

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI ALCUNI MEZZI DI PREVENZIONE DEL TUMORE RADICALE DEI FRUTTIFERI

A. RAIO ⁽¹⁾, G. PUOPOLO ⁽²⁾, R. PELUSO ⁽²⁾, A. ZOINA ⁽²⁾

⁽¹⁾Istit. per la Protezione delle Piante – Sez. di Portici. Via Università, 100. 80055 Portici (NA)

⁽²⁾ARBOPAVE – Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Via Università, 100. 80055 Portici (NA) – raio@unina.it

RIASSUNTO

L'impiego del ceppo antagonista K84, della solarizzazione e di portinnesti resistenti rappresentano tre possibili strategie di controllo del tumore radicale dei fruttiferi. In questo lavoro sono riportati parte dei risultati delle nostre sperimentazioni relative ai tre metodi di controllo svolte negli ultimi anni.

Parole chiave: tumore radicale, solarizzazione, portinnesti resistenti, K84

SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFICACY OF SOME METHODS FOR CROWN GALL DISEASE CONTROL

The biological control method by the use of the strain K84, solarization and resistant rootstocks represent three strategies for controlling crown gall. Part of the results of the trials regarding the three methods of control performed by our team during the last years are reported in this work.

Key words: crown gall, solarization, resistant rootstocks, K84

INTRODUZIONE

Il tumore radicale causato dal batterio *Agrobacterium tumefaciens* rappresenta una delle malattie più dannose per molte produzioni vivaistiche. Drupacee, pomacee, vite ed alcune ornamentali come rosa e crisantemo sono colture sensibili all'attacco del patogeno e non possono essere commercializzate se evidenziano i sintomi della malattia. Il metodo di lotta biologica con il ceppo di agrobatterio non virulento K84 rappresenta il metodo più diffuso per prevenire lo sviluppo della malattia, ma non è sempre efficace. L'insorgenza di ceppi virulenti resistenti all'azione dell'antagonista che possono originarsi in seguito a scambi plasmidici tra il K84 e ceppi tumorigeni residenti nel terreno può rappresentare un serio rischio per l'applicabilità del metodo di lotta. In questo lavoro è stata valutata l'efficacia in vivaio del metodo di lotta biologica con il ceppo K84 e della solarizzazione; inoltre si riportano i risultati di prove di valutazione della sensibilità di portinnesti di drupacee al tumore radicale.

MATERIALI E METODI

Prove di solarizzazione

Prove di solarizzazione sono state condotte in diversi anni e località geografiche e in terreni di diversa struttura. Le parcelle venivano coperte con un telo di polietilene per la durata di circa 8 settimane (luglio-agosto) nel corso delle quali venivano monitorate la temperatura del terreno e la concentrazione degli agrobatteri presenti in parcelle inoculate.

Valutazione della sensibilità di portinnesti di drupacee

I portinnesti Barrier, Cadaman, GF 305, GF677, Julio Ferdor, Istahra, Mariana GF 8-1, Mirabolano, 29C, Montclair, Mr.S 2/5 e P.S. sono stati inoculati con due ceppi di *Agrobacterium tumefaciens*. In aprile, tre gruppi di 16 piante per ogni combinazione ceppo/portinnesto, sono state poste in vasi contenenti terreno sterile e inoculate con una

sospensione batterica avente una concentrazione di 10^7 cfu/ml. I portinnesti sono stati inoculati due mesi dopo sulla parte aerea utilizzando gli stessi ceppi usati per l'inoculazione delle radici. I risultati delle inoculazioni sono stati rilevati in dicembre. La sensibilità dei diversi portinnesti è stata valutata considerando la percentuale di piante con tumori sulle radici, la percentuale dei punti di inoculo positivi e il peso dei tumori. I dati sono stati analizzati statisticamente con il test di Duncan.

Valutazione dell'efficacia del ceppo antagonista K84

Nove aziende vivaistiche dell'Italia Meridionale che impiegano il ceppo K84 per la protezione delle piantine di pesco sono state oggetto di uno studio per valutare l'efficacia del metodo di lotta biologica per controllo del tumore radicale dei fruttiferi. Dai tumori provenienti dalle piante di pesco tumorate sono stati isolati gli agrobatteri mediante substrati selettivi specifici; gli isolati sono stati poi caratterizzati per biovar (saggi biochimico-fisiologici), patogenicità (inoculazione su piante test) e capacità di produrre sostanze ad attività antibiotica in vitro (Metodo Stonier).

Per verificare l'eventuale selezione di ceppi transconiuganti è stato utilizzato il metodo dell'ibridazione su colonia con la sonda *tmsI-tmr* specifica per l'identificazione di una sequenza del plasmide Ti (codificante per l'induzione tumorale negli agrobatteri tumorigeni) e con la sonda *agn* specifica per l'identificazione di una sequenza del plasmide pAgK84 (codificante per la produzione di agrocin 84 per il ceppo K84). L'analisi del profilo plasmidico e della regione ribosomiale 16S+IGS sono state effettuate per evidenziare l'eventuale trasferimento di uno dei plasmidi e i genotipi coinvolti nello scambio.

RISULTATI

Prove di solarizzazione

La temperatura del terreno nelle parcelle solarizzate è risultata mediamente di circa 10°C superiore rispetto alle parcelle non trattate raggiungendo nel corso delle diverse prove temperature di $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$. L'incremento di temperatura ha sempre determinato una riduzione della concentrazione delle popolazioni agrobatteriche, più marcata nei terreni sabbiosi che nei terreni limo-argillosi (tabella 1). Concentrazioni elevate di agrobatteri sono state rilevate nella rizosfera di piante spontanee cresciute ai bordi delle parcelle solarizzate; questi agrobatteri possono rappresentare una fonte di ricontaminazione delle superfici trattate.

Tabella 1 – Concentrazione degli agrobatteri (cfu/g di terreno) rilevate nel corso dei due mesi di trattamento

		Inizio prova	2 settimane	4 settimane	6 settimane	8 settimane
Terreno sabbioso	Solarizzato	$3,2 \times 10^6$	$8,1 \times 10^4$	0	0	0
	Controllo	$3,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$3,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$3,8 \times 10^3$
Terreno argilloso	Solarizzato	$5,2 \times 10^5$	$5,4 \times 10^4$	$7,2 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
	Controllo	$5,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$8,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$

Valutazione della sensibilità di portinnesti di drupacee

Sia le inoculazioni delle radici che quelle effettuate sulla parte epigea hanno evidenziato che un solo portinnesto, l'Mr.S.2/5, è scarsamente sensibile al tumore radicale (tabelle 2 e 3) mentre gli altri 9 portinnesti sono risultati altamente suscettibili.

Tabella 2 – Incidenza di malattia e media del peso (g) dei tumori sviluppatasi sull'apparato radicale

Portinnesti	C58		AT20.5	
	Incidenza di malattia (%)	Peso medio tumori (g)	Incidenza di malattia (%)	Peso medio tumori (g)
Barrier	9 abc	1,8 bcd	20 ab	4,7 cde
Cadaman	16 abc	5,8 bc	33 a	12 b
GF305	18 ab	6,3 b	16 abc	20,7 a
GF677	13 abc	0,8 bcd	24 ab	10,7 bc
Julior Ferdor	21 a	2,3 bcd	26 ab	10,4 bc
Istahra	4 bc	0,6 cd	11 bc	3,4 de
GF 8/1	11 abc	11,6 a	12 bc	8,7 bcd
Myrobalan	8 abc	6,3 b	17 ab	13,2 b
Montclair	9 abc	14,2 a	32 a	4,2 de
Mr.S. 2/5	0 c	0 d	0 c	0 e
P.S.	4 bc	0,9 bcd	12 bc	11 b

Tabella 3 – Percentuale di inoculazioni positive (%) e peso dei tumori (g) rilevati sulla parte aerea dei portinnesti

Portinnesti	C58 (%)	C58 (g)	AT20.5 (%)	AT20.5 (g)
Barrier	91,6 ab	0,7 ef	97,9 ab	2,1 cd
Cadaman	94,8 a	1,3 de	97,9 ab	2,6 bcd
GF305	96,9 a	1,3 de	97,9 ab	2,1 cd
GF677	94,8 a	1,9 cd	87,5 b	1,9 de
Julior Ferdor	80,2 b	2,4 bc	92,7 ab	3,2 b
Istahra	91,6 ab	0,7 ef	96,9 ab	0,7 f
GF 8/1	89,6 ab	1,5 de	95,8 ab	1,0 ef
Myrobalan	97,9 a	3,9 a	100 a	3,1 bc
Montclair	97,9 a	3,1 ab	97,9 ab	3,47 b
Mr.S. 2/5	17,7 c	0,2 f	14,5 c	0,2 f
P.S.	100 a	3,6 a	97,9 ab	5,7 a

Valutazione dell'efficacia del ceppo antagonista K84

Nel corso dello studio, in otto aziende vivaistiche l'efficacia di protezione delle piantine di pesco in vivaio esplicata dal ceppo K84 è risultata sempre molto elevata (97-99%). In alcune parcelle di un solo vivaio è stata rilevata un'elevata incidenza di tumore radicale su astoni di pesco di due anni relativamente elevata (5-8%). Dai tumori sono stati isolati agrobatteri tumorigeni e produttori di agrocina che potevano essere considerati potenziali transconiuganti. L'analisi molecolare ha confermato che questi isolati possedevano sia il plasmide Ti che il plasmide pAgK84 e che quest'ultimo era stato trasferito dal ceppo K84 a ceppi di agrobatteri autoctoni.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il tipo di struttura del terreno è un fattore che ha fortemente influenzato l'esito delle prove di solarizzazione. Il trattamento è infatti risultato efficace nel terreno sabbioso ma ha avuto solo un'azione parziale sulla riduzione della concentrazione degli agrobatteri nel terreno argilloso. In entrambi i terreni, la rizosfera delle piante spontanee cresciute ai bordi delle parcelle

solarizzate costituiva una potenziale sorgente di ricontaminazione dei terreni. La solarizzazione non ha quindi consentito l'eradicazione del patogeno dal terreno ma solo una riduzione nella concentrazione.

La solarizzazione è efficace nel ridurre la concentrazione di alcuni funghi fitopatogeni terricoli, di nematodi e anche di alcune infestanti e non ha effetto nei confronti di microrganismi terricoli potenzialmente utili (Katan, 1991; Raio *et al.*, 1997). Per i numerosi effetti benefici la solarizzazione deve essere considerata un metodo di risanamento del terreno ad ampio spettro più che un metodo di controllo di specifici fitopatogeni.

L'impiego di genotipi resistenti al tumore radicale rappresenta un modo di ridurre le perdite economiche in vivaio dovute allo scarto delle piante tumorate. I risultati delle nostre sperimentazioni hanno evidenziato che tra i portinnesti considerati, solo l'Mr.S2/5 può essere considerato resistente al tumore radicale (Zoina e Raio, 1999). Questo è un ibrido *Prunus cerasifera* x *Prunus spinosa* particolarmente adatto per i terreni molto fertili dove riduce la vigoria delle piante, per i terreni asfittici o per quelli affetti da stanchezza. Non è uno dei più utilizzati in peschicoltura per la scarsa compatibilità con alcune varietà di pesco (Loreti *et al.*, 1989).

La protezione delle piante con l'antagonista K84 è risultato nel corso di diversi anni di sperimentazione un metodo molto efficace. L'incidenza media del tumore batterico è risultata dello 0,02% contro il 3,6% riscontrato nelle parcelle testimoni (Zoina *et al.*, 2003). Il controllo biologico con il ceppo K84 è tuttora il metodo di lotta al tumore batterico più efficace, semplice, e privo di rischi per l'uomo. In una sola delle aziende considerate nel corso del monitoraggio, è stata rilevata una riduzione nella capacità di controllo della malattia associata alla selezione di ceppi transconiuganti che avevano avuto origine dal trasferimento del plasmide pAgK84 a ceppi di agrobatteri tumorigeni autoctoni. Questi ceppi transconiuganti rappresentano un serio rischio per l'applicabilità del metodo di lotta biologica perché sono tumorigeni, produttori di agrocina e resistenti ad essa. Nel 1988 Jones *et al.* hanno ottenuto mediante tecniche di ingegneria genetica un derivato del ceppo K84, denominato K1026, incapace di trasferire il plasmide pAgK84 ad altri organismi. Il ceppo K1026 possiede la stessa attività di biocontrollo del ceppo K84 e previene l'insorgenza di popolazioni ricombinanti resistenti. L'impiego commerciale del K1026 non è ancora consentito nei paesi europei perché regolamentato secondo le norme vigenti per gli organismi geneticamente modificati (OGM) anche se il ceppo K1026 è stato ottenuto attraverso la delezione di una porzione del DNA plasmidico (regione Tra) che regola il trasferimento del pAgK84 e non possiede DNA esogeno.

LAVORI CITATI

- JONES, D.A., RYDER, M.H., CLARE, B.G., FARRAND, S.K. and KERR A. 1988. Construction of a Tra⁻ deletion mutant of pAgK84 to safeguard the biological control of crown gall. *Molecular and General Genetics*, 212, 207-214.
- KATAN J., and DE VAY J.E., 1991. Soil solarization. Boca Raton. Florida, CRC Press, Inc.
- LORETI F., GUERRIERO R., MASSAI R., 1989. Una nuova ed interessante selezione di susini portinnesti: l'Mr.S.2/5. *Agricoltura e Ricerca* 11, 45-50.
- RAIO, A., ZOINA, A. and MOORE, L W. 1997. The effect of solar heating of soil on natural and inoculated agrobacteria. *Plant Pathology*, 46, 320-328.
- ZOINA, A , PELUSO, R., SIGILLO, L. RAIO A. 2003. Efficacia di diverse modalità di lotta al tumore batterico dei fruttiferi. *Informatore Agrario*, 16, 69-71.
- ZOINA A., RAIO A. (1999) Susceptibility of some peach rootstocks to crown gall. *J. Plant Pathology*. 81, 181-187.