

STUDI PRELIMINARI SUL “FLUSSO SCHIUMOSO DEGLI AGRUMI” IN BASILICATA

S. M. MANG¹, I. CAMELE¹, M. NUZZACI¹, N. VENA², A. SURANO³, C. MENNONE⁴,
A. IPPOLITO³

¹ UniBas – SAFE – Viale dell’Ateneo Lucano, 10 85100 Potenza

² Regione Basilicata – Ufficio Fitosanitario – A.M. Di Francia, 4075100 Matera

³ UniBA – Di.S.S.P.A. – Via G. Amendola, 165/A, 70126 Bari

⁴ ALSIA – SS. Jonica Km 448,2 - 75012 Metaponto (Matera)
antonio.ippolito@uniba.it

RIASSUNTO

Nell'autunno 2018 e 2019, durante una indagine volta a verificare lo stato fitosanitario di agrumeti presenti in Basilicata, su tronchi e rami di piante di arancio dolce cv. Fukomoto innestate su citrange Carrizo, localizzate in agro di Scanzano Jonico (MT) sono stati osservati copiosi essudati schiumosi biancastri. In corrispondenza dei flussi la corteccia si presentava fessurata. La percentuale di piante sintomatiche, che mostravano flussi schiumosi biancastri, deperimento progressivo e scarsa produzione, si aggirava intorno al 5-10%. Al fine di identificare le possibili cause dei sintomi sono state effettuate analisi fitopatologiche e chimiche del suolo e delle foglie di piante sintomatiche. I risultati delle analisi chimiche hanno dimostrato che il livello dei nutrienti era nella norma. Le indagini virologiche hanno dato esito negativo. Dai tessuti sintomatici e dagli essudati è stato costantemente isolato un lievito e, saltuariamente, un batterio, identificati mediante PCR e successiva analisi genica. Gli ampliconi sono stati sequenziati e confrontati con quelli presenti in NCBI, mostrando alta similarità con *Torulaspora delbrueckii* e *Zymobacter palmae*. Ulteriori studi dovranno essere condotti per soddisfare i postulati di Koch al fine di verificare il ruolo dei due microrganismi nel determinismo della sintomatologia osservata su agrumi in Basilicata e se altri fattori, biotici o abiotici, abbiano contribuito alla manifestazione dei sintomi.

Parole chiave: lieviti, *Torulaspora delbrueckii*, *Zymobacter palmae*

SUMMARY

PRELIMINARY STUDIES ON “CITRUS FOAMY FLUX” IN BASILICATA, ITALY

In the autumn of 2018 and 2019, during surveys to verify the phytosanitary status of citrus orchards located in the countryside of Scanzano Ionico (Basilicata, Italy), on trunks and branches of sweet orange cv. Fukomoto grafted on Carrizo citrange, copious whitish foamy exudates were observed. Alongside the flows, the bark appeared cracked. The percentage of symptomatic plants was around 5-10%. Trees with the described symptoms were declining and with poor production. In order to identify the possible causes, phytopathological and chemical analyses of symptomatic plants were carried out. The results of chemical analyses showed that the nutritional levels were normal; also, virological analyses resulted negative. A yeast (and occasionally a bacterium), was constantly isolated from the symptomatic tissues and exudates, which were identified molecularly by PCR and subsequent gene analysis. The obtained PCR amplicons were sequenced and compared with those already present in the databases (NCBI) showing high similarity with those of *Torulaspora delbrueckii* and *Zymobacter palmae*. Further studies must be conducted to fulfill Koch's postulates, in order to verify the role played by *T. delbrueckii* and/or *Z. palmae* in determining the observed symptoms, and also to check if other factors, biotic or abiotic, are involved.

Keywords: yeasts, *Torulaspora delbrueckii*, *Zymobacter palmae*

INTRODUZIONE

L'introduzione di nuove varietà rappresenta in frutticoltura ed in agrumicoltura un aspetto fondamentale e di primo piano per innovare i processi produttivi con prodotti ben recepiti dal mercato, che garantiscano una redditività adeguata alle imprese agricole.

Tra le innovazioni varietali introdotte per le arance del gruppo Navel a polpa bionda, nell'ultimo decennio, il 'Fukumoto' è interessante per le caratteristiche pomologiche e per l'epoca di maturazione più anticipata rispetto ai Navel finora coltivati. Notoriamente non sempre tutte le caratteristiche positive e negative di una varietà sono conosciute e solo nel corso degli anni si possono valutare, tanto da decidere se continuare o meno con la diffusione della varietà oggetto di valutazione. Nello specifico, per il 'Fukumoto', nelle schede varietali dei Paesi dove è stato introdotto, tra le criticità veniva riportata una fitopatia denominata "foamy bark rot", che poteva determinare problemi di sopravvivenza delle piante.

Nei nostri areali, per molti anni, tale problematica non si era manifestata fino all'estate del 2018, quando sono stati segnalati i primi casi. Durante una indagine volta a verificare lo stato fitosanitario degli agrumeti presenti in Basilicata, su tronchi e rami di piante di arancio dolce cv. Fukumoto (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, di 5 anni di età, innestate su citrange Carrizo localizzate in agro di Scanzano Jonico (MT), sono stati infatti osservati copiosi essudati schiumosi biancastri (figura 1).

Figura 1. Abbondanti essudati schiumosi osservati su tronco di arancio dolce cv. Fukumoto (a sinistra). Spesso al flusso schiumoso era associata la presenza di formiche (al centro). Cancro sottocorticale nell'area di fuoriuscita della schiuma (a destra)



Sottocorticalmente, in corrispondenza dei flussi, si osservavano spaccature che poi evolvevano in cancri (figura 1).

L'incidenza di piante sintomatiche si aggirava intorno al 5-10%. Le piante sintomatiche si mostravano deperimenti e con scarsa produzione di frutti.

Poiché i sintomi sopra descritti non sembrano essere stati mai segnalati in Italia, viste le analogie con una alterazione riscontrata su 'Fukumoto' in California e le possibili implicazioni economiche della malattia, sono stati avviati studi per chiarirne le cause.

MATERIALI E METODI

Campioni di terreno sono stati raccolti a una profondità di circa 20 cm in prossimità di alberi di agrumi sintomatici e asintomatici da sottoporre ad analisi chimiche. Dagli stessi alberi sono state raccolte foglie da sottoporre alle stesse analisi. Ulteriori campioni fogliari, prelevati da alberi sintomatici, sono stati saggiati per evidenziare la eventuale presenza dei principali virus degli agrumi mediante test sierologico E.L.I.S.A. Porzioni di tronchi, rami ed essudati, prelevati da piante sintomatiche, sono stati raccolti per successivi tentativi d'isolamenti fungini e batterici. A tale scopo, piccoli frammenti di tessuto sono stati sterilizzati superficialmente ed usati per inseminare piastre Petri contenente come substrato nutritivo Patata-Destrosio-Agar (PDA) addizionato con tetraciclina 0,05%. L'essudato è stato direttamente utilizzato per inseminare piastre di PDA. Le piastre sono state incubate, al buio, a 24 ± 1 °C per 7 giorni.

Per gli isolamenti batterici, piccoli pezzi di tessuto sintomatico preventivamente sterilizzati sono stati omogeneizzati in presenza di soluzione fisiologica e l'omogeneizzato usato per "strisciare" piastre Petri contenenti come substrato nutritivo King B (KB) o Nutrient Agar (ANG). Le piastre sono state quindi poste ad incubare, al buio, a 25 ± 1 °C per 3 giorni.

Dalle colture pure ottenute è stato estratto il DNA genomico totale (gDNA) utilizzando il kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Germania) secondo le istruzioni del produttore. Il gDNA è stato usato in prove di amplificazione (PCR) utilizzando le coppie di primer ITS5/ITS4 (White et al., 1990) e Y1/Y2 (Young et al., 1991) rispettivamente per funghi e batteri. Per le reazioni di amplificazione è stata utilizzata la Master Mix PCR Phire Plant Direct (Thermo Scientific, Wilmington, USA) seguendo le istruzioni del produttore.

Gli ampliconi ottenuti sono stati direttamente sequenziati da BMR Genomics (Padova, Italia) e le sequenze confrontate con quelle presenti in GenBank mediante il programma BLAST (Altschul et al., 1990) ed ulteriormente analizzate mediante il software MEGA v.6.0 (Tamura et al., 2013) per verificare la presenza di eventuali differenze a livello nucleotidico.

RISULTATI

I risultati delle analisi chimiche del suolo e delle foglie non hanno mostrato alcuna alterazione nutrizionale nelle piante di *Citrus* spp. Il saggio ELISA ha escluso la presenza dei virus ricercati nelle piante esaminate. Gli isolamenti dalle porzioni di tronchi, rami e "flusso" hanno sempre permesso di isolare una sola specie di lievito e, occasionalmente, un batterio.

Le amplificazioni del gDNA estratto dalle colture pure hanno consentito di ottenere ampliconi di circa 650 bp con la coppia di primer ITS5/ITS4 e di circa 300 bp con Y1/Y2. Il confronto delle sequenze nucleotidiche ottenute con quelle già presenti in banca dati (NCBI) mediante il programma BLAST ha rivelato una elevata omologia di sequenza (identità al 100%) con quelle appartenenti al lievito *Torulaspora delbrueckii* (Lindner) E.K. Novák & Zsolt 1961 (codici di accesso MK394138 e FN394007) per ITS e al batterio *Zymobacter palmarum* Okamoto et al., 1993 (codici di accesso NR114073 e AF211871) per 16S. Cinque sequenze di *T. delbrueckii* e cinque da *Z. palmarum* ottenute in questo studio, sono state depositate in banca dati EMBL con i codici di accesso da LR723629 a LR723633 per *T. delbrueckii* e da LR723551 a LR723555 per *Z. palmarum*. Nessuna differenza significativa, a livello nucleotidico, è stata evidenziata tra le sequenze di *T. delbrueckii* e *Z. palmarum* ottenute in questo studio e le sequenze nucleotidiche già presenti nel database NCBI utilizzando il software MEGA v.6.0 (Tamura et al., 2013).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Come prima accennato, i sintomi osservati ricordavano da vicino una malattia già segnalata in USA su ‘Fukumoto’ e denominata "foamy bark rot", o "sap flux diseases" (Adesemoye et al., 2011; Jones, 2014). Per il vero sembrerebbe che una sintomatologia molto simile a quella riscontrata su ‘Fukumoto’ sia stata già descritta in Texas e Florida nel 1946 da Godfrey (Godfrey, 1946), denominata "infectious wood necrosis and gummosis". In California la malattia è stata denominata "Rio Grande gummosis" o "ferment gum" ed era ampiamente diffusa su alberi di pompelmo (Klotz, 1973). Godfrey (1946) e Childs (1953) avevano attribuito la malattia ad un attinomicete, mentre Olson (1952) a *Diplodia* spp.

Vari altri microrganismi sono stati proposti come agenti causali. In particolare, in California, Adesemoye et al. (2011) hanno associato al "foamy bark rot" dell'arancio cv. Fukumoto a diversi batteri e funghi, tra cui *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Fusarium solani*, *F. oxysporum* e *Botryosphaeria* spp. Inoltre, Lacan (2016), a San Francisco (USA), su quercia e mandorlo con sintomi del tutto simili a quelli riscontrati su agrumi ha riscontrato solo batteri.

Diverse altre specie arboree, prevalentemente gelso, olmo, quercia, acero, amarena e pioppo sono segnalate con sintomi simili a quelli prima descritti (Adesemoye et al., 2011; Jones, 2014; Lacan, 2016; Roberts e Tsiang, 2018). In aggiunta vi è da segnalare che la sintomatologia descritta è stata osservata, come caso isolato da uno degli autori della presente nota, già nel 1999 su clementine ‘Comune’ in agro di Massafra (TA) e recentemente da vari agrumicoltori in Puglia ed in zone diverse della Basilicata facendo presumere che il fenomeno sia in aumento.

Ulteriori studi sono necessari (verifica dei postulati di Koch) per chiarire il ruolo, nel determinismo della malattia, giocato da *T. delbrueckii* e *Z. palmae*, noti per le loro capacità fermentative (Horn et al., 2000; Bely et al., 2008), anche in relazione ad altre possibili concause come condizioni climatiche, metodo di coltivazione, cultivar, portinnesto, ecc.

Resta inteso che l'introduzione di materiale vegetale da altri Paesi agrumicoli, oltre al controllo per le malattie da quarantena, deve essere oggetto di valutazione agronomica e anche di eventuali suscettibilità a classiche malattie biotiche ed abiotiche che potrebbero nel tempo influenzare negativamente la coltura, mettendone a rischio la redditività.

Un altro aspetto da considerare sono le problematiche a volte sconosciute che possono manifestarsi dopo vari anni, relative, ad es., alla compatibilità tra varietà con i nuovi portinnesti utilizzati in agrumicoltura. Difatti l'espressione di questo aspetto può essere più o meno ritardata nel tempo, con gravità diversa rispetto al portinnesto in particolare rispetto alle nuove varietà e portinnesti che nel nostro territorio sono state introdotte nell'ultimo decennio.

LAVORI CITATI

- Adesemoye A., Eskalen A., Mayorquin J., Roper C., Wang P., Vidalakis G., Kallsen C., O'Connell N., 2011. Research Project Progress Report. Understanding 'foamy bark rot' of Fukumoto navel. *CRB Funded Research Reports*, 20, 26-28.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman J. D., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Bely M., Stoeckle, P. Masneuf-Pomarède I., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 312-320.
- Childs J.F.L., 1953. An Actinomycete associated with gummosis disease of grapefruit trees. *Phytopathology*, 43, 101-103.
- Jones W. B., 2014. Slim flux diseases of trees. University of Idaho, Extension CIS 1205, USA. Available online: www.extension.uidaho.edu/idahogardens.

- Godfrey G.H., 1946. Infectious wood necrosis and gummosis of citrus. *Lower Rio Grande Valley Citrus Institute Proceedings*, 1, 66-70.
- Horn S. J., Aasen I. M., Østgaard K., 2000. Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24, 51-57.
- Klotz L.J., 1973. Color Handbook of Citrus Diseases. Citrus Research Center of Agricultural Experimental Station, Riverside, California, USA, No.4. ed., 122 pp.
- Lacan I., 2016. When monitoring is the best action the case of two “Flux Diseases”. University of California, USA, Statewide IPM Program, 5 pp. Available Online: [ipm.ucanr.edu/green bulletin](http://ipm.ucanr.edu/green_bulletin).
- Okamoto T., Taguchi H., Nakamura K., Ikenaga H., Kuraishi H., Yamasato K., 1993. *Zymobacter palmae* gen.nov., sp.nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Archives of Microbiology*, 160(5), 333-337.
- Olson E.O., 1952. Investigation of citrus rootstock diseases in Texas. *Rio Grande Valley Horticultural Institute Proceedings*, 6, 28-34.
- Novák E.K., Zsolt J., 1961. A new system proposed for yeasts. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungarica*, 7, 93-145.
- Roberts H., Hsiang T., 2018. Incidence of slim flux in deciduous trees of Southern Ontario. *The Forestry Chronicle*, 94, 151-154.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 27252-729.
- White T.J., Bruns T., Lee J., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., White T.J., Sninsky J.J., Gelfand D.H. (edit.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press Inc. New York, 315-322 pp.
- Young J. P. W., Downer H. L., Eardly B. D., 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *Journal of Bacteriology*, 173, 2271-2277.

