpec® 3 HiRES Portable, dai primi di maggio a tutto settembre 2011.

Per ogni pianta test è stato acquisito un set di tre firme spettrali della riflettanza in modo da indagare ciascun terzo della chioma di ogni pianta test. Parallelamente sono state effettuate due campagne aeree di acquisizione dati termico-multispettrali, mediante sistema integrato DFR-ASPIS con cui sono state acquisite 12 bande spettrali. In aggiunta sono state acquisite due scene satellitari Rapideye a 5



bande (Fig. 1).

Sono state altresì raccolte le firme spettrali di piante affette da carie o da clorosi allo scopo di discriminare a livello spettrale altre sintomatologie riscontrabili su actinidia. Le immagini acquisite sono state corrette radiometricamente e processate geometricamente mediante ortoproiezione.

Tutte le elaborazioni sono state condotte a più livelli di scala (proximal e remote sensing) e a più livelli di aggregazione e su di esse è stata utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA) ad un fattore. Per alcuni degli indici più utilizzati in letteratura (NDVI, PRI e deRed Edge) si è cercato inoltre di valutare la significatività mediante analisi ANOVA multifattoriale.

Sulla base delle elaborazioni statistiche è stata derivata, a partire dall'indice NDWI, una mappa in classi del grado di stress relativo alla probabilità di incidenza di Psa. L'analisi ANOVA ad un fattore è stata inoltre utilizzata per valutare se tra piante affette da Psa a vari stadi e piante colpite da carie e clorosi ci possa essere una differenza significativa rispetto ai valori degli indici considerati.

Antennia GPG Antennia GPG Centra APPS Cen

Fig. 1 - II sistema DFR-ASPIS.

Fig. 2 - Test ANOVA indiceNDWI; in ascissa il grado di malattia, in ordinata il valore dell'indice.

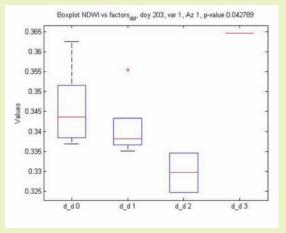
Risultati e Discussione

L'analisi ha individuato le regioni spettrali maggiormente sensibili al grado di malattia (tra 680 nm - 900 nm (Red Edge) e tra 1200 nm - 1600 nm, regione sensibile al tenore idrico della vegetazione).

Su 56 indici di vegetazione testati, 17 siano risultati significativamente correlati con il grado di malattia in almeno una delle date di rilievo. L'indice NDWI è risultato significativo nella finestra temporale di fine giugno luglio, mantenendo di fatto la sensibilità dell'informazione su differenti scale di indagine. Per esempio, per l'azienda n.1; a livello di scala *remote sensing* le elaborazioni hanno evidenziato come il grado di malattia risulti significativamente correlato alla variabilità dei valori dell'indice in questione (p-value 0.042789) (Fig. 2).

Risultati in linea emergono anche dalle elaborazioni a livello di scala proximal sensing.

L'applicazione di questo indice, al fine di estrapolare mappe tematiche del grado di malattia, ha permesso in un'ottica di previsio-





nalità di individuare in maniera preventiva aree maggiormente stressate in relazione alla probabilità di incidenza della Psa.

Relativamente agli aspetti legati all'applicabilità della tecnica di analisi condotta è emerso come la risoluzione geometrica del dato telerilevato sia risultata idonea alle elaborazioni effettuate.

Per quanto riguarda i falsi positivi è stata riscontrata per singola data una netta discriminazione degli stessi con i sintomi causati da Psa.

Rispetto al livello di indagine, l'analisi che ha fornito le migliori indicazioni è risultata essere quella condotta a livello di singola azienda e singola data di rilievo in quanto negli altri casi viene inclusa nell'analisi una maggiore variabilità di tipo interparcellare, e dovuta al momento fenologico.

Considerando questo come il primo progetto

pilota sviluppato per la problematica fitosanitaria cancro batterico dell'actinidia, si evidenziano sia ulteriori margini di miglioramenti dello stesso, sia l'elevata fruibilità dei dati informatizzati acquisibili in brevi tempi per ampie aree, quale opportuno strumento sia per servizi pubblici (Servizi Fitosanitari) sia privati (OP), al fine di poter costantemente monitorare differenti aspetti legati alla fitopatia, ed aggiornare l'intera situazione in tempo reale.

Ringraziamenti

Ricerca finanziata dalla Regione Lazio, Assessorato Agricoltura, Progetto 2009-2011: "Cancro batterico dell'actinidia (Pseudomonas syringae pv. actinidiae): messa a punto di strategie di difesa".