

## LOTTA BIOLOGICA AL TUMORE RADICALE DEL PESCO: ESITI DI UNA PROVA QUINQUENNALE

A. ZOINA\*, A. RAIÒ\*, M. LORITO\*, G. DEL SORBO\*, B. ALOJ\*\*, F. SCALA\*

\* Istituto di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

\*\* Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente. Università degli Studi del Molise - Campobasso.

### RIASSUNTO

Il ceppo antagonista K84 di *Agrobacterium radiobacter* ed un isolato tumorigeno di *Agrobacterium tumefaciens* sono stati impiegati in una prova quinquennale di lotta biologica al tumore radicale del pesco. Sono state analizzate le caratteristiche di 655 ceppi di agrobatteri isolati nel corso degli anni dalle piante ammalatesi. L'efficacia del ceppo K84 nel contenimento della malattia è sempre stata molto elevata. Non si è osservato un effetto selettivo in favore degli agrobatteri tumorigeni insensibili all'antagonista. Nel primo anno della prova sono stati individuati due isolati transconiuganti tumorigeni e produttori di agrocina, ma non si è assistito, in seguito, allo sviluppo di una popolazione di agrobatteri resistenti al ceppo K84.

### SUMMARY

#### **Biological control of peach tree crown gall: results of a quinquennial trial.**

The antagonistic strain K84 of *Agrobacterium radiobacter* and a tumourigenic isolate of *Agrobacterium tumefaciens* were used for the biological control of peach tree crown gall in a five year trial. The experiment was repeatedly conducted in the same plots to assess the effectiveness of the antagonist and verify whether its extended use may induce in the soil the selection of resistant tumourigenic agrobacteria and transconjugant strains. Characteristics of 655 *Agrobacterium* isolates obtained from diseased plants during the five years were analysed. Strain K84 was always very effective for crown gall control. Populations of tumourigenic agrobacteria resistant to the antagonistic strain did not select. In the first year of the trial two transconjugant isolates were detected that were pathogenic, agrocine 84 insensitive and agrocine producer. Proliferation in the soil of these isolates in the successive years was not observed.

### INTRODUZIONE

Il tumore radicale provocato da *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn. è una malattia dei fruttiferi che può causare danni molto gravi specialmente alle produzioni vivaistiche. Contro la malattia non esistono prodotti chimici efficaci ed anche l'impiego di sostanze antibiotiche si è rivelato di scarsa utilità pratica. Molto efficace invece, soprattutto contro il tumore radicale delle drupacee e della rosa si è dimostrata la tecnica di lotta biologica sviluppata da Kerr e collaboratori (Htay e Kerr, 1974) ed ormai ampiamente utilizzata in molti paesi. Essa consiste nel trattare in via preventiva i semi e/o le radici delle piante con una sospensione di un isolato di *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck & Van Delden) Conn. Questo ceppo, denominato K84, colonizza le radici delle piante trattate, compete per il sito di attaccamento con gli agrobatteri tumorigeni presenti nel terreno e ne inibisce lo sviluppo producendo agrocina 84, una batteriocina la cui sintesi è codificata dal

plasmide pAgK84 (Ryder e Jones, 1990).

L'azione del ceppo antagonista, però, può risultare poco efficace in presenza di popolazioni di agrobatteri tumorigeni insensibili alla batteriocina; in campo, inoltre, può verificarsi il trasferimento del plasmide pAgK84 dall'antagonista ad un ceppo tumorigeno, che, divenendo a sua volta produttore dell'agrocina ed insensibile ad essa, acquisterebbe un notevole vantaggio competitivo nei confronti degli altri agrobatteri (Panagopoulos *et al.*, 1978).

La prova su cui si riferisce in questa nota è stata effettuata per verificare l'ipotesi che l'impiego continuato del K84 in uno stesso terreno possa indurre la comparsa di transconiuganti tumorigeni produttori della batteriocina e/o selezionare popolazioni di agrobatteri resistenti vanificando l'efficacia del ceppo antagonista.

## MATERIALI E METODI

### - Ceppi batterici

In tutte le prove è stato utilizzato un ceppo di *A. tumefaciens* isolato da un tumore di pesco selvatico proveniente da un vivaio del comune di Parete (CE). Il ceppo, individuato con la sigla 2p, appartiene alla biovar 2 ed è sensibile all'agrocina 84. Per la protezione delle piantine è stato impiegato il ceppo di *A. radiobacter* NCPPB 2407, comunemente indicato con la sigla K84. Entrambi i ceppi sono stati conservati su silica gel a -20 °C. Tutti gli anni, prima di ogni prova è stata controllata la patogenicità del ceppo 2p e la capacità di produrre agrocina del K84.

### - Protezione ed inoculazione delle piante.

Per i trattamenti sono state impiegate sospensioni di entrambi i batteri contenenti  $1 \times 10^6$  cfu ml<sup>-1</sup>. Sospensioni a titolo determinato spettrofotometricamente, preparate a partire da colture su YDC (Wilson *et al.*, 1967) di 48 ore, sono state diluite, al momento del loro utilizzo, in acqua di pozzo fino alla concentrazione voluta. Tutte le piantine sono state ferite con un ago in due punti della zona del colletto. Il trattamento protettivo veniva effettuato immergendo l'apparato radicale delle piante nella sospensione del ceppo K84 per 5 minuti. L'inoculazione era effettuata, invece, irrorando, fino a gocciolamento, le radici delle piantine con la sospensione del ceppo 2p tramite un nebulizzatore manuale. Le piante testimoni sono state trattate con acqua di pozzo. Le piantine venivano poste a dimora subito dopo il trattamento.

### - Prove in campo

Le prove sono state effettuate a Portici (NA) su un appezzamento di terreno dell'Orto Fitopatologico annesso all'Istituto di Patologia Vegetale. Le prove si sono svolte per sei anni consecutivi, dal 1987 al 1992, assegnando le stesse tesi sempre alle medesime parcelle. Tutte le operazioni colturali sono state effettuate a mano avendo cura di limitare al massimo le contaminazioni tra le parcelle che distavano tra loro 1,5 m. Si sono utilizzati sementali dell'anno di *Prunus persica* S. di provenienza jugoslava, allevati in terriccio sterile. Le tesi sono state distribuite secondo uno schema di randomizzazione completa con tre replicazioni. In ogni parcella (2x3 m) sono state trapiantate 60 piantine poste a distanza di 15 cm sulla fila e 50 cm tra le file. Le tesi a confronto sono state:

- 1) piante protette ed inoculate (P.I.);
- 2) piante protette e non inoculate (P.NI.);
- 3) piante non protette ed inoculate (NP.I.);
- 4) piante non protette e non inoculate (NP.NI.) .

Le prove iniziavano entro il mese di aprile di ciascun anno e terminavano nel dicembre dello stesso anno con l'estirpazione delle piante e la verifica della presenza di tumori al colletto e sulle radici. I valori percentuali, relativi al numero di soggetti malati, trasformati in valori angolari, sono stati sottoposti ad analisi della varianza ed al test di Duncan.

- *Caratterizzazione degli isolati.*

Al termine delle prove da tutte le piante ammalate delle tesi 1, 2 e 4 e da un consistente campione della tesi 3, venivano prelevate porzioni dei tessuti tumorali adatti all'isolamento degli agrobatteri. Le parti non utilizzate dei tumori sviluppatasi sulle piante protette ed inoculate venivano lasciate *in situ* ed interrate. Gli isolamenti sono stati effettuati secondo metodiche descritte in precedenza (Zoina *et al.*, 1992); da ogni tumore sono state scelte 4 - 6 colonie in base a criteri morfologici. Gli isolati sono stati caratterizzati seguendo lo schema di Kerr e Panagopoulos (1977) che suddivide gli agrobatteri in tre biovar. La patogenicità dei batteri è stata verificata inoculandoli nel fusto di piantine di pomodoro (*Lycopersicon esculentum* M.) cv Marmande e, in caso negativo, in datura (*Datura stramonium* L.). La sensibilità degli isolati al ceppo K84 è stata saggiata *in vitro* applicando il metodo di Stonier (1960) modificato da Kerr e Panagopoulos (1977). Con lo stesso metodo è stata verificata la capacità di produrre agrocina attiva contro il ceppo 2p da parte degli agrobatteri bv 2, virulenti e non, isolati dalle piante delle tesi 1 e 2.

RISULTATI

- *Prove di campo*

Nella tabella 1 sono riportati i risultati delle prove effettuate in campo nel corso del quinquennio 1987-1991. I dati sono riportati in termini di percentuali di piante ammalate sul totale delle piante estirpate. Nel 1992 la prova non ha avuto buon esito; la maggior parte delle piantine non ha attecchito e le restanti hanno avuto uno sviluppo molto stentato manifestando evidenti sintomi da stanchezza del terreno. L'insorgenza del fenomeno ha causato l'interruzione della prova.

Tab. 1 Risultati delle prove di lotta biologica (% di piante malate).

	1987	1988	1989	1990	1991
P.I.	35,2 b	4,0 b	0,7 b	14,0 b	3,0 b
P.NI.	2,0 c	0,8 b	2,7 b	0,5 c	0 b
NP.I.	92,4 a	53,7 a	69,7 a	94,4 a	71,5 a
NP.NI.	0,7 c	0 b	5,0 b	1,8 c	2,4 b

Nella stessa colonna i valori seguiti dalle stesse lettere non differiscono significativamente per  $P = 0,01$ . Test di Duncan

- *Caratterizzazione degli isolati.*

Nei cinque anni sono stati isolati batteri da un totale di 183 piante malate di cui 101

provenienti dalla tesi 1 (P.I.), 9 dalla tesi 2 (P.NI.), 59 dalla tesi 3 (P.NI.) e 14 dalla tesi 4 (NP.NI.). Si sono ottenuti complessivamente 915 isolati, 655 dei quali sono stati riconosciuti come agrobatteri. Nelle tabelle 2 e 3 è riportata la loro distribuzione in base alla biovar di appartenenza, alla patogenicità ed alla sensibilità all'agrocina 84.

I due terzi degli agrobatteri afferiscono alla biovar 2 (come i ceppi 2p e K84 usati nelle prove), 137 isolati (21%) hanno le caratteristiche della biovar 1 ed 89 (13,5%) hanno mostrato caratteri intermedi per cui non è stato possibile allocarli in nessuna delle tre biovar individuate da Kerr e Panagopoulos (1977); nessun ceppo ha esibito i caratteri della biovar 3. Quasi la metà degli isolati (319) sono risultati non patogeni e non sensibili (299) all'agrocina 84. Tra i 336 agrobatteri tumorigeni 252 hanno mostrato sensibilità all'agrocina mentre 84 isolati si sono dimostrati insensibili; in quest'ultimo gruppo due ceppi, ottenuti da due diverse piante protette ed inoculate ammalatesi nel corso del primo anno di prova, si sono rivelati anche produttori di agrocina. Da 57 tumori si sono isolati agrobatteri afferenti a due o più biovar, nei rimanenti 126 si è sviluppata invece una popolazione apparentemente più omogenea.

Tab. 2 Distribuzione degli isolati di *Agrobacterium* in base alla patogenicità ed alla sensibilità *in vitro* al ceppo K84

	Tumorigeni		Non tumorigeni		Tot	%
	S	NS	S	NS		
biovar 1	1	6	4	126	137	21,0
biovar 2	243	67	4	115	429	65,5
nd	8	11	12	58	89	13,5
Tot	252	84	20	299	655	

S, NS = rispettivamente sensibili ed insensibili *in vitro* al ceppo K84; nd = non determinati

Tab. 3 Distribuzione degli isolati di *Agrobacterium* in base alla tesi di provenienza ed alla patogenicità.

	P.I.		P. NI.		N.PI.		NP.NI.		Tot
	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	
biovar 1	2	60	2	-	3	54	-	16	137
biovar 2	73	83	11	5	198	26	28	5	429
nd	10	16	-	2	5	46	4	6	89
Tot	85	159	13	7	206	126	32	27	655

T = tumorigeni; NT = non tumorigeni; nd = non determinati.

## CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti si può constatare l'elevata e costante efficacia del ceppo K84 nel prevenire l'insorgenza dei tumori. In tutti gli anni le piante protette ed inoculate si sono ammalate in percentuali significativamente più basse di quelle non protette; nel 1988, 1989 e 1991 la protezione è stata totale se si considera che le piante trattate con il ceppo K84 sono state colpite nella stessa misura dei testimoni non inoculati malgrado la progressiva esasperazione delle condizioni in cui la prova si è svolta.

Sull'origine degli isolati ottenuti dai tumori analizzati in laboratorio si possono, in questa sede, solo affacciare alcune supposizioni. Gli afferenti alla biovar 1 possono essere considerati autoctoni; essi sono in gran parte non patogeni ed insensibili al K84. La stessa considerazione vale per gli indeterminati, con in più l'ipotesi che parte di essi possano essere discendenti dei due ceppi utilizzati nella prova, ma che una qualche loro alterazione metabolica non abbia consentito di inquadrarli in nessuna delle biovar finora definite. I 243 isolati bv 2, tumorigeni e sensibili al K84 sono verosimilmente discendenti del ceppo 2p usato per le inoculazioni; gli altri isolati bv 2 possono essere agrobatteri autoctoni o derivati dal 2p divenuti insensibili all'agrocina in seguito a perdita o ad alterazione del plasmide Ti che conferisce la patogenicità e la sensibilità alla batteriocina (Engler *et al.*, 1975). Tra i 115 agrobatteri non patogeni ed insensibili 17 sono da considerare discendenti del K84 in quanto produttori di agrocina.

L'eterogeneità delle forme batteriche ritrovate conferma il fatto che i tumori costituiscono una nicchia che può essere sfruttata anche da agrobatteri non tumorigeni opportunisti e da altri batteri, prevalentemente pseudomonadi (Canfield e Moore, 1991), capaci di utilizzare il tipo di opina sintetizzata dalle cellule tumorali.

La pressione esercitata dall'impiego continuato del ceppo K84 non ha indotto, nel corso dei cinque anni la selezione di popolazioni di agrobatteri tumorigeni insensibili all'azione dell'antagonista il quale ha sempre contenuto la malattia a livelli piuttosto bassi. Tra gli isolati della prima prova del 1987 sono stati individuati due transconiuganti, derivati cioè dal trasferimento del plasmide pAgK84 da agrobatteri K84 a batteri patogeni 2p che sono così divenuti produttori di agrocina ed insensibili ad essa. Probabilmente nel corso di quella prova sono venute a crearsi, con una frequenza maggiore che nelle successive, le condizioni che rendono possibile il trasferimento del plasmide pAgK84. Nella prima prova infatti, è piuttosto alta (35,2%) la percentuale delle piante malate della tesi 1 (P.I.) e sembra che nel terreno sia proprio la secrezione di opine da parte di tumori in attivo sviluppo a favorire lo scambio di materiale genetico tra gli agrobatteri (Ellis *et al.* 1979, Kerr 1980). Nelle prove degli anni successivi questo fenomeno non è più stato evidenziato, nè si è riscontrato nelle parcelle della tesi 1 l'insediamento di una popolazione di transconiuganti pericolosi.

Per ovviare comunque a questa possibilità, da più parti paventata, è stato prodotto, tramite tecniche di ingegneria genetica, un derivato del ceppo K84 che di questo conserva le capacità antagonistiche, ma che non è in grado di trasferire ad altri agrobatteri il plasmide pAgK84 (Jones e Kerr, 1989). Il ceppo, denominato K1026, è un microrganismo geneticamente ingegnerizzato per cui la sua utilizzazione è regolata dalle disposizioni vigenti nei diversi paesi; in Nuova Zelanda ed in Australia il suo impiego commerciale è stato autorizzato già da alcuni anni. L'Italia, come altri paesi europei, ha recepito con il DL 3/3/93 n.92 la direttiva CEE 90/220 relativa all'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati, per cui è ipotizzabile che in futuro anche nel nostro paese il ceppo K1026 potrà essere utilizzato da vivaisti e frutticoltori. Fino ad allora, stando ai dati suesposti ed agli esiti di precedenti indagini (Zoina *et al.*, 1992) il ceppo K84, se

correttamente applicato, potrà essere impiegato senza eccessivi timori.

#### LAVORI CITATI

CANFIELD M.L. and MOORE L.W., (1991). Isolation and characterization of opine-utilizing strains of *Agrobacterium tumefaciens* and fluorescent strains of *Pseudomonas* spp. from rootstocks of *Malus*. *Phytopathology*, 81, 440-443.

ELLIS J.G., KERR A., VAN MONTAGU M., SCHELL J., (1979). *Agrobacterium*: genetic studies on agrocin 84 production and the biological control of crown gall. *Physiological Plant Pathology*, 15, 311-319.

ENGLER G., HOLSTERS M., VAN MONTAGU M., SHELL J., HERNALSTEENS J.P., SCHILPEROORT R., (1975). Agrocin 84 sensitivity: a plasmid determined property in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genetics*, 138, 345-349.

HTAY K., KERR A., (1974). Biological control of crown gall. Seed and root inoculation. *J. Appl. Bact.*, 37, 525-530.

JONES D.A., KERR A., (1989) *Agrobacterium radiobacter* K1026, a genetically-engineered derivative of strain K84, for biological control of crown gall. *Plant Disease* 73, 15-18.

KERR A., PANAGOPOULOS C.G., (1977). Biotypes of *A. radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopath. Z.* 90, 172-179.

PANAGOPOULOS C.G., PSALLIDAS P.G., ALAVIZATOS A., (1978). Evidence of a breakdown in the effectiveness of biological control of crown gall. 3th Int. Congr. Pl. Path., Munchen, 16-23 Aug. 184 (abstr).

RYDER M.H., JONES D.A., (1990). Biological control of crown gall. In: Hornby D. (ed.) *Biological control of soil-borne plant pathogens*. C.A.B. International, 45-64.

STONIER T., (1960). *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance. *J. Bact.*, 79, 889-898.

WILSON E.E., ZEITOUN F.M., FREDRICKSON D.L., (1967). Bacterial phloem canker, a new disease of persian walnut trees. *Phytopathology*, 57, 618-621.

ZOINA A., RAIÒ A., ALOJ B., (1992). Caratterizzazione di isolati di *Agrobacterium* da vivai dell'Italia centro-meridionale. *Atti Giornate fitopatologiche*, 2, 389-398.