

GO “Innovazione nella filiera AGRUMICOLA: Competitività e Sostenibilità delle Produzioni Agrumicole Calabresi (IFAC)” - Misura 16 Intervento 16.01.01 - Supporto alla costituzione e gestione dei Gruppi Operativi PEI – “FASE 2 REALIZZAZIONE DEL PROGETTO INNOVATIVO” – del PSR Calabria 2014/2020

RELAZIONE FINALE: BENEFICIARIO UNIRC

Coerentemente con quanto previsto dal formulario di progetto le attività svolte presso i Dipartimento di Agraria dell'Università Mediterranea di Reggio Calabria hanno riguardato tre differenti avversità di rilevante importanza per le produzioni agrumicole calabresi: 1) Il mal secco causato da *Plenodomus tracheiphilus*; 2) i marciumi radicali causati da *Phytophthora* spp. e; 3) il “brown spot” causato da *Alternaria* spp.

1. Valutazione dei fattori ambientali predisponenti all'infezione di *Plenodomus tracheiphilus* su varietà di limone a differente suscettibilità.

Plenodomus tracheiphilus è un fungo tracheomicotico, che si localizza all'interno dei vasi xilematici, con penetrazione attraverso ferita, sia per via aerea che radicale, a mezzo di picnoconidi e fialoconidi. Anche le cicatrici fogliari, soprattutto a seguito di defogliazioni causate da fattori di stress, possono essere efficaci a tal fine. La temperatura ottimale per lo sviluppo miceliare è compresa fra 20 e 25 °C. A 0 e 30 °C lo sviluppo miceliare si blocca. I picnoconidi germinano fra 5 e 30 °C con un optimum a 25 °C. Lo sviluppo del tubulo germinativo cessa a 30 °C.

Obiettivo del lavoro di ricerca è stato quello di verificare *in vivo*, su pianta, mediante realizzazione di prove di patogenicità su cultivar a diverso grado di suscettibilità, le condizioni di temperatura sfavorevoli alle infezioni, al fine di rendere più agevole e sicura la realizzazione tardo primaverile-estiva delle indispensabili pratiche di risanamento dei limoneti, mediante potatura di rimozione delle parti infette, senza necessità di dover realizzare trattamenti fungicidi con sali di rame a protezione delle ferite. Ciò, oltre che per motivi di sostenibilità economica, per il loro elevato impatto ambientale, in qualità di fungicidi candidati alla sostituzione, con precisi limiti di utilizzo, e per i problemi di scarsa selettività su limone, specie in presenza di alte temperature.

Le prove di patogenicità sono state realizzate su piante in fitocella di circa un anno di età (altezza 170 cm), di tre varietà a differente suscettibilità: Limone Interdonato (tollerante), Limone Femminello Siracusano 2kr (molto suscettibile), Limone Ovale di Sorrento (suscettibilità al mal secco non definita), innestate su portinnesto *Citrus Volkameriana*, molto suscettibile al mal secco. L'isolato di *P. tracheiphilus* è stato ottenuto da porzioni di rametti di una pianta di limone Femminello, con sintomi della malattia e colorazione rosa salmone dei vasi xilematici, prelevati in un'azienda limoncola del comune di Giarre (CT). L'isolato, allevato in piastra su substrato agarizzato (PDA), è stato indentificato mediante amplificazione della regione ITS dei geni del rDNA con i primers ITS 5-4 (White et al. 1990) e successivo sequenziamento ed analisi BLAST (*P. tracheiphilus* isolato Pt1RC). L'inoculo è stato ottenuto da picnoconidi di una colonia di 27 giorni di età, cresciuta su PDA; i conidi sono stati prelevati raschiando la superficie della colonia in corrispondenza dei picnidi, che

DIRETTORE

Località Feo di Vito
89122 Reggio Calabria – Italia
Tel. +39 0965 1694510
Fax +39 0965 1694550
e-mail: direttore@agraria.unirc.it
www.agraria.unirc.it

sono stati trasferiti in una provetta con 2 ml di acqua distillata sterile, contati in cella Burkner ed opportunamente diluiti, per ottenere una sospensione di 1×10^6 conidi/ml.

Su ogni pianta sono state eseguite due tipologie di inoculazione: su rametti e su foglie. Per ogni cv sono state inoculate 50 piante, 25 per ciascun metodo di inoculazione, di cui 10 (5 per metodo) con acqua sterile, come controllo. In entrambi i casi le inoculazioni sono state realizzate mediante ferita ed applicando 10 microlitri di inoculo (1×10^6 conidi/ml) per ogni ferita inoculata. I rametti, del diametro di circa di 0,5 cm, sono stati inoculati praticando una ferita con un bisturi e depositando 10 microlitri di inoculo per ogni ferita. Il punto di inoculazione è stato quindi avvolto con Parafilm. Per ogni pianta è stato inoculato 1 rametto.

L'inoculazione delle foglie è stata realizzata secondo il metodo descritto da Russo (Russo *et al.*, 2021) lievemente modificato. Le foglie (pienamente distese) sono state inoculate su due punti sulla pagina superiore, con inoculo analogo a quello usato per i rametti, praticando una ferita sulla superficie fogliare, mantenuta in posizione orizzontale, in corrispondenza della nervatura centrale, ed applicando la goccia di inoculo (10 microlitri di inoculo contenente 1×10^6 conidi/ml per ogni ferita inoculata). Per ogni foglia sono state praticate due ferite e per ogni pianta sono state inoculate 3 foglie distese.

L'inoculazione è stata realizzata il 5 giugno 2024. Tutte le piante inoculate sono state mantenute per 72 ore in condizioni ideali di temperatura ed umidità al fine di favorire la realizzazione delle infezioni. Successivamente 90 piante inoculate con il fungo, 45 per ciascun metodo di inoculazione (15+15 per ciascuna cultivar) sono state trasferite in serra ombreggiata. Per favorire la ventilazione sono state asportate le tamponature laterali. Le restanti piante inoculate e le piante testimoni sono rimaste in ambiente a temperatura controllata.

Le piante inoculate per via fogliare, mantenute in ambiente a temperatura controllata, di Femminello Siracusano 2kr e Ovale di Sorrento, hanno mostrato ingiallimenti nervali già dopo meno di un mese dall'inoculazione. Le due cultivar inoculate anche al fusto hanno mostrato conclamati sintomi della malattia dopo circa 5 mesi dall'inoculazione con evoluzione progressiva e disseccamenti dei rami, sintomi di maggiore gravità su Femminello Siracusano 2kr. La cv Interdonato ha mostrato sintomi lievi, senza filloptosi e disseccamenti. Le piante testimoni non hanno mostrato alcun sintomo. Il fungo è stato reisolato dal tessuto vascolare dei rametti di tutte le cultivar.

Al contrario, tutte le piante inoculate, di tutte le cultivar testate, trasferite in serra, con temperature che durante l'estate del 2024 hanno frequentemente superato i 30 °C, non hanno mostrato alcun sintomo della malattia.

I risultati conseguiti sembrano poter confermare come le temperature estive abbiano un'azione bloccante sull'evoluzione delle infezioni, indipendentemente dalla suscettibilità varietale. Ciò permette di poter realizzare in sicurezza gli interventi di potatura e cesori di rimonda delle parti infette durante la stagione estiva senza alcuna necessità di realizzare interventi fungicidi. Inoltre apre in prospettiva alla possibilità di valutare, durante i mesi primaverili, applicazioni di sistemi di copertura riscaldanti su giovani piante in vivaio, ove il problema delle infezioni di malsecco rimane molto grave.

DIRETTORE

Località Feo di Vito
89122 Reggio Calabria – Italia
Tel. +39 0965 1694510
Fax +39 0965 1694550
e-mail: direttore@agraria.unirc.it
www.agraria.unirc.it



Figura 1. Sintomi di clorosi delle nervature e disseccamenti dei rametti (a sn.) e di colorazione rosa dei vasi xilematici (a ds.) da cui è stato effettuato l'isolamento di *P. tracheiphilus*.

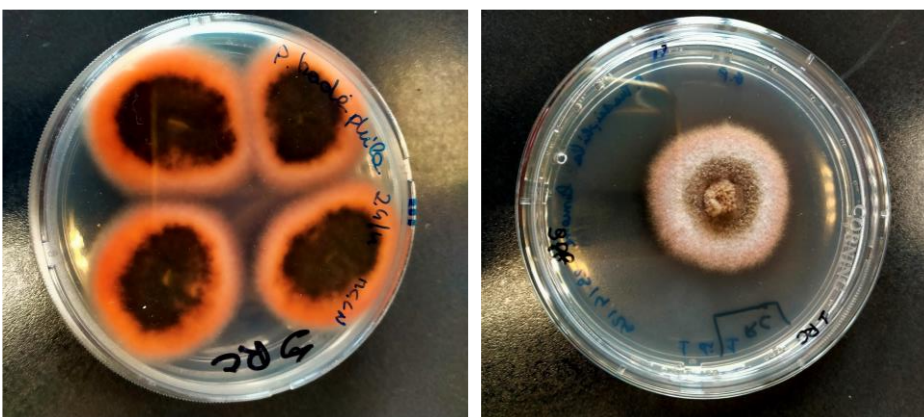


Figura 2. Piastre di isolamento e coltura pura dell'isolato di Pt1Rc di *P. tracheiphilus*.



Figura 3. Particolare della piastra di coltura recante i picnidi e sospensione picnidica adoperata per la preparazione dell'inoculo (a sn.) e inoculazione su foglia.

DIRETTORE

Località Feo di Vito
 89122 Reggio Calabria – Italia
 Tel. +39 0965 1694510
 Fax +39 0965 1694550
 e-mail: direttore@agraria.unirc.it
www.agraria.unirc.it

2) Validazione di un metodo basato su esche vegetali (*baiting*) per il monitoraggio di *Phytophthora* spp. nella rizosfera di agrumi

Scopo dell'attività di ricerca è stato la validazione di un metodo di monitoraggio di *Phytophthora* spp. nella rizosfera di agrumi basato sull'uso di tessuti trappola ("*baiting*"). In particolare, la tecnica utilizzata è stata quella descritta da Jung (Jung et al, 2017) con alcune modifiche. Il "*baiting*" è risultato particolarmente utile per lo studio della diversità di specie di oomiceti in ecosistemi forestali e si basa sull'uso di tessuti vegetali altamente suscettibili ed in grado di agire da esche poiché attrattive per i propaguli mobili (zoospore) di questi organismi. Le esche più comunemente utilizzate sono giovani fogli, ma qualsiasi tessuto vegetale in grado di attrarre le zoospore può teoricamente essere utilizzato. Quando le esche vengono poste a contatto con un terreno sommerso le eventuali zoospore presenti si spostano attivamente verso l'esca attratte dalle sostanze chimiche che le stesse rilasciano nell'ambiente ed una volta a contatto con il tessuto vegetale possono infettarlo determinando la comparsa di piccole aree necrotiche. Prelevando i tessuti intorno a queste aree si può procedere al successivo isolamento del patogeno.

Al fine di validare la tecnica abbiamo prelevato campioni di terreno da agrumeti commerciali con differenti livelli di sintomatologia e quindi teoricamente contenenti una differente carica di inoculo. Sono stati anche prelevati terreni da agrumeti che non mostravano alcun sintomo riconducibile ad infezioni da *Phytophthora* spp. I campioni, costituiti da circa 1 kg di terreno misto a capillizio radicale, sono stati raccolti in buste di plastica sterile e conservati in frigorifero a 4-5°C in attesa di essere analizzati in arco temporale massimo di 7 giorni. I terreni sono stati posti vaschette di plastica sterile e sono stati ricoperti con acqua sterile in modo da lasciare tra il profilo del suolo e la superficie libera dell'acqua uno strato di acqua di circa 3 cm (Fig. 4 A—B).

Dopo qualche ora, e dopo aver favorito la sedimentazione del suolo, sulla superficie dell'acqua sono state poste giovani foglie di carrubo (*Ceratonia siliqua*) e le vaschette sono state incubate a temperatura ambiente (circa 20 °C ± 2).



Figura 4. Tecnica di isolamento con il *baiting*. (A). Preparazione del campione di suolo sommerso con acqua sterile; (B). Esche vegetali con giovani foglie di carrubo; (C) tasselli di esche fogliari trasferite su substrato selettivo PARPNH – PDA.

DIRETTORE

Località Feo di Vito
 89122 Reggio Calabria – Italia
 Tel. +39 0965 1694510
 Fax +39 0965 1694550
 e-mail: direttore@agraria.unirc.it
www.agraria.unirc.it

La comparsa di eventuali lesioni/necrosi sulle foglie galleggianti è stata monitorata ogni 1-2 giorni per sette giorni. Le foglie che mostravano aree necrotiche sono state prelevate, asciugate con carta sterile e osservate allo stereo microscopio per favorire il prelievo di piccole porzioni di tessuto necrotico con l'ausilio di bisturi. I tasselli di tessuto di circa 2 mm sono stati trasferiti in capsule Petri contenenti un substrato selettivo per oomiceti PARPNH – PDA (Jung *et al.*, 2017). Le piastre sono state incubate a 24°C al buio, per 7 giorni e controllate quotidianamente. Le colonie riconducibili al genere *Phytophthora* sono state trasferite in purezza su PDA e mantenute a 24°C al buio, per la successiva fase di caratterizzazione morfologica. L'identificazione delle colture è stata ottenuta mediante amplificazione e sequenziamento della regione ITS del DNA ribosomiale (rDNA) che a sua volta è stato utilizzato come *gene barcode* per l'identificazione degli isolati ottenuti (Schena *et al.*, 2014).

Le indagini condotte hanno dimostrato un'elevata sensibilità della tecnica utilizzata che ha permesso il rilevamento di *Phytophthora* in tutti i campioni analizzati ivi compresi quelli apparentemente sani poiché le piante di agrumi non mostravano alcun sintomo. L'elevata sensibilità della tecnica *baiting* è dovuta alla capacità dell'esca (nel nostro caso le foglie di carrubo) di attrarre le zoospore di *Phytophthora* spp. Questo permette il rilevamento anche di bassissime concentrazioni di inoculo ed è particolarmente importante quando si vuole determinare con elevata attendibilità l'assenza di patogeni come, ad esempio, nel caso di materiale di propagazione di rilevante importanza. Le foglie di carrubo si prestano particolarmente bene ad essere utilizzate come esca poiché sono sufficientemente consistenti per essere maneggiate agevolmente, sono altamente attrattive nei confronti delle zoospore e si fanno infettare facilmente da *Phytophthora* spp. Inoltre, il carrubo tende a vegetare per molti mesi nel corso dell'anno permettendo di avere quasi ininterrottamente giovani foglie, più attrattive. Gli isolati di *Phytophthora* ottenuti nel corso della sperimentazione sono stati identificati mediante analisi morfologica e molecolare come *P. nicotianae* (70%) e *P. citrophthora* (30%). L'assenza di altre specie di *Phytophthora* è stata evidentemente determinata dal fatto che non erano presenti nei campioni di terreno analizzati. Ciò nonostante, è evidente che il metodo validato potrà essere utilizzato per monitorare anche altre specie di *Phytophthora* spp. ad es. nei vivai dove è nota la presenza di molteplici differenti taxa (Prigigallo *et al.*, 2015, 2016).

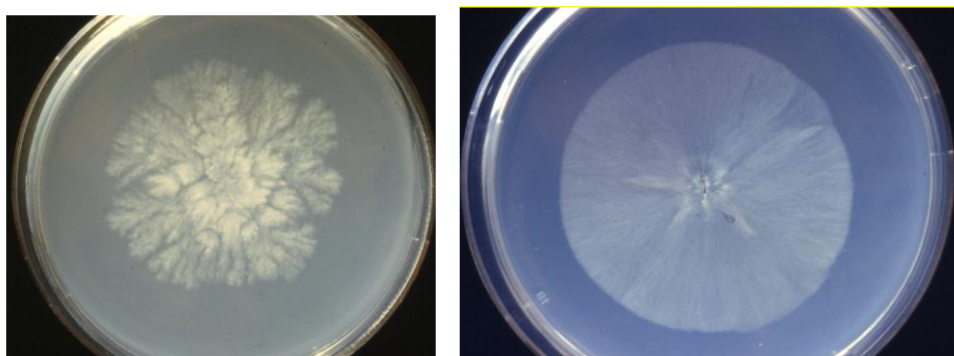


Figura 5. Tipiche colonie di *Phytophthora nicotianae* (sinistra) e *P. citrophthora* (destra) allevate su agar Patata destrosio (PDA)

DIRETTORE

Località Feo di Vito
89122 Reggio Calabria – Italia
Tel. +39 0965 1694510
Fax +39 0965 1694550
e-mail: direttore@agraria.unirc.it
www.agraria.unirc.it

3. Caratterizzazione di isolati di *Alternaria* ottenuti da frutti di agrumi raccolti in Calabria

Una collezione di isolati di *Alternaria* spp. è stata costituita mediante isolamento di funghi fitopatogeni da frutti di agrumi con sintomi tipici di “*Brown spot*”. Gli isolamenti sono stati effettuati da frutti di varia provenienza e di differenti specie tra cui soprattutto “mandarino-simili” e bergamotto (Figura 6). L’isolamento e l’identificazione delle colture ottenute è stato effettuato seguendo le procedure recentemente descritte per la caratterizzazione di isolati di *Alternaria* da campioni di olivo (Aci *et al.*, 2024). In particolare per l’identificazione molecolare degli isolati è stata amplificata e sequenziata la regione ITS del DNA ribosomile. Gli isolati ottenuti hanno mostrato una elevata uniformità morfologica. Anche a livello di regione ITS sono risultati identici e non si sono neanche differenziati rispetto agli isolati ottenuti da olivo. Tutti gli isolati sembrano appartenere ad *Alternaria Sect. Alternata* così come definita da Woudenberg (Woudenberg *et al.*, 2015). Questi risultati preliminari sembrano indicare che lo stesso patogeno possa causare *Brown spot* su differenti specie di agrumi o anche infettare ospiti completamente diversi come agrumi e olivo. Tuttavia, indagini molecolari più accurate attraverso l’amplificazione ed il sequenziamento di un numero maggiore di geni, o attraverso il sequenziamento dell’intero genoma sono necessarie per confermare questa ipotesi. Inoltre, sono state avviate, ma non ancora portate a termine le prove di patogenicità. Queste ultime, al pari di quelle molecolari, saranno fondamentali per confermare l’assenza di una specifica associazione tra patogeno e specie di agrumi interessate.



Figura 6. Frutto di bergamotto con evidenti aree necrotiche all’estremità stilare da cui è stata isolata *Alternaria Sect. alternata*

Articoli citati

- Jung T, Jung MH, Cacciola SO *et al.*, 2017. Multiple new cryptic pathogenic *Phytophthora* species from Fagaceae forests in Austria, Italy and Portugal. *IMA Fungus* **8**, 219–244.
- Aci M., Agosteo GE, Pangallo S *et al.*, 2024. *Alternaria alternata* causing necrosis on leaves, fruits, and pedicels of olive plants in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* **63**, 393–398.
- Prigallo MI, Abdelfattah A, Cacciola SO *et al.*, 2016. Metabarcoding analysis of phytophthora diversity using genus-specific primers and 454 pyrosequencing. *Phytopathology* **106**, 305–313.
- Prigallo MI, Mosca S, Cacciola SO, Cooke DEL, Schena L, 2015. Molecular analysis of

DIRETTORE

Località Feo di Vito
89122 Reggio Calabria – Italia
Tel. +39 0965 1694510
Fax +39 0965 1694550
e-mail: direttore@agraria.unirc.it
www.agraria.unirc.it



Phytophthora diversity in nursery-grown ornamental and fruit plants. *Plant Pathology* **64**, 1308–1319.

Russo R, Sicilia A, Caruso M *et al.*, 2021. De Novo Transcriptome Sequencing of Rough Lemon Leaves (*Citrus jambhiri* Lush.) in Response to *Plenodomus tracheiphilus* Infection. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 882.

Schena L, Mosca S, Cacciola SO *et al.*, 2014. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant Pathology* **63**, 437–446.

Woudenberg JHC, Seidl MF, Groenewald JZ *et al.*, 2015. *Alternaria* section *Alternaria* : Species, *formae speciales* or pathotypes? *Studies in Mycology* **82**, 1–21.

DIRETTORE

Località Feo di Vito
89122 Reggio Calabria – Italia
Tel. +39 0965 1694510
Fax +39 0965 1694550
e-mail: direttore@agraria.unirc.it
www.agraria.unirc.it