



INDAGINI SULLA MORÌA DEL KIWI NEL LAZIO

Francesca Durante, Dott Mauro Sbaraglia, Dott Lorenzo Sbaraglia (1)

Dott Marco Scortichini (2), Dott Massimo Pilotti, Dott Valentina Lumia (3),

Fabio Marocchi, Marco Mastroleo (4)

PREFAZIONE

La coltivazione del Kiwi è per alcune aree dell'Italia una coltivazione strategica. Con circa 9500 ettari in produzione la provincia di Latina è la più importante.

Dal 2016 la coltura nell' area pontina è stata colpita dalla sindrome denominata "Moria", già osservata nel Veronese sin dal 2012 e successivamente anche in altre aree del Nord Italia (1). Nel Lazio si stima che la superficie colpita rappresenti il 5-15%.

Il sintomo più caratteristico interessa l'apparato radicale che presenta imbrunimenti e necrosi dello xilema, progressiva perdita del capillizio radicale, ipertrofia ed arrossamento dello strato corticale delle branche radicali che va incontro a marciume e distacco del cilindro xilematico. Tale degenerazione pressoché totale delle radici provoca un deperimento generale e progressivo della porzione epigea della pianta. In particolare, le foglie mostrano ampie aree necrotiche (brusone), e nel tempo la pianta va inevitabilmente incontro a morte. Le perdite economiche risultano ingenti e dovute alla perdita di produzione, alla rimozione degli individui morti e al reimpianto di nuovi individui che possono poi subire lo stesso destino. Si pensa pertanto che alla base della manifestazione della Moria ci siano fattori di stress a carico del sistema radicale (ad esempio ristagno idrico o in generale condizioni del terreno che sfavoriscono una adeguata circolazione di ossigeno).

In questo primo studio si è cercato di investigare sulle possibili cause della "Moria" focalizzando l'attenzione **sulla presenza di funghi potenzialmente patogeni** e su possibili strategie per il contenimento del problema.





(1) Tecnici del laboratorio Pedon lab srl Latina (2) ricercatore del CREA (3) ricercatore del CREA (4) tecnici della cooperativa Apofruit





CAMPIONAMENTO, ISOLAMENTI FUNGINI E RICERCA DI NEMATODI

Il campionamento è iniziato nel marzo 2020. Sono state visitate 20 aziende in cui era presente la Moria a diversi stadi (vedi quadro sintomatologico sopra descritto) e sono state campionate circa 10 piante con Moria per ciascuna azienda.

Le zone interessate dal campionamento sono state: Cisterna di Latina, Cori, Doganella di Ninfa, Pomezia, Borgo Montello, Borgo Podgora e Aprilia.

Le colonizzazioni fungine nelle radici sono state indagate, sottoponendo ad isolamento circa 200 campioni di radici sintomatiche nel laboratorio “Pedonlab” (Latina Scalo).

I campioni, disinfettati superficialmente con una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,6% per un minuto e poi sciacquati con due bagni in acqua distillata sterile, sono stati depositi su piastre di PDA (Potato Dextrose Agar). Le piastre sono state incubate ad una temperatura di 25°C al buio.

Le colonie fungine ottenute sono state trasferite in purezza su nuove piastre di PDA e di nuovo incubate a temperatura di 25°C.

Gli isolati fungini sono stati identificati mediante microscopia ottica. Quattro di questi sono stati oggetto di identificazione mediante sequenziamento della regione ITS del DNA ribosomiale [Centro di Ricerca Difesa e Certificazione CREA-DC (sede di Roma) del Consiglio per la ricerca in agricoltura e l’analisi dell’economia agraria].

La presenza dei nematodi è stata indagata mediante l’estrazione delle uova e delle larve: dalle radici sintomatiche aventi processi iperplastici/ipertrofici (galle) sono state tagliate sezioni trasversali di circa 1 cm di spessore e messe a bagno per 3 minuti in agitazione in una soluzione di NaClO al 14%. Mediante filtrazione su setacci da 100 micron (trattenimento di residui vegetali) e 25 micron (finalizzato al trattenimento di uova e larve di nematodi) e recupero con 50 ml di acqua dal setaccio da 25 micron, sono state ottenuti i campioni da osservare al microscopio ottico per verificare la presenza di nematodi

DISTRIBUZIONE DI FUNGHI, OOMICETI E NEMATODI NELLE DIVERSE AZIENDE

Come si evince dalla tabella 1, nell'80% dei siti con sintomi di Moria si riscontra la presenza di funghi appartenenti al genere *Cylindrocarpon*.

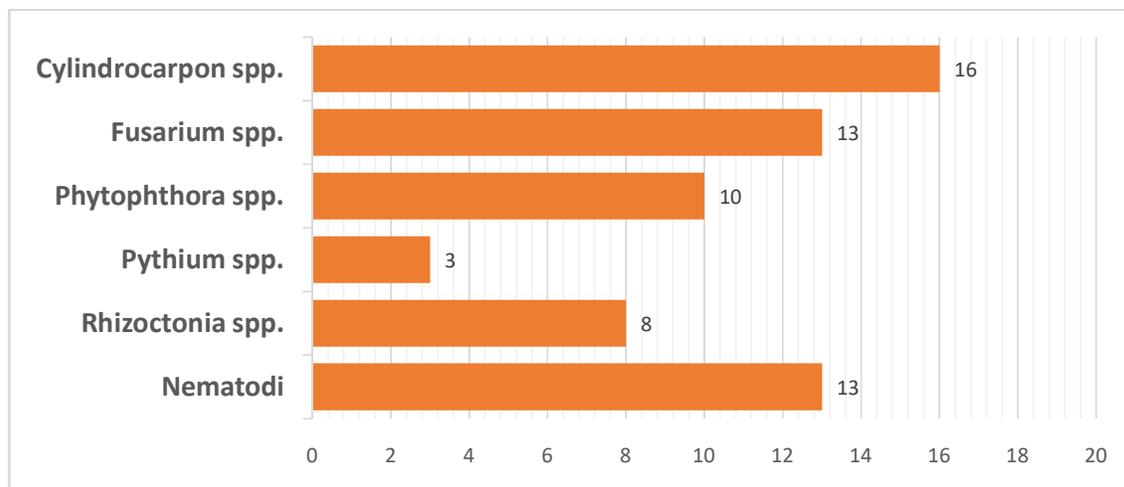
Nel 65% delle aziende sono risultati presenti nematodi appartenente al genere *Meloidogyne*.

Nel 65% delle aziende sono risultati presenti Oomiceti (*Phytophthora*, *Pythium*)

Il sequenziamento della regione ITS del DNA ribosomale ha permesso l'identificazione di: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Clonostachys rosea*, *Ilyonectria liriodendri* (= *Cylindrocarpon liriodendri*).

Abbiamo ritenuto significativa la presenza di *C. liriodendri* in quanto è noto per essere agente causale di una malattia del kiwi in Turchia caratterizzata da necrosi delle radici e avvizzimento e morte delle piante (3). In Portogallo ed in Italia, *C. liriodendri* è risultato agente causale di cancri ed imbrunimenti del legno su vite (4, 5).

Tabella 1. Frequenza per azienda di funghi e nematodi (aziende visitate = 20)



TEST DI PATOGENICITA'

È stata eseguita una prova di patogenicità utilizzando i due isolati di *C. liriodendri*.

Per la prova di patogenicità sono state utilizzate piante di due anni mantenute in vaso in terreno precedentemente sottoposto ad una doppia sterilizzazione in autoclave (121°C per 40 minuti).

Sono state inoculate 16 piante della varietà Hayward con ciascun isolato fungino utilizzando la seguente metodologia: le piante sono state immerse a radice nuda in una sospensione conidica ad una concentrazione di 10^8 /ml, per un'ora e successivamente trasferite in vaso con terreno precedentemente sterilizzato come sopra descritto.

Come testimone sono state utilizzate 16 piante di Hayward le cui radici sono state immerse per un'ora in acqua sterile.

Infine, ulteriori 16 piante di Hayward sono state messe a dimora in vaso contenente terreno prelevato in prossimità della pianta affetta da Moria da cui era stato ottenuto l'isolato *C. liriodendri* (isolato 2D).

Per ciascun trattamento le 16 piante sono state suddivise in 4 gruppi da 4 piante ciascuno e tali gruppi sono stati randomizzati all'interno della serra.

Sono state eseguite delle normali concimazioni a base di NKP e irrigando a capacità di campo.

I primi sintomi si sono manifestati già dopo 75 giorni dall'inoculazione (vedi tabella 2).

In questa fase la valutazione è stata effettuata secondo la seguente scala:

-1: assenza di sintomi di sofferenza

-3: inizio defogliazione e avvizzimento

-5: morte

L'emergenza dei sintomi è stata indipendente dalla posizione di ciascun quartetto di piante (dati non mostrati)

Tabella 2. Rilevamento dei sintomi a 75 giorni dall'inoculazione di piante di Hayward. Ogni trattamento costituito da 16 piante (inoculazione: 10/07/2020 - rilievi: 25/09/2020)

Trattamento	N piante con classe sintomatologica 1	N piante con classe sintomatologica 3	N piante con classe sintomatologica 5
<i>Cylindrocarpon liriodendri</i> Isolato 19	3	7	6
<i>Cylindrocarpon liriodendri</i> Isolato 2D	5	11	0
Terreno da pianta con Moria	0	6	10
Testimone sano	16	0	0

Di seguito si riportano fotografie mostranti l'aspetto della porzione epigea delle piante inoculate con *C. liriodendri* o allevate con il terreno proveniente da una pianta affetta da Moria



Pianta sana



C. liriodendri (isolato 19)



Terreno Infetto



C. liriodendri (isolato 2D)

A 135 giorni dall'inoculazione è stata effettuata la valutazione finale cavando le piante dal vaso per osservarne le radici e rilevando anche i sintomi sul fusto (vedi tabella 3).

Anche in questo caso è stato attribuito un punteggio in base ad una scala da 1 a 5:

- 1: assenza di sintomi di sofferenza
- 3: apparato radicale colpito al 30-50%, con lieve imbrunimento vascolare
- 5: morte, apparato radicale totalmente degenerato (marcato imbrunimento vascolare)

Tabella 3. Rilevamento dei sintomi a 135 giorni dall'inoculazione di piante di Hayward. Ogni trattamento costituito da 16 piante (inoculazione: 10/07/2020 - rilievi: 25/11/2020)

Trattamento	N piante con classe sintomatologica 1	N piante con classe sintomatologica 3	N piante con classe sintomatologica 5
<i>Cylindrocarpon liriodendri</i> Isolato 19	0	0	16
<i>Cylindrocarpon liriodendri</i> Isolato 2D	0	1	15
Terreno da pianta con Moría	0	0	16
Testimone sano	16	0	0

Di seguito sono riportate fotografie che mostrano gli esiti delle inoculazioni con gli isolati di *C. liriodendri*



C. liriodendri è stato reisolato dalle radici sintomatiche delle piante inoculate con questo fungo mentre non è stato reisolato dalle piante messe a dimora con terreno prelevato dall'impianto con Moria.

Confermando quanto riportato in letteratura, gli isolati di *Ilyonectria / Cyindrocarpon liriodendri*, da noi isolati dalle radici di kiwi affetto da Moria, si sono mostrati patogeni su kiwi, causando una sintomatologia simile a quella della Moria.

Ilyonectria / Cyindrocarpon liriodendri è qui segnalato per la prima volta in Italia su kiwi.

CONCLUSIONI

Le indagini sperimentali eseguite hanno portato alle seguenti conclusioni:

- *Ilyonectria/Cyindrocarpon liriodendri* è noto per essere agente causale di una malattia del kiwi in Turchia caratterizzata da necrosi delle radici e avvizzimento e morte delle piante. Inoltre, la stessa specie fungina è risultata coinvolta in alterazioni (Black foot) su vite in Portogallo ed in Italia. Risulta pertanto molto interessante che *C. liriodendri* sia stato isolato nel Lazio in associazione a piante di kiwi affette da Moria. Soprattutto in virtù del fatto che le infezioni artificiali hanno mostrato una chiara patogenicità nei confronti del kiwi e con sintomi molto simili a quelli della Moria.
- Anche se la eziologia della Moria rimane tutt'ora oscura, la patogenicità mostrata da *Ilyonectria/Cyindrocarpon liriodendri* nei confronti del Kiwi è senza dubbio un fatto significativo che prova il coinvolgimento di questo fungo nella Moria.
- Si ritiene utile ed importante effettuare prove di resistenza dei diversi genotipi di Kiwi a *C. liriodendri*, vista la aggressività mostrata nelle prove di patogenicità.
- L'eventuale ruolo che i nematodi potrebbero avere nella manifestazione della Moria andrebbe ulteriormente indagato.
- L'esito della prova in vaso con terreno prelevato da piante malate indica che la malattia si può trasmettere con il terreno e pone una criticità sul reimpianto in terreni nei quali si è manifestato il problema della Moria.
- Il campionamento sopra riportato ha consentito l'isolamento anche di altri microrganismi potenzialmente patogeni – Oomiceti, Rhizoctonia spp. etc – la cui reale patogenicità su kiwi è attualmente oggetto di studio.
- Una utile comparazione sarebbe, inoltre, quella di svolgere indagini sul microbiota fungino anche in impianti ove la Moria non è ancora presente.

Pensiamo che le informazioni qui riportate rappresentino un frammento, ancorché importante, di un mosaico ancora ben lungi dall'essere completato.

Non va dimenticato che diversi altri microrganismi sono stati recentemente associati alla manifestazione della Moria in Italia e che le prove di infezione artificiale hanno stabilito anche per questi una patogenicità significativa con riproduzione di una sintomatologia Moria-simile. Ad esempio, *Clostridium fermentans* e *C. subterminale* (Spigaglia et al.

2019), *Phytophthium vexans* and *Phytophthium chamaeophon* (Savian et al. 2020). Ragionevolmente ci si può interrogare come facciano microrganismi così diversi a causare la stessa malattia. Cionondimeno il ruolo di fattori abiotici – saturazione idrica, anossia/ipossia, temperature anomale – sembra essere importante (Bardi 2020, Savian et al. 2020) anche se non chiarito nel contesto di una dinamica causa-effetto. Sembra però verosimile pensare che lo stress abiotico – da definire esattamente quale/i - possa essere predisponente nei confronti degli attacchi microbici (Savian et al. 2020).

Pertanto, in un quadro così complesso la comprensione della Moria e possibilmente la sua risoluzione si potrà ottenere attraverso un approccio multidisciplinare e di integrazione degli sforzi messi in gioco.

BIBLIOGRAFIA

1. Lorenzo Tosi, Gianni Tacconi: Giornata S.O.I gruppo di lavoro Actinidia 19/03/2019
2. Irene Donati et altri: Pathogens associated to Kiwi Fruit Vine Decline Agricolture. 10 April 2020
3. L. Erper and B. Tunali et altri: First report of *Cylindrocarpon liriiodendri* on kiwi fruit in Turkey, *Plant dis.*95:76 2011
4. J. Armengol: Black foot disease of grape vine: an update on taxonomy epidemiology and management strategies; *Phytopathologia Mediterranea* 52(2): 245-261
5. Yazmid Reyes, Domingues; Andreas Gallmetzer; Gerd Innerebner: Piede nero della vite in alto Adige, *Frutta e Vite* 5/2017.
6. Mohamed el Agamy Farh et altri: *Cylindrocarpon destructans*/ *Ilyonestria radiale*-species complex: Causative agent of Ginseng root –rot disease and rusty symtoms. *Journal of Ginseng Research*. 2018; 42: 9-15
7. G. Tacconi et altri: Il punto della Moria del Kiwi a 8 anni dalla sua comparsa; *Informatore Agrario* n 21/2019 pag 34
8. P.Spigaglia et altri: *Clostridium Bifermentans* and *C. Subterminale* are associated with kiwifruit vine decline, known as moria, in Italy: *Plant Pathology* 2020; 00:1-10
9. L.Bardi: Syndrome or a Climate Change Effect on Plant-Soil Relations?: *Frontiers in Agronomy* 2020 volume 2 article 3.
10. Savian et altri: Studies on the aetiology of kiwifruit decline : interaction between soil-borne pathogens and waterloggin : *Plant Soil* 2020 456; 113-128.