

CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA E PATOGENICITA' DI ISOLATI DI *RHIZOCTONIA SOLANI* AG-4 DA TABACCO

E. LAHOZ¹, R. NICOLETTI¹, R. CONTILLO¹, L. LUONGO², L. CORAZZA²

¹ Istituto Sperimentale per il Tabacco, Via P. Vitiello, 66 - 84018 Scafati (SA)

² Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero, 22 - 00156 Roma

Riassunto

Tra i gruppi di anastomosi di *Rhizoctonia solani*, AG-4 dimostra di essere quello dotato del più ampio grado di polifagia; questo dato, confermato anche relativamente al nostro Paese, non è stato finora associato ad evidenze di specializzazione parassitaria. Un campione di 10 isolati ottenuti da piante di tabacco con sintomi di rizottoniosi è stato valutato per alcuni aspetti di carattere biologico e dal punto di vista del comportamento patogenetico nei confronti di altre 5 colture (fagiolo, kenaf, melone, peperone, pomodoro) sulle quali sono note segnalazioni in Italia. I risultati evidenziano che, pur essendo possibile delineare gruppi omogenei sulla base dei profili elettroforetici di isoenzimi pectici, l'attitudine patogenetica e la virulenza non sono correlate all'appartenenza ad un determinato gruppo né variano apprezzabilmente con la pianta ospite considerata.

Parole chiave: *Rhizoctonia solani* AG-4, patogenicità, tabacco.

Summary

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY OF *RHIZOCTONIA SOLANI* AG-4 ISOLATES FROM TOBACCO.

Among *Rhizoctonia solani* anastomosis groups, AG-4 is the most polyphagous one; yet no evidence of parasitic specialization towards any crop has been proved. 10 isolates from diseased tobacco plants were evaluated with reference to some biological aspects, as well as to their pathogenic behaviour against 5 plant species (common bean, kenaf, melon, pepper, tomato) from which AG-4 has also been recovered in Italy. Results showed the isolates could be arranged into at least 2 homogeneous groups according to the electrophoretic patterns of pectic isozymes. However both pathogenicity and virulence were not correlated to their belonging to any group.

Key words: *Rhizoctonia solani* AG-4, pathogenicity, tobacco.

Introduzione

Rhizoctonia solani Kühn, anamorfo di *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, è un micete a diffusione cosmopolita caratterizzato da un grado di polifagia estremamente ampio. A differenza di altri funghi polifagi, nella specie in oggetto sono state finora riscontrate limitate evidenze di specializzazione parassitaria e correntemente il criterio di differenziazione in raggruppamenti infraspecifici è basato sul concetto di gruppo di anastomosi (AG) (Parmeter *et al.*, 1969).

Al momento sono noti 12 distinti gruppi di anastomosi (Carling *et al.*, 1994), alcuni dei quali ulteriormente divisi in sottogruppi. AG-4 è quello ritrovato sul maggior numero di specie vegetali e, in base ai dati disponibili, quello più diffuso nel nostro Paese (Corazza *et al.*, 1995). Inoltre, a differenza di altri AG, appare ecologicamente vincolato agli strati superficiali del terreno e manifesta spiccata preferenza per la parte basale delle piante ospiti, tanto da poter essere considerato il principale agente di marciume del colletto (Ogoshi, 1987).

A differenza di quanto si osserva in altri AG, gli isolati di AG-4 appaiono piuttosto uniformi e peculiari dal punto di vista morfologico, tanto che, facendo riferimento anche a caratteristiche inerenti la forma perfetta, ne è stata proposta la collocazione in una specie a sé stante, *Rhizoctonia praticola* Kotila (Anderson, 1982); per altri versi, tra le varie tecniche di laboratorio finora impiegate, solo l'analisi del DNA ha consentito l'evidenziazione di due sottogruppi (Nicoletti e Pasini, 1991). L'elevato grado di omogeneità appare in contrasto con il comportamento polifago; d'altro canto, isolati di AG-4 provenienti da una stessa

specie vegetale mostrano sovente grado di virulenza assai variabile, come è stato recentemente messo in evidenza nel caso del tabacco (Nicoletti e Lahoz, 1995).

Il presente lavoro costituisce un approfondimento dello studio della variabilità del comportamento patogenetico di isolati di *R. solani* AG-4 da tabacco, attraverso la valutazione comparativa di alcune caratteristiche fisiologiche (crescita in coltura a diverse temperature, interazioni somatiche, profili isoenzimatici di poligalatturonasi) e dell'attitudine parassitaria nei confronti di alcune specie vegetali sulle quali questo gruppo di anastomosi è stato segnalato in Italia.

Materiali e Metodi

Sono stati impiegati 10 isolati di *R. solani* AG-4 ottenuti da piante di tabacco con sintomi di rizottoniosi (avvizzimento o necrosi corticale), provenienti da coltivazioni ubicate in Campania e Puglia (tab. 1). Per il dettaglio sulle procedure di isolamento del fungo e di determinazione della specie e del gruppo di anastomosi di appartenenza si rimanda ad un precedente lavoro (Nicoletti e Lahoz, 1995).

Tab. 1 - Isolati di *R. solani* AG-4 da tabacco saggiati.

Isolato	Provenienza	Sintomi
RT4	Scafati (SA)	Avvizzimento
RT10	Benevento	Necrosi corticale
RT21	Maddaloni (CE)	Necrosi corticale
RT22	Montesarchio (BN)	Avvizzimento
RT25	S. Giorgio del Sannio (BN)	Necrosi corticale
RT30	Bellona (CE)	Necrosi corticale
RT31	Marcianise (CE)	Necrosi corticale
RT32	S. Giorgio del Sannio (BN)	Necrosi corticale
RTL7	Monteroni (LE)	Avvizzimento
RTL8	Monteroni (LE)	Avvizzimento

Accrescimento *in vitro* a diverse temperature. È stato valutato su agar patate destrosio (PDA) collocando al centro di capsule Petri (diametro 9 cm) un dischetto miceliare di 7 mm prelevato da una coltura in attiva crescita. Le temperature saggiate sono state: 16, 20, 25 e 30°C. I rilievi hanno riguardato la misura del diametro delle colture ogni 24 ore ed il tempo occorrente per la colonizzazione completa della capsula. Per ciascuna temperatura e per ciascun isolato sono state effettuate 5 repliche.

Interazioni somatiche. Sono state valutate mediante confronto su agar acqua al 2% (Parmeter *et al.*, 1969), con rilevazione della frequenza relativa di anastomosi (FF) e classificazione in 3 gruppi (FF < 30%, 30% < FF < 50%, FF > 50%) (Ogoshi, 1975). Inoltre gli isolati sono stati confrontati su PDA addizionato dell'1% di carbone attivo per la valutazione della eventuale comparsa di zonature rilevate ("tufts"). A tal fine sono state distinte due categorie, la prima con zonature uniformi e di sviluppo superiore a 5 mm (T), la seconda con zonature meno nette e di sviluppo inferiore (t) (Cubeta *et al.*, 1993). Il saggio è stato condotto utilizzando direttamente gli isolati di campo (Shew e Melton, 1995).

Elettroforesi. La valutazione dei profili di isoenzimi poligalatturonasici è stata effettuata su gel di pectina-poliacrilamide secondo la metodica messa a punto da Cruickshank e Wade (1980), parzialmente modificata. La matrice costruita in base a presenza-assenza delle bande in funzione del valore di R_f è stata utilizzata per l'analisi dei raggruppamenti ("clusters"), utilizzando un algoritmo basato sulla distanza euclidea ed il criterio del vicino più lontano.

Prove di patogenicità. Sono state effettuate utilizzando 6 specie vegetali: fagiolo (*Phaseolus vulgaris*) cv Lingot, kenaf (*Hibiscus cannabinus*), melone (*Cucumis melo*) cv Supermarket, peperone (*Capsicum annuum*) cv Quadrato d'Asti, pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) cv Roma, tabacco (*Nicotiana tabacum*) cv Burley 64. L'inoculo è stato preparato trasferendo 5 dischetti di micelio prelevati da colture su PDA in beute contenenti 100 g di un substrato sterile costituito da sabbia, perlite e farina di mais (4%), umidificato con 40 ml di acqua distillata. Dopo 18 giorni di incubazione a 25±2°C la coltura è stata mescolata a terreno sterile nella misura del 2%. Contenitori di polistirolo con fori del diametro di 6 cm sono stati riempiti con la miscela in cui sono state successivamente trapiantate, dopo l'emissione delle

prime 2 foglie, 40 plantule di ciascuna specie. I contenitori con le piante testimone sono stati riempiti con la medesima miscela terreno-substrato privo di inoculo. I rilievi sono stati eseguiti 20 giorni dopo il trapianto, sulla base di una scala empirica di gravità di attacco da 0 (pianta sana) a 4 (pianta morta); i dati ottenuti sono stati trasformati in indice di gravità secondo Mc Kinney e sottoposti ad analisi della varianza. A fine prova per ogni isolato e per ciascuna specie sono state prelevate 4 piante da cui è stato operato il reisolamento del fungo.

Risultati

Accrescimento in vitro a diverse temperature. Risultati omogenei sono stati riscontrati alle temperature saggiate, con oscillazioni più marcate a 20 e 16°C. D'altra parte in *R. solani* è noto che a basse temperature la fase iniziale dell'accrescimento è ritardata. Tutti gli isolati sono cresciuti più velocemente a 30°C che è ritenuta temperatura vicina al limite di crescita per *R. solani* (Sherwood, 1970). Questo comportamento può porsi in relazione con il ciclo di coltivazione estivo del tabacco, a conferma dell'opinione corrente in base alla quale i fattori ambientali giocano un ruolo preponderante nel determinare la capacità patogenetica.

Interazioni somatiche. I confronti effettuati per l'osservazione delle anastomosi ifali in tutte le possibili combinazioni (tab. 2) hanno mostrato che non esistono nell'ambito del campione esaminato sottogruppi omogenei con una maggiore affinità, a differenza di quanto si osserva in altri gruppi di anastomosi (es. AG-2).

Tabella 2 - Frequenza di anastomosi (FF) tra gli isolati.

	RT4	RT10	RT22	RT25	RT30	RT31	RT32	RTL7	RTL8
RT4	*	M	L	L	L	H	L	L	L
RT10		*	M	H	H	L	L	H	L
RT22			*	H	L	M	H	M	L
RT25				*	L	L	H	H	M
RT30					*	H	M	L	M
RT31						*	L	L	M
RT32							*	H	H
RTL7								*	H
RTL8									*

L = FF < 30%
M = 30% < FF < 50%
H = FF > 50%

La formazione di zonature rilevate su PDA + carbone attivo si osserva allorché vengono confrontati due isolati geneticamente differenziati se appartenenti allo stesso gruppo di anastomosi, mentre non compare quando vengono confrontati isolati appartenenti ad AG differenti, oppure in caso di isolati clonali. Dalle interazioni osservate è risultato un comportamento variabile a seconda della coppia di isolati presa in considerazione (tab. 3).

Tabella 3 - Tipo di interazione somatica rilevata su PDA + carbone attivato.

	RT4	RT10	RT22	RT25	RT30	RT31	RT32	RTL7	RTL8
RT4	*	T	t	t	T	T	T	T	t
RT10		*	t	T	T	T	T	t	t
RT22			*	t	t	T	t	T	T
RT25				*	T	T	N	t	T
RT30					*	T	T	T	t
RT31						*	t	t	T
RT32							*	t	T
RTL7								*	t
RTL8									*

T = "tuft" > 5 mm
t = "tuft" < 5 mm
N = assenza di "tuft"

In un solo caso, RT25-RT32, è stato osservato che l'incontro delle ife non dava luogo ad interazioni macroscopiche particolari, cosa che depone per la loro origine clonale; d'altra

parte gli isolamenti sono stati effettuati nel medesimo areale, anche se da coltivazioni differenti. Nei rimanenti appaiamenti è stata rilevata la formazione di zonature di diversa consistenza.

Elettroforesi. I profili ottenuti dall'elettroforesi di isopoligalatturonasi sono riportati in figura 1.

Figura 1 - Diagramma delle bande di isopoligalatturonasi su gel di pectina-poliacrilamide.

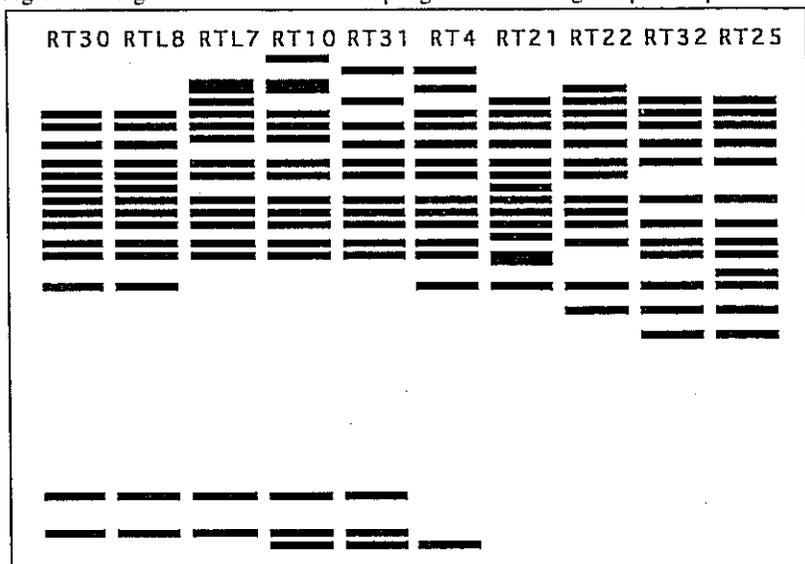
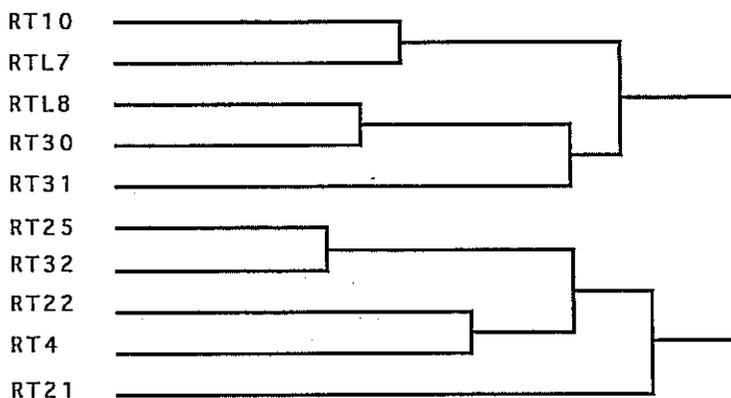


Figura 2 - Dendrogramma dell'analisi dei cluster in base alle posizioni delle bande di isopoligalatturonasi



Il dendrogramma ottenuto (fig. 2) mostra due raggruppamenti che si differenziano in corrispondenza dell'80% della distanza massima; la presenza di bande con R_f intorno a 0,8 sembra essere l'elemento discriminante principale.

Nonostante l'esiguità del campione proveniente da un'area geograficamente ampia non consenta di avere una idea precisa sull'effettiva variabilità genetica presente tra isolati di AG-4 da tabacco, si ritiene comunque significativa la notevole eterogeneità mostrata. In ogni caso i raggruppamenti non risultano correlabili ad alcuno dei parametri valutati.

Patogenicità. Gli indici di Mc Kinney relativi alla gravità della malattia sono riportati in tabella 4.

Tabella 4 - Indici di gravità della malattia.

	RTL7	RT21	RT10	RTL8	RT30	RT31	RT32	RT22	RT25	RT4	\bar{x}
fagiolo	99	72	71	75	71	46	72	72	75	49	70
kenaf	87	85	63	44	59	64	59	47	58	68	63
tabacco	87	71	63	48	86	30	54	50	53	33	57
pomodoro	76	69	58	52	66	63	39	52	38	35	55
melone	100	94	63	62	37	38	27	57	23	15	52
peperone	31	11	48	75	35	66	52	27	55	53	45
\bar{x}	80	67	61	59	59	51	51	51	50	42	
DMS											
		P=0.05		P=0.01							
Specie (a)		10.6		13.9							
Isolato (b)		13.6		17.9							
Interazione (axb)		33.4		43.9							

Tutti gli isolati sono risultati patogeni per le specie saggiate. RTL7 ed RT21 si sono rivelati i più virulenti su tutte le specie ad eccezione del peperone, mentre RT4 è risultato mediamente il meno virulento. RT10 ha mostrato la maggiore uniformità in termini di virulenza sulle varie specie, mentre la maggiore dispersione dell'indice di gravità è stata registrata per RT4. Tra le specie, il fagiolo ed il kenaf sono risultate più suscettibili, mentre il peperone è stata la meno colpita. Il melone sembra essere la più idonea per valutare il grado di virulenza degli isolati; infatti ha denotato un comportamento molto differenziato, passando dal 100% di attacco con RTL7 al 14% con RT4. Il fagiolo al contrario ha avuto una risposta omogenea verso tutti gli isolati.

Conclusioni

Dai dati esposti si evince che gli isolati di *R. solani* AG-4 da tabacco non presentano alcun livello di specializzazione parassitaria, avendo determinato malattia, con diverso grado di virulenza, su specie botaniche appartenenti a famiglie diverse. Anche se le differenze dell'indice di gravità sono apparse significative in alcuni casi, tali variazioni sono distribuite in maniera continua e non appaiono collegabili con le caratteristiche biologiche esaminate. In particolare l'analisi statistica dei profili elettroforetici ha separato due gruppi i quali però non sono risultati omogenei per nessuno degli altri parametri. Ciò è indirettamente confermato anche dal comportamento osservato nelle interazioni somatiche, indicante che le popolazioni di *R. solani* AG-4 presenti nelle aree di coltivazione del tabacco esplorate sono geneticamente eterogenee.

La caratterizzazione dei gruppi di anastomosi di *R. solani* su singole colture risolve solo in parte le esigenze conoscitive finalizzate al miglioramento genetico per la resistenza. Ad esempio su tabacco sono noti almeno cinque gruppi di anastomosi (Nicoletti e Lahoz, 1995); tra questi AG-3 sembra avere una sfera di competenza limitata all'apparato fogliare (Shew e Melton, 1995) mentre AG-4 risulta prevalente a livello del colletto. Tuttavia la virulenza sembra essere attribuito dell'isolato piuttosto che del gruppo di appartenenza. Tale ipotesi richiede di essere confermata da analoghe valutazioni su campioni di isolati di altri AG.

Lavori Citati

- ANDERSON N.A. (1982). The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annual Review of Phytopathology*, **20**, 329-347.
- CARLING D.E., ROTHROCK C.S., MacNISH G.C., SWEETINGHAM M.W., BRAINARD K.A., WINTERS S.W. (1994). Characterization of anastomosis group 11 (AG-11) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, **84**, 1387-1393.
- CORAZZA L., LUONGO L., MAGNOTTA A., PASINI C., CURIR P., D'AQUILA F., BERIO T., NICOLETTI R., LAHOZ E. (1995). Recent researches on *Rhizoctonia solani* AGs in Italy. Atti del I Simposio Internazionale su *Rhizoctonia*, Noordwijkerhout (Olanda), 49.
- CRUICKSHANK R.H., WADE G.C. (1980). Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **107**, 177-181.
- CÚBETA M.A., BRIONES-ORTEGA R., VILGALYS R. (1993). Reassessment of heterokaryon formation in *Rhizoctonia solani* anastomosis group 4. *Mycologia*, **85**, 777-787.
- NICOLETTI R., LAHOZ E. (1995). Gruppi di anastomosi di *Rhizoctonia solani* patogeni su tabacco. *Informatore Fitopatologico*, **45** (12), 57-60.
- NICOLETTI R., PASINI C. (1991). *Rhizoctonia solani* e gruppi di anastomosi. *La Difesa delle Piante*, **14** (3), 53-68.
- OGOSHI A. (1975). Grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn and their perfect stages. *Review Plant Protection Research*, **8**, 93-103.
- OGOSHI A. (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology*, **25**, 125-143.
- PARMETER J.R., SHERWOOD R.T., PLATT W.D. (1969). Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology*, **59**, 1270-1278.
- SHERWOOD R.T. (1970). Physiology of *Rhizoctonia solani*. In: *Rhizoctonia solani*, biology and pathology (Ed. Parmeter J.R.). University of California Press, 69-92.
- SHEW H.D., MELTON T.A. (1995). Target spot of tobacco. *Plant Disease*, **79** (1), 6-11.