

*Alma Mater Studiorum* – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE, AMBIENTALI  
E ALIMENTARI

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 07/D1

Settore Scientifico disciplinare: AGR/12

**Studi epidemiologici su *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* agente causale del cancro batterico in actinidia**

Presentata da: **Stefano Ardizzi**

Coordinatore

**Prof. Giovanni Dinelli**

Relatore

**Prof.ssa Assunta Bertaccini**

Correlatore

**Dott.ssa Paola Minardi**

**Esame finale anno 2015**



## Abstract

Bacterial canker disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) involved all global interest since 2008. The disease started from Japan and in two year it was causing epidemic outbreaks around the world, in every country that has an actinidia's cultivations. Huge amount of economical losses brought the international attention on this problem and on strong efforts were devoted study this relatively unknown pathosystem. It appears in fact that pathogen can be maintained in latent form for long periods, without show any characteristic symptom on the affected plants, when it suddenly induce symptoms the plant die in one or two years. Monitor and control the real situation on symptoms are fundamental, but more important is to prevent the appearance of new infection events. This could be supported by the use of pathogen free propagation materials, but in several cases this is only theoretically achieved since materials employed are just asymptomatic but not tested to be pathogen-free.

In the recent years a lot of molecular techniques were developed for Psa detection and diagnosis, directly from plant material. The objectives of this work were to clarify the spreading of Psa into the infected adult plant, and to verify the effectiveness of Psa early detection methods on disease prevention. Toward these aims the following experimental steps were carried out: i) study the localization, movement and survival ability of Psa into the plant after inoculation with a reference marked strains of Psa::*gfp* several actinidia adult plants; ii) study the Psa ability to be maintained in shoots during seven micropropagated generations after inoculation with the same marked strain of Psa::*gfp* mother plants; iii) study and application of a novel Psa detection method based on bleeding sap molecular testing.



# INDICE

1) INTRODUZIONE	9
1.1 IL PATOSISTEMA ACTINIDIA - <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. ACTINIDIAE	9
1.2 ACTINIDIA	10
1.3 <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. ACTINIDIA	16
1.4 IL CANCRO BATTERICO DELL'ACTINIDIA	25
1.5 COMPARSA DELLA MALATTIA IN ITALIA E NEL MONDO	28
1.6 PREVENZIONE E DIAGNOSI PREVENTIVA	29
1.7 LA LOTTA	31
2) SCOPO DELLA TESI E TEMATICHE DI RICERCA	37
3) COLONIZZAZIONE ENDOFITA DI PIANTE ADULTE	39
3.1 INTRODUZIONE	39
3.2 MATERIALI E METODI	41
3.2.1 PIANTE OSPITI	41
3.2.2 COLTURA BATTERICA	41
3.2.3 MISURA DELLA LUNGHEZZA DEI CANCRI	42
3.2.4 PARAMETRI CLIMATICI	42
3.2.5 ANALISI STATISTICA	42
3.2.6 ANALISI <i>IN TOTO</i> DELLE PIANTE	42
3.2.7 REISOLAMENTO DI PSA:: <i>GFP</i> -RIF <sup>RES</sup>	44
3.2.8 OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO : ESPRESSIONE <i>GFP</i>	45
3.2.9 ESTRAZIONE DEL DNA DA ESTRATTO VEGETALE	45
3.2.10 ANALISI PCR	46
3.2.10.1 PCR DIRETTA	46
3.2.10.2 PCR-“NESTED”	46
3.2.11 SAGGI DI PATOGENICITA' E DI IPERSENSIBILITA' <i>IN PLANTA</i>	48
3.3 RISULTATI	48
3.3.1 PROGRESSIONE DEI CANCRI E CORRELAZIONE CON PARAMETRI CLIMATICI	48
3.3.2 RILIEVO DEGLI ENDOFITI. ANALISI <i>IN TOTO</i> DELLE PIANTE	55
3.3.2.1 REISOLAMENTO DI PSA:: <i>GFP</i> -RIF <sup>RES</sup> DA PIANTA N°7	55
3.3.2.2 REISOLAMENTO DI PSA:: <i>GFP</i> -RIF <sup>RES</sup> DA PIANTA N°9	58

3.3.2.3 REISOLAMENTO DI Psa:: <i>gfp</i> -Rif <sup>res</sup> DA PIANTA N°20	60
3.3.2.4 ANALISI <i>IN TOTO</i> DELLA PIANTA DI CONTROLLO 2C	63
3.3.2.5 REISOLAMENTO DI Psa:: <i>gfp</i> -Rif <sup>res</sup> DA PIANTA N°8	65
3.3.2.6 REISOLAMENTO DI Psa:: <i>gfp</i> -Rif <sup>res</sup> DA PIANTA N°31	67
3.3.2.7 ANALISI <i>IN TOTO</i> DELLA PIANTA DI CONTROLLO 4C	69
3.3.2.8 REISOLAMENTO DI Psa:: <i>gfp</i> -Rif <sup>res</sup> DA PIANTA N°15	72
3.3.2.9 REISOLAMENTO DI Psa:: <i>gfp</i> -Rif <sup>res</sup> DA PIANTA N°19	75
3.3.2.10 REISOLAMENTO DI Psa:: <i>gfp</i> -Rif <sup>res</sup> DA PIANTA N°40	78
3.4 CONCLUSIONI	80
4) SOPRAVVIVENZA IN MATERIALE MICROPROPAGATO	83
4.1 INTRODUZIONE	83
4.2 MATERIALI E METODI	85
4.2.1 MICROTALIEE	85
4.2.1.1 SUBCULTURE	85
4.2.2 COLTURE BATTERICHE	85
4.2.3 CONTAMINAZIONE BATTERICA DELLE MICROTALIEE	86
4.2.3.1 PREPARAZIONE DELLE SOSPENSIONI BATTERICHE	86
4.2.3.2 CONTAMINAZIONE BATTERICA DELLE PLANTULE	86
4.2.4 ANALISI DEI CAMPIONI	87
4.2.4.1 OSSERVAZIONI VISIVE	87
4.2.4.2 OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO : ESPRESSIONE <i>GFP</i>	87
4.2.4.3 ESTRAZIONE DEL DNA DA MATERIALE VEGETALE	87
4.2.4.4 REISOLAMENTO DI Psa:: <i>GFP</i> -RIF <sup>RES</sup>	88
4.2.4.5 ANALISI PCR	88
4.2.4.6 SAGGI DI PATOGENICITA' E DI IPERSENSIBILITA' <i>IN PLANTA</i>	88
4.2.4.7 RILIEVO DEI BATTERI ENDOFITI IN PIANTE IN VASO	88
4.3 RISULTATI	90
4.3.1 SUBCULTURE IN MICROPROPAGAZIONE	90
4.3.1.1 ISOLAMENTI MICROBIOLOGICI	90
4.3.1.2 ANALISI PCR	90
4.3.2 PIANTE IN VASO	91
4.3.2.1 ISOLAMENTO MICROBIOLOGICO	91
4.3.2.2 ANALISI PCR	91

4.4 CONCLUSIONI	91
5) MESSA A PUNTO DI METODI DI ANALISI INNOVATIVI	93
5.1 INTRODUZIONE	93
5.1.1 IL “PIANTO” DELL’ACTINIDIA	93
5.2 MATERIALI E METODI	94
5.2.1 RACCOLTA	94
5.2.2 ANALISI RFLP-PCR	95
5.2.2.1 SAGGIO PCR-“NESTED”	95
5.2.2.2 RFLP	95
5.2.2.3 ISOLAMENTI MICROBIOLOGICI	95
5.2.4 LA SPERIMENTAZIONE	96
5.2.4.1 ITALIA	96
5.2.4.2 CILE	97
5.3 RISULTATI	98
5.3.1 ITALIA	98
5.3.1.1 VOLUME DEI “PIANTI”	98
5.3.1.2 ANALISI MOLECOLARE DEL “PIANTO”	99
5.3.1.3 ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE MICROBIOLOGICA	100
5.3.2 CILE	101
5.3.2.1 VOLUME DEI “PIANTI”	101
5.3.2.2 ANALISI MOLECOLARE DEL “PIANTO”	102
5.3.2.3 ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE MICROBIOLOGICA	103
5.4 CONCLUSIONI	103
6) CONCLUSIONI FINALI	107
7) APPENDICI	111
8) BIBLIOGRAFIA	115





# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. IL PATOSISTEMA ACTINIDIA - *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

Un patosistema è una parte integrante dell'ecosistema caratterizzato dal fenomeno del parassitismo ed è composto da un ospite suscettibile, un patogeno virulento ed un ambiente predisposto allo sviluppo della malattia (Fig. 1.1).

Nei patosistemi vegetali in particolar modo è stato studiato il patoadattamento, e cioè l'evoluzione dei geni associati alla virulenza, acquisiti in seguito alla selezione di patogenesi e ricevuti per via verticale (Stavrinos *et al.*, 2008; McCann e Guttman, 2008), anche la permanenza prolungata di un batterio fitopatogeno come endofita attivo senza pregiudicare la sopravvivenza dell'ospite è segno di patoadattamento (Cameron, 1970; Hirano e Upper, 2000; Minardi *et al.*, 2012b).

In generale, per un patogeno, una modificazione genetica costituisce patoadattamento quando ha luogo dopo il passaggio ad un nuovo stile di vita conferendo al patogeno una migliore "fitness". Le modificazioni di patoadattamento includono cambiamenti delle sequenze dei geni, alterazioni dell'espressione genica e perdita di geni (Pallen e Wren, 2007).

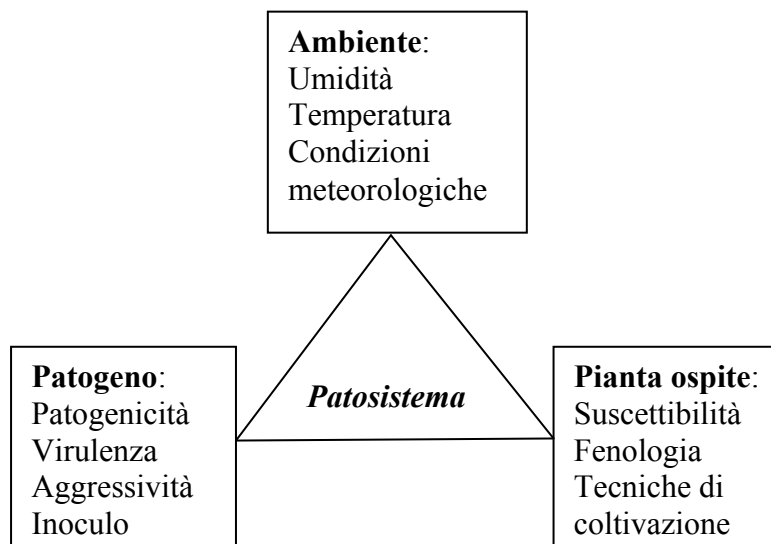


Fig. 1.1. Rappresentazione schematica delle tre caratteristiche che definiscono un patosistema.

## 1.2. ACTINIDIA

La pianta di actinidia (*Actinidia* Lindley 1836) è originaria della Cina, in particolare della valle del fiume Yang Tze, le popolazioni di queste zone raccolgono infatti il frutto da tempo immemorabile (testimonianze dell'utilizzo di actinidia risalgono alla dinastia Ming, 1200 a.C.), la sua prima classificazione botanica risale al XV secolo ad opera di Chiu Huang Pen T'Sao ed il suo nome originario cinese era "Mi hou tao shu" (Ferguson, 1984; Li *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2011).

In Europa il frutto venne introdotto dall'esploratore Robert Fortune nel 1847, a seguito di una spedizione in Oriente organizzata dalla Royal Society of Horticulture di Londra, ma senza riscontrare grande interesse. Miglior risultato ebbe il botanico E.H. Wilson, che spedì in Inghilterra dalla Cina alcuni semi ai vivai inglesi Veitch e Son, i quali presentarono al pubblico le prime piantine di actinidia nel 1903 (Ferguson, 2004). Inizialmente utilizzata come pianta ornamentale, in virtù della sua grande vigoria e della bellezza del fogliame, in breve tempo fece la sua comparsa anche in Francia, mentre non è nota con certezza l'epoca di introduzione in Italia.

Contemporaneamente alla diffusione nel vecchio continente, l'actinidia venne importata anche in America ed in Australia (1904), proprio in Australia, e più precisamente in Nuova Zelanda dove la pianta incontrò condizioni ambientali estremamente favorevoli. Fino al 1950 la produzione neozelandese rimase destinata al solo mercato interno; da questa data in poi le esportazioni verso gli altri continenti fecero sì che l'actinidia assumesse effettiva importanza anche dal punto di vista commerciale (Fig. 1.2).

La coltura del kiwi in Italia, occupa circa 22.000 ettari e le principali zone di coltivazione sono in Lazio, Piemonte, Emilia Romagna, Veneto e Campania. Dopo la Cina, infatti, l'Italia rappresenta uno dei maggiori produttori di kiwi: circa 470.000 di tonnellate rispetto a 1,6 milioni di tonnellate prodotte annualmente in tutto il mondo.

La cultivar Hayward è la più diffusa nel nostro Paese, anche se negli ultimi 10 anni c'è stato un incremento nella coltivazione di kiwi giallo (*Actinidia chinensis* Planchon) in particolare delle cultivar Jin Tao (Kiwi Gold) e Hort 16A (Zespri Gold) specialmente in Lazio e in Emilia Romagna (Testolin e Ferguson, 2009).

Dall'anno 2000 in poi l'Italia si è insediata stabilmente ai primi posti tra i produttori a livello mondiale, e attualmente detiene il primato mondiale per produzione su unità superficie.

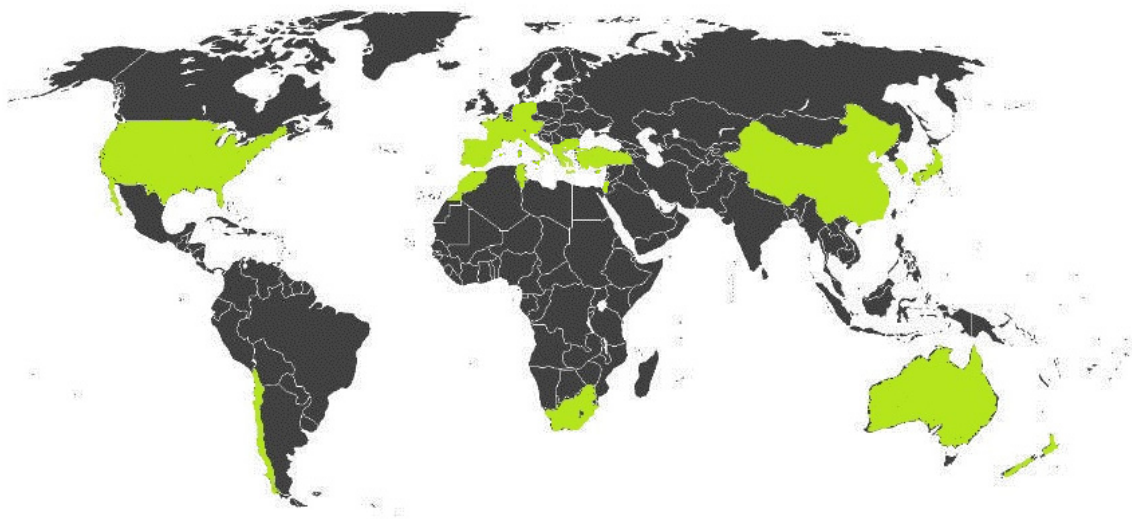


Fig. 1.2. Distribuzione mondiale della coltivazione di actinidia.

Esistono diverse cultivar di actinidia: a polpa verde derivate da *Actinidia deliciosa* tra cui: Abbot, Bruno, Monty, Matua, Tomuri e Hayward tra cui i suoi diversi cloni (Clone-8, Clone-K, Clone Maeba e Kramer); a polpa gialla derivate da *A. chinensis* tra cui: Soreli; Hort16A; JinTao; ed a polpa rossa derivate da *A. arguta* tra cui: Miss Green, Jumbo e Anna Red (Testolin e Ferguson, 2009).

Attualmente la produzione in Italia è particolarmente concentrata nella zona della provincia di Latina, anche se i primi impianti sono stati effettuati in Veneto, Emilia-Romagna, Friuli, Trentino Alto-Adige, Piemonte, Lazio e Marche.

Tutte le specie di actinidia presentano individui perenni, con portamento rampicante o prostrato, per la maggior parte decidui, sebbene alcune forme nelle zone a clima più caldo siano sempreverdi. L'actinidia si caratterizza per essere una specie dioica, portante cioè i sessi su individui diversi, gli individui femminili portano fiori con stami apparentemente normali, e in numero superiore alle piante maschili, che tuttavia non producono polline vitale. Gli individui maschili presentano invece fiori (in numero variabile da 3 a 5 per ogni racemo) con aborti degli ovari e dell'apparato femminile (Ferguson, 1984; Grant e Ryugo, 1982; Fabbri *et al.*, 1991).

I fiori, di colore bianco, possono essere portati singolarmente oppure raggruppati. Un fattore che influenza fortemente la produzione fiorale è la necessità di un prolungato periodo di bassa temperatura (600-850 ore a temperature inferiori a 7°C) (Palma e Jackson, 1981; Polito e Grant, 1984; Snelgar e Manson, 1992).

Botanicamente il frutto è una bacca, contiene un elevato numero di semi e si presenta ricoperto da peluria. I frutti possono essere singoli, in grappoli di 3-5 oppure in infruttescenze di 30 e più elementi, a seconda della specie. Le loro dimensioni sono variabili, così come la forma, la tomentosità, il colore e la consistenza della polpa.

La pianta presenta un fusto legnoso con numerosi tralci che portano gemme miste (da cui si originerà un germoglio fertile) e gemme a legno. L'apparato fogliare è costituito da foglie semplici, decidue, cuoriformi e lungamente picciolate, con caratteristiche leggermente differenti a seconda della posizione occupata sulla pianta., l'apparato radicale è superficiale (Testolin e Crivello, 1987; Davison, 1990).

Il ciclo vegetativo annuale ha inizio in primavera con il germogliamento che avviene normalmente tra la fine di marzo e la prima decade di aprile. Esso è preceduto dalla ripresa dell'attività radicale e dalla circolazione della linfa nel mese di febbraio.

A partire da tale epoca è possibile osservare una abbondante fuoriuscita di linfa grezza (il cosiddetto "pianto") a seguito di tagli nel legno. Con il germogliamento inizia anche l'accrescimento di diversi tipi di germogli, la cui evoluzione dipende dal tipo di gemma da cui hanno origine. Si distinguono infatti gemme a legno e gemme miste: le gemme a legno danno origine ad un germoglio sterile e si formano sui nuovi germogli nel tratto basale per i primi 3-4 nodi, mentre le gemme miste sono in grado di dare origine ad un germoglio fertile.

La fioritura avviene normalmente tra la fine di maggio e i primi di giugno e si protrae per una decina di giorni. Nelle cultivar che presentano racemi con più fiori, inizia a schiudere il fiore centrale e successivamente schiudono quelli laterali. La fecondazione, anemofila ed entomofila, è di tipo incrociato. I fiori maschili producono polline vitale solamente i primi 2-3 giorni dopo la schiusura, e questo conserva un elevato potere germinativo per oltre due giorni dal momento in cui è prodotto. La ricettività del fiore femminile è piuttosto elevata, potendosi protrarre per una settimana, fino all'inizio della caduta dei petali. La fecondazione avviene in circa 40-70 ore e può interessare fino a 1300-1400 ovuli (Pietropoli, 2004).

Terminata la fioritura i frutti iniziano il proprio accrescimento che si verifica in 4 fasi: la prima si protrae per circa 70 giorni a partire dalla piena fioritura, ed è caratterizzata da un accrescimento molto rapido alla fine del quale il frutto ha raggiunto già oltre il 60% del proprio volume finale. Segue un secondo periodo, caratterizzato da crescita lenta che dura circa 30 giorni, durante il quale i semi completano la propria formazione. Successivamente si assiste ad un periodo di forte crescita di 20 giorni, che porta il frutto prossimo alle dimensioni finali. Nell'ultimo

mese prima della raccolta, il frutto completa molto lentamente il proprio sviluppo dando avvio alla fase di maturazione, caratterizzata da trasformazioni degli assimilati in metaboliti di riserva ed acidi organici (Testolin e Crivello, 1987).

L'actinidia preferisce terreni subacidi a ridotto o assente contenuto di calcare attivo. Il problema principale di questa coltura è infatti la clorosi ferrica, in agricoltura biologica questa carenza si risolve con l'apporto di sostanza organica e l'aumento nel suolo del tenore di humus, chelante naturale del ferro. Per quanto riguarda le temperature è molto sensibile a cali termici in fase di germogliamento (Bori *et al.*, 2011). L'habitat ideale per questo genere consiste di zone riparate vicino a fiumi o ruscelli, con un suolo umido, al riparo da vento e gelate primaverili; predilige ambienti con umidità relativa superiore al 70%, estati calde, nuvolose e umide, ed inverni freddi. L'actinidia presenta una spiccata esigenza idrica: durante la fase di fioritura, allegagione e sviluppo del frutto. Dai risultati di uno studio del CRPV (Centro ricerche produzioni vegetali) di Cesena del 2008 è stato verificato che il consumo idrico giornaliero di un impianto di actinidia ad interfilare inerbito e mantenuto in ottimali condizioni di rifornimento idrico, è stato mediamente di 2,7 mm/giorno (2,7 l/m<sup>2</sup>) in maggio (fase di pre-fioritura) e 3,3 mm/giorno in giugno (accrescimento rapido dei frutti), per poi raggiungere il massimo di consumo in luglio (4,8 mm/giorno) (accrescimento rapido dei frutti) e decrescere gradualmente a 3,9 mm/giorno in agosto (crescita lenta dei frutti e formazione dei semi), 2,3 mm/giorno in settembre (crescita finale dei frutti) e 1,4 mm/giorno in ottobre (maturazione dei frutti), in prossimità della raccolta (Anconelli *et al.*, 2009). Durante la maturazione dei frutti l'apporto di acqua deve essere ridotto per non pregiudicare la qualità e la serbevolezza dei frutti (Bori *et al.*, 2011).

Per quanto riguarda i microrganismi i patogeni che attaccano questa coltura in maniera più o meno grave nelle diverse aree di coltivazione del mondo, i principali sono oomiceti, funghi, batteri e virus.

### ***Rhizoctonia solani***

Basidiomicete agente causale di marciumi di talee e piantine, le fonti di inoculo sono costituite sia dai frutti caduti a terra che da residui vegetali contaminati lasciati a terra, penetra nella pianta ospite attraverso ferite e provoca una sintomatologia simile a quella di fitoftora (Horst, 2008).

### ***Phytophthora spp.***

Oomicete necrotrofico che attacca le foglie, il colletto, le radici ed i frutti e sopravvive in frutti residui vegetali infetti lasciati a terra riuscendo a penetrare sia attraverso ferite sia direttamente (Erwin e Ribeiro, 1996). La pianta colpita presenta un deperimento generico, foglie clorotiche, avvizzite e a caduta anticipata, a livello del colletto si hanno ispessimenti spugnosi e sfaldamenti dei tessuti corticali, imbrunimenti della corteccia e ampie zone necrotiche del cilindro centrale. Questa malattia porta alla riduzione della produzione, al deperimento della pianta e nei casi più gravi alla sua morte ed è stata individuata in Italia nel passato ventennio (Cristinzio e Iannini, 1996). Diverse specie di fitoftora sono state associate alla presenza di gravi deperimenti in actinidia nel mondo ad iniziare dagli anni 1990 in Cile (Latorre *et al.*, 1991; Zaviezo *et al.*, 1993), agli inizi del 2000 in Corea (Lee *et al.*, 2001) e molto più recentemente in Iran (Taheri *et al.*, 2012), Francia e Turchia (Baudry *et al.*, 1993; Kurbetli e Sirel, 2013). Di questo periodo sono pure le segnalazioni di gravi casi in provincia di Verona, (Fig. 1.3) dove estesi fenomeni di moria sono stati associati alla presenza di *Phytophthora spp.*, in particolare di *P. cryptogea* e *P. citrophthora* (Mazzucchi e Mazzucchi, 2013a; 2013b; Tacconi *et al.*, 2014).



Fig. 1.3. Giovani piante di actinidia infette da fitoftora (Mazzucchi *et al.*, 2014).

Le fitoftore terricole si disseminano nel terreno per mezzo di zoospore biflagellate mobili in acqua fino a qualche mm. In ambiente naturale è stata valutata in 1,5 metri la distanza di disseminazione annuale da una pianta infetta. Questo tipo di disseminazione attiva a breve distanza spiega in parte la distribuzione a chierica nel frutteto e le associazioni di più piante malate lungo un filare. Si comprende facilmente come l'acqua in movimento alla superficie o nei pori intercomunicanti del terreno possa essere vettrice a breve, media e grande distanza degli zoosporangi e delle zoospore, ma anche di oospore, elementi di conservazione risultato della loro riproduzione sessuata (Mazzucchi *et al.*, 2013a).

### Fitoplasmi

I fitoplasmi sono batteri privi di parete cellulare, appartengono alla classe *Mollicutes*, possiedono un genoma di dimensioni nettamente inferiori a quello batterico, compreso tra 530 e 1350 kb. Sono parassiti obbligati, endocellulari a localizzazione floematica, trasmissibili per propagazione vegetativa e micropropagazione ed attraverso insetti vettori floemomizi. La prima segnalazione di questi patogeni in actinidia risale al 1999 (Marzachi *et al.*, 1999) quando venne individuato il gruppo 16SrXII-A (“stolbur”) in campioni di actinidia provenienti dalla Liguria.



Fig. 1.4. Sintomi da fitoplasmi in plantule di *Actinidia* spp.(Bertaccini *et al.*, 2011).

Nel 2011 (Bertaccini *et al.*, 2011) è stata individuata la presenza di diversi fitoplasmi in piante di actinidia che presentavano sintomatologie specifiche quali arrossamenti fogliari nelle regioni internervali e crescita stentata con foglie a consistenza vitrea e più carnosa del normale (Fig. 1.4). Da studi su materiali di

actinidia aventi queste sintomatologie sono stati individuati fitoplasmi appartenenti ai gruppi ribosomici 16SrI, 16SrV e 16SrXII in alcune aree di coltivazione italiane.

### ***Pseudomonas syringae* pv. *viridiflava***

Agente della maculatura batterica dell'actinidia, è in grado di arrestare e/o alterare lo sviluppo dei fiori e dei boccioli e la loro successiva cascola, determina danni principalmente a livello fogliare ove induce la formazione di maculature idropiche di forma angolare che poi necrotizzano (Balestra e Varvaro, 1997).

### ***Pseudomonas syringae* pv. *syringae***

Rappresenta uno dei batteri fitopatogeni più pericolosi e dannosi per le piante di actinidia (Rossetti e Balestra, 2008) in quanto è in grado di colonizzare la pianta vivendo sia come epifita che come endofita, provocare necrosi fiorali e determinare danni parenchimatici a carico di foglie e tralci. Inoltre come molte altre pseudomonadi, favorisce la nucleazione del ghiaccio, aumentando notevolmente il rischio di danni da gelo (Lindow, 1995).

### ***Virus***

Attualmente sono stati identificati 13 virus capaci di infettare diverse cultivar di actinidia causando sintomi come clorosi, necrosi fogliari poligonali, maculature ad anello e mosaici internervali, possono essere trasmessi da seme, polline ed insetti vettori (Blouin *et al.*, 2013).

## **1.3 PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. ACTINIDIAE**

*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) è la patovar che per prima fu descritta in Giappone nel 1989 come agente causale del cancro batterico dell'actinidia (Takinawa *et al.*, 1989).

Psa è un batterio Gram negativo, aerobio facoltativo a forma bastoncellare con flagelli polari, negativo ai test dell'ossidasi e dell'argininina deidrolasi, positivo al test di ipersensibilità in tabacco e con un contenuto in GC compreso tra 58,5% e 58,8%. Il batterio appartiene alla specie *Pseudomonas syringae*, genomospecie 8 (Gardan *et al.*, 1999). La genomospecie è un sistema di classificazione basato sulla riassociazione DNA – DNA di batteri appartenenti allo stesso genere; le pseudomonadi



sono divise in 9 genomospecie. Dello stesso gruppo genetico fanno parte 3 aplotipi denominati Psa1; Psa2; Psa3 (Scortichini *et al.*, 2012).

E' un batterio capace di sopravvivere come epifita nella fillosfera ed endofita specialmente nel sistema vascolare della pianta (Renzi *et al.*, 2012) e possiede, analogamente alle altre pseudomonadi, possiede un sistema di secrezione di tipo III che gli consente di introdurre nel citoplasma delle piante ospiti fattori di virulenza specifici che favoriscono l'instaurarsi del rapporto patogenetico, a differenza di altre pseudomonadi non ha la capacità di nucleare il ghiaccio (Cunnac *et al.*, 2009).

### **Ciclo del cancro batterico dell'actinidia (CBA)**

Per contrastare gli effetti devastanti di Psa, è di primaria importanza conoscere il ciclo biologico di CBA ed i meccanismi e la dinamica di invasione dell'ospite da parte del batterio. Psa si muove nei tessuti da lesioni fogliari attraverso la nervatura centrale e dai petali agli stami ed alle branche causando i tipici cancri, generalmente la malattia appare più grave in zone più ventose o che in ogni modo favoriscono la dispersione del batterio (Serizawa *et al.*, 1989).

Le indagini epidemiologiche hanno evidenziato che Psa è particolarmente virulento a temperature comprese tra 10 e 20°C, ma non superiori a 25°C. Un fattore che predispone la diffusione del patogeno è rappresentato dalla bagnatura delle piante dal momento che questo aumenta la sua capacità di sopravvivenza e di moltiplicazione sia nella fillosfera che a livello endofita nell'intera pianta (Serizawa e Ichikawa, 1993a; 1993b; 1993c; Minardi, 2010; Mazzaglia *et al.*, 2010; Scortichini *et al.*, 2012; Renzi *et al.*, 2012).

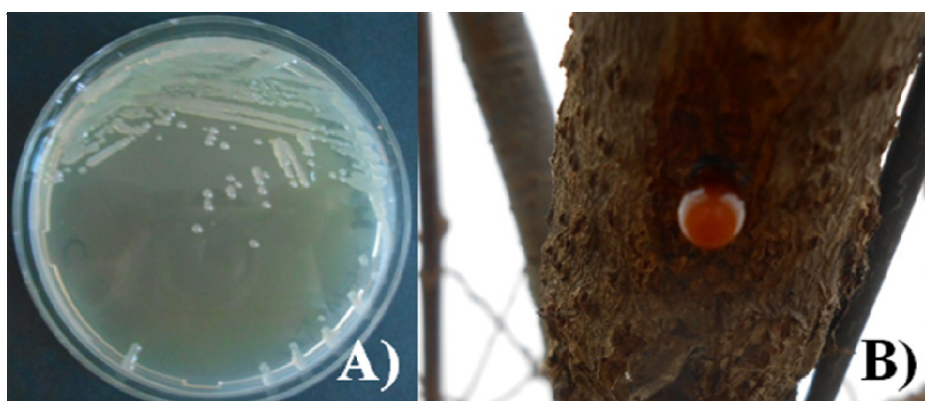


Fig. 1.5. A) Colonie levaniiformi di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolate in coltura pura da essudato rossastro presente su una branca di un pianta di *Actinidia deliciosa* cv. Hayward - impianto 2009; azienda emiliano romagnola, B) raccolto il 19 febbraio 2014 e inseminato direttamente su piastra di NSA (Foto P. Minardi, 2014; P. Minardi, dati non pubblicati).

Le infezioni avvengono a partire dalla primavera - inizio estate e proseguono in autunno - inverno. La malattia si manifesta, tipicamente, all'inizio della ripresa vegetativa con la produzione di un essudato rosso-ruggine fuoriuscente dai tagli di potatura, dalle branche, dalle cicatrici fogliari e dalle gemme (Fig. 1.5B). I rami colpiti presentano la corteccia rossastra, umida al tatto, mentre i tessuti sottostanti mostrano decolorazioni rossastre e imbrunimenti; tronco e rami possono presentare delle fessurazioni della corteccia e formazione di cancri (Fig. 1.6A); i bottoni fiorali, i fiori e le gemme fiorali risultano imbrunite e vanno incontro ad avvizzimento e cascola; su foglia inizialmente si osservano piccole maculature idropiche a contorno poligonale che evolvono in macchie necrotiche circondate da alone clorotico (Fig. 1.6B); in taluni casi la foglia avvizzisce completamente; i frutti collassano (Fig. 1.7) e nei casi più gravi l'intera pianta muore nel corso di una stagione vegetativa (Fig. 1.8). Le piante malate devono essere estirpate (Fig. 1.9).



Fig. 1.6. Sintomi tipici del cancro batterico in piante di *A. deliciosa* cv. Hayward su A) tralci (cancro corticale) e B) su foglie (maculature con alone clorotico (Foto P. Minardi, 2014; P. Minardi, dati non pubblicati).



Fig. 1.7. Sintomi tipici del cancro batterico dell'actinidia in piante di *A. deliciosa* cv. Hayward su frutti avvizziti e mummificati di piante di *A. chinensis* cv. Hort16A colpite dal cancro batterico (Foto P. Minardi, 2014; P. Minardi, dati non pubblicati).



Fig. 1.8. Pianta di *A. deliciosa* cv. Hayward gravemente colpita da cancro batterico (Foto P. Minardi, 2014; P. Minardi, dati non pubblicati).



Fig. 1.9. Estirpazione di un intero impianto di *A. chinensis* cv. Hort16A gravemente colpito da cancro batterico (Foto P. Minardi, 2014; P. Minardi, dati non pubblicati).

Nelle infezioni autunno-invernali la malattia si manifesta generalmente con disseccamenti di cordoni e di tronchi che a volte presentano cancri rilevabili però solo poco prima o all'inizio della ripresa vegetativa. Le vie di penetrazione del patogeno sono principalmente gli stomi, le lenticelle, le gemme (Minardi *et al.*, 2014a) e le ferite spesso causate dalle pratiche agronomiche o dagli agenti atmosferici (ad es. grandine). In generale la batteriosi compromette gravemente tutti gli organi vegetativi della pianta con un decorso anche molto rapido, che può condurre alla morte della pianta nell'arco di pochi mesi, determinando gravi ripercussioni economiche a carico dei produttori del settore.

La fase più pericolosa della malattia è la colonizzazione dei tessuti vascolari, spesso non associata a sintomi visibili, che può determinare il disseccamento di parti aeree; in questa fase il batterio è in grado di sopravvivere all'interno della pianta e diffondersi nel frutteto (Minardi *et al.*, 2014b). Il ciclo biologico della malattia è illustrato in Fig. 1.8.



Fig. 1.8. Ciclo biologico di CBA come osservato in Italia nelle aree caratterizzate dal clima mediterraneo. Al centro della figura sono evidenziate alcune tecniche agronomiche che, provocando lesioni, favoriscono la colonizzazione del patogeno (Scortichini *et al.*, 2012).

### Produzione di biofilm e *quorum sensing*

Un biofilm è una comunità ben strutturata di batteri racchiusi in una matrice polimerica prodotta dalle stesse cellule, cresce su superfici inerti o biologiche, specialmente all'interfaccia con una fase liquida (Parsek e Greenberg, 2005). La formazione di biofilm è un processo dinamico e complesso che si articola in diverse fasi: adesione alla superficie; colonizzazione; produzione di esopolimeri; maturazione

e rilascio dei batteri, ed è inoltre strettamente correlata alla coniugazione ed al trasferimento orizzontale di materiale genetico.

Quando il biofilm raggiunge la maturazione si attiva il sistema di segnalazione cellulare denominato *quorum sensing* in cui si verifica l'induzione di un gene specifico o di un pool di geni che mediano caratteri di patogenicità e virulenza quando la concentrazione dei batteri raggiunge il livello soglia (*quorum*); Hartmann e Schikora, 2012; Hartmann *et al.*, 2014). Questo meccanismo di comunicazione cellulare è presente anche in altri patosistemi (ad es. vite - *A. tumefaciens*) e consente alla popolazione batterica di attuare l'aggressione all'ospite solo quando il raggiungimento numerico è tale da assicurare il superamento delle risposte di difesa dell'ospite stesso (Chevrot *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2014).

Psa come molte altre specie batteriche (*Xylella fastidiosa*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*), adotta la strategia di produzione di biofilm durante le varie fasi del ciclo infettivo, sia al livello epifitico che a livello endofitico e per competere con le altre specie commensali (DanHorn e Fuqua, 2007; Morris e Monier, 2003).

### **Sistema di secrezione Tipo III**

L'analisi delle sequenze di 3 ceppi di Psa: J-Psa (NCPPB3739), I-Psa (NCPPB3871) e I2-Psa (CRA-FRU 8.43), ha mostrato la presenza di geni strutturali coinvolti nella biosintesi dei sistemi di secrezione di tipo I, II, III, IV e VI (Marcelletti *et al.*, 2011).

Il sistema di secrezione di tipo III codificato dai geni *hrp* risulta fondamentale per permettere il funzionamento delle proteine di avirulenza (Alfano e Collmer, 2004) ed è il sistema utilizzato da Psa per trasmettere i fattori di virulenza alle cellule ospiti, alcuni di questi fungono da effettori, altri da traslocatori che facilitano i primi ad attraversare la parete e la membrana delle cellule della pianta infetta. Sistemi di secrezione di tipo III esistono anche in altri batteri fitopatogeni (ad es. *E. amylovora*) dove sono coinvolti sia nel causare malattia nell'ospite suscettibile, sia nell'indurre la risposta ipersensibile in piante resistenti o non-ospiti. Questi sistemi consistono in 15-20 proteine formanti un apparato di secrezione e di due gruppi di proteine effettrici: le arpine e le proteine di avirulenza; le prime sono presumibilmente secrete nell'apoplasto e non oltrepassano la membrana citoplasmatica, le seconde sono secrete di regola nel simplasto (Minardi e Mazzucchi, 1996; Musa *et al.*, 2001).

Un'indagine comparativa degli effettori dei tre ceppi sequenziati di Psa con gli effettori di *P.s. pv. tomato* DC3000, altri ceppi di *P. syringae* e Psa MAFF302091

ha rivelato un “core” di geni conservati per effettori putativi di 33 *hop* (“hrp out proteins”) e 6 *avr* (“avirulence”) (Fig. 1.9).

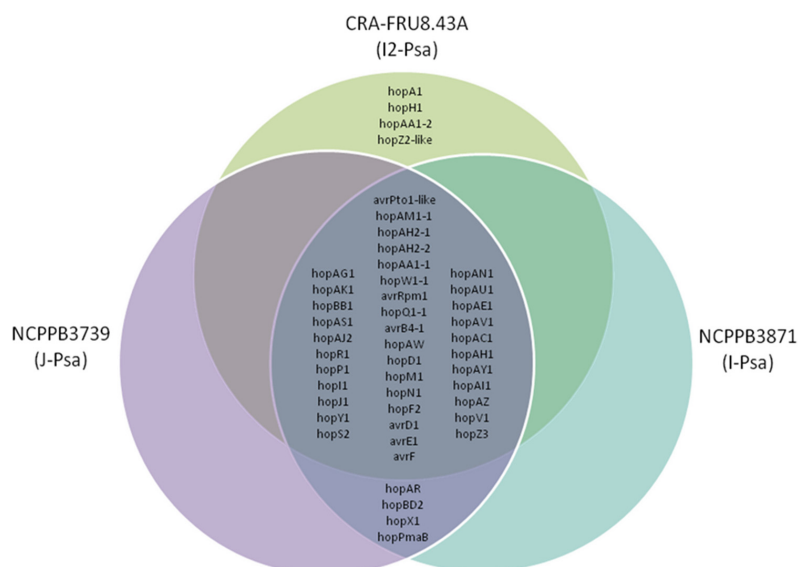


Fig. 1.9. Diagramma di Venn dei geni effettori di tipo III dei ceppi J-Psa, I-Psa e I2-Psa basato sul confronto di sequenze complementari presenti in altre pseudomonadi fitopatogene. I geni conservati dai ceppi sono indicati al centro del diagramma. J-Psa, I-Psa e I2-Psa presentano solo quattro diversi geni effettori (Marcelletti *et al.*, 2011).

### Caratteristiche morfo-fisiologiche

Su substrato nutritivo NSA (Garrett *et al.*, 1966) le colonie di Psa si presentano lisce, convesse, circolari con margine intero, color bianco-perla (Fig. 1.5A). Le colonie sono brillanti quando sono fresche, successivamente diventano più pallide e il colore vira all’avorio. Su substrato KB (King *et al.*, 1954), appaiono lisce, piatte con margini interi leggermente lobati e di colore perlato bianco-giallastro, di dimensioni di 4-5 mm e con una minuscola macchia bianca al centro (P. Minardi, 2010, dati non pubblicati; EPPO, 2014; Loreti *et al.*, 2014). Le colonie di Psa sono incapaci di produrre pigmento fluorescente su substrato KB e sono in grado di indurre la risposta di ipersensibilità in foglie di tabacco ed i sintomi tipici della malattia in piantine di actinidia (Minardi *et al.*, 2012a). Ulteriori caratteristiche biochimiche che caratterizzano i ceppi di questo patogeno sono l’assenza di citocromo *c* ossidasi e di arginina deidrolasi, l’incapacità di idrolizzare esculina, di causare il marciume della patata e di indurre la nucleazione del ghiaccio (Tabella 1.1) (Loreti *et al.*, 2014).

Tests	Results
Gram's reaction	–
Cytochrome C oxidase reaction	–
Fluorescent pigment on King's medium B	–
Gelatin liquefaction	–
Levan	+
Oxidation/fermentation test (Hugh & Leifson, 1953)	Oxydative
<i>Hydrolysis of:</i>	
Aesculine	–/+-
Arbutin (facultative)	–
Casein (facultative)	+
Urease	–
<i>Utilisation of:</i>	
D-xylose	–
L-Arabinose	+
Inositol	+
Erythritol	–
DL-Lactate	–
n-Caprato	–
L-Hystidine	–
L-Serine	+
L-Arginine	+
Trigonelline	–
L-Leucine	+
L-Tyrosine	+

Tab. 1.1. Caratteristiche biochimiche e metaboliche di *P. syringae* pv. *actinidiae* (Tatikawa *et al.*, 1989).

### Caratteristiche genetiche

Analogamente a quanto si verifica in altri batteri fitopatogeni, il genoma di Psa comprende geni determinanti per la sua sopravvivenza nella pianta ospite e per la competizione con i componenti del microbioma della fillosfera, questi geni sono spesso raggruppati nelle cosiddette isole di patogenicità (Rohmer *et al.*, 2004; Grant *et al.*, 2006).

Nel genoma di Psa sono stati identificati anche i geni *copA* e *copB*, che hanno un ruolo fondamentale nella resistenza al rame, gli ioni rameici sono essenziali per le specie batteriche ma possono indurre effetti tossici cellulari se i livelli di ioni liberi non sono controllati (Cooksey, 1993). Dai primi isolamenti effettuati in Giappone risulta che tutti i ceppi di Psa esprimevano solo i geni *copA* e *copB* (Nakajima *et al.*, 2002), dopo ripetuti trattamenti al rame, il patogeno ha iniziato ad esprimere geni addizionali responsabili di resistenza al rame, designati *copR* e *copS*. Psa può

facilmente tollerare la streptomina attraverso i meccanismi di resistenza, come già osservato in Giappone ed in Sud Corea (Nakajima *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). L'efficienza nell'acquisizione di ferro attraverso siderofori è considerata un importante fattore di virulenza per le pseudomonadi fitopatogene, specialmente in ambienti con bassa disponibilità di ferro (Neilands, 1995).

I diversi ceppi di Psa analizzati attraverso sequenziamento genico anche se sono stati isolati da maculature fogliari, mostrano comunque gruppi di geni coinvolti nella degradazione di derivati della lignina e altri polifenoli (Scortichini *et al.*, 2012). Fino alla prima metà del 2014 in base alle ultime classificazioni, venivano proposti 4 aplotipi di Psa, tra cui l'ultimo denominato LV ("low virulent"), ritrovato solamente in Nuova Zelanda ed in Australia (Scortichini *et al.*, 2012).

In base a comparazioni dei genomi sequenziati sono recentemente state discriminate tre popolazioni di Psa: Psa 1 che include i ceppi da Giappone e Italia presenti nei focolai più vecchi, 1992; Psa 2 che include i ceppi isolati in Sud Corea durante la passata epidemia; Psa 3 che include i ceppi della corrente epidemia mondiale (Ferrante *et al.*, 2015). Questa classificazione è stata effettuata su diversi ceppi di Psa a seguito di analisi molecolari su 29 geni per proteine effettrici del sistema di secrezione di tipo III e dal confronto algoritmico UPGMA dei modelli ottenuti tramite rep-PCR ("fingerprinting patterns") (Fig. 1.10).

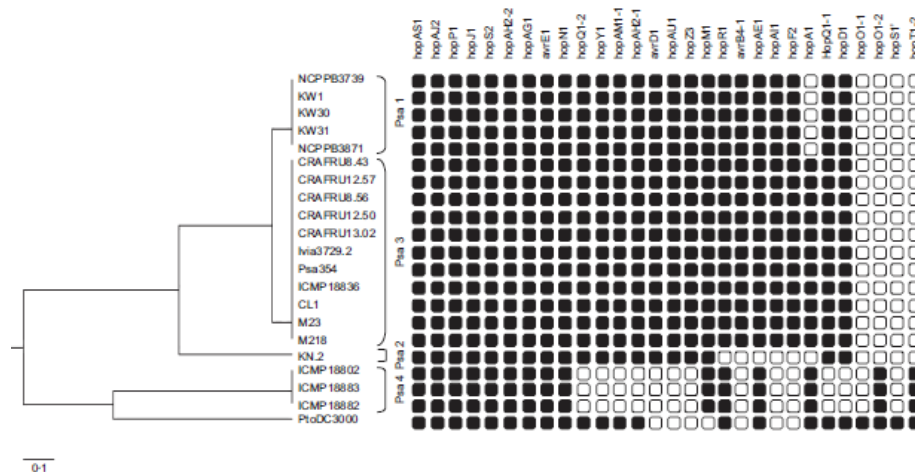


Fig. 1.10. Analisi PCR della presenza/assenza dei geni per le proteine effettrici del sistema di secrezione di tipo III di 4 popolazioni di Psa ed il corrispettivo dendrogramma dei ceppi relazionati con analisi UPMGA. I quadrati pieni rappresentano la presenza e quelli vuoti l'assenza. La scala in basso indica il grado di similarità genetica tra ceppi (Ferrante *et al.*, 2015).



## 1.4. IL CANCRO BATTERICO DELL'ACTINIDIA

### Sintomatologia

Il cancro batterico dell'actinidia è una malattia occlusiva ed a livello endofitico interessa in primo luogo i vasi xilematici; i cancri nei tronchi e tralci primari che evolvono più rapidamente nel tardo inverno-primavera, sono tra i sintomi più gravi poiché cingono/occludono internamente la branca uccidendola, portando nei casi più gravi alla morte dell'intera pianta (Young, 2012). CBA è una malattia policiclica con lunghi periodi di latenza, la sua progressione a livello endofitico è riscontrabile da cancri su tronchi e cordoni mentre a livello epifitico è pressoché esclusivamente legata all'espressione della malattia sulle parti nuove/annuali della pianta (foglie e tralci).

Un tipico sintomo della malattia, caratteristica diagnostica molte volte oggetto di opinioni divergenti, è la comparsa all'inizio della ripresa vegetativa di essudati biancastri, a volte denominati gommosi (Young, 2012) e di essudati di diversa natura di colore rosso rubino, molto suggestivi e chiari sintomi di uno stadio avanzato della malattia (Fig. 1.5.B). Esistono evidenze di un movimento a distanza significativo di singole cellule batteriche sia nel parenchima che nei vasi. Le cellule moltiplicano ai margini delle lesioni, spingendo le giovani cellule nei tessuti adiacenti, facendo così avanzare la lesione. Nei tronchi e nei cordoni la diffusione del patogeno sembra avvenire attraverso diversi elementi tissutali, inclusi il parenchima esterno e lo sclerenchima dello strato legnoso interno. E' stato suggerito che l'infezione sia sistemica, muovendo dalle maculature fogliari dentro le branche attraverso il sistema vascolare (Renzi *et al.*, 2012).

La sintomatologia tipica di Psa coinvolge la fisionomia della pianta nella sua interezza, il patogeno infetta l'ospite tramite gli stomi, gli idatodi, le lenticelle, i tricomi, cicatrici o ferite fogliari, e può progredire fino alle radici dove sverna (Mazzaglia *et al.*, 2010); allo stesso modo non è ancora mai stato ritrovato in frutti (P. Minardi, 2010, dati non pubblicati), mentre riesce a sopravvivere nei tralci di potatura a terra anche per diverse settimane, favorendo così notevolmente la propria dispersione. Serizawa e collaboratori (1989) descrivono il danno associato a Psa in due fasi, la prima nel periodo autunno/invernale che comprende i danni al tronco e alle branche, la seconda in primavera che invece comprende i danni sulle nuove parti in sviluppo, fiori, foglie, germogli (EPPO, 2012).

In primavera e comunque dopo la ripresa vegetativa i sintomi tipici sulle parti aeree della pianta sono: foglie con maculature necrotiche poligonali con alone

clorotico, imbrunimento dei germogli, avvizzimenti delle branche e dei fiori che assumono colorazioni più giallastre rispetto al tipico colore bianco del fiore sano, questi sono sintomi stagionali, mentre altri sintomi della malattia e presenti anche nella stagione autunno/invernale si notano sulle parti strutturali primarie come fusto e branche, e sono arrossamenti ed ipertrofie delle lenticelle, cancri su fusto e branche con l'emissione di tipici essudati rossastri. La rimozione dello strato corticale può permettere di rilevare una decolorazione bruna del floema con arrossamenti del tessuto in corrispondenza delle lenticelle.

Poiché alcuni dei sintomi (maculature fogliari e disseccamento florale) possono essere causati anche da altri batteri fitopatogeni (*P. syringae* pv. *syringae*, *P. viridiflava*), le analisi di laboratorio sono sempre necessarie per la conferma della presenza del patogeno (Balestra e Varvaro, 1998; Rosetti e Balestra, 2008). Psa si moltiplica nei tessuti della pianta preferenzialmente in primavera ed autunno, quando le temperature sono tra i 10°C e i 20°C, e le infezioni e la dispersione del patogeno sono favorite da eventi atmosferici come piogge, vento, grandine e gelate. La temperatura ottimale di crescita per Psa è 12-18°C (Serizawa e Ichikawa, 1993c).

## **Epidemiologia**

Il clima è il principale determinante della severità dell'evento epidemico da Psa, il microclima in campi coltivati ad actinidia è un punto critico nel determinare la severità e l'estensione locale della malattia. Questo significa che mentre può essere possibile determinare l'estensione di un'area a rischio, previsioni più dettagliate non sono possibili (Young, 2012). Come per la maggior parte delle altre malattie batteriche, situazioni atmosferiche e meteorologiche come forte vento, piogge intense, grandinate e gelate, favoriscono la diffusione del patogeno, forte vento in concomitanza di eventi piovosi, provoca ferite nelle piante e disperde l'essudato batterico alle ferite provocate o alle aperture naturali (Serizawa *et al.*, 1989).

Una volta avvenuta l'infezione, il decorso della malattia è largamente determinato dalla temperatura: Psa causa malattia a temperature relativamente basse, risulta più attivo a 18°C e riduce progressivamente la sua severità sopra 20°C (Young, 2012). Temperature sopra 20°C sfavoriscono il batterio e Serizawa e collaboratori (1993) indicano che in Giappone non ci sono sintomi osservabili per temperature sopra 25°C, anche se in Francia, Italia e Portogallo si sono riscontrati sintomi riconducibili a Psa anche a temperature superiori a 25°C (EPPO, 2012). La repentina diffusione a livello mondiale della batteriosi ha prodotto uno sforzo crescente verso lo sviluppo di

modelli in grado di valutare il potenziale rischio globale e locale di diffusione della malattia. Il potenziale areale di distribuzione Psa è stato analizzato mediante due modelli previsionali (CLIMEX e MaxEnt; Fig. 1.11), che hanno tenuto conto di tutte le segnalazioni di Psa a livello mondiale, analizzando i dati ambientali degli ultimi 50 anni relativi a tutte le aree del mondo idonee per la coltivazione dell'actinidia (Narouei Khandan *et al.*, 2014).

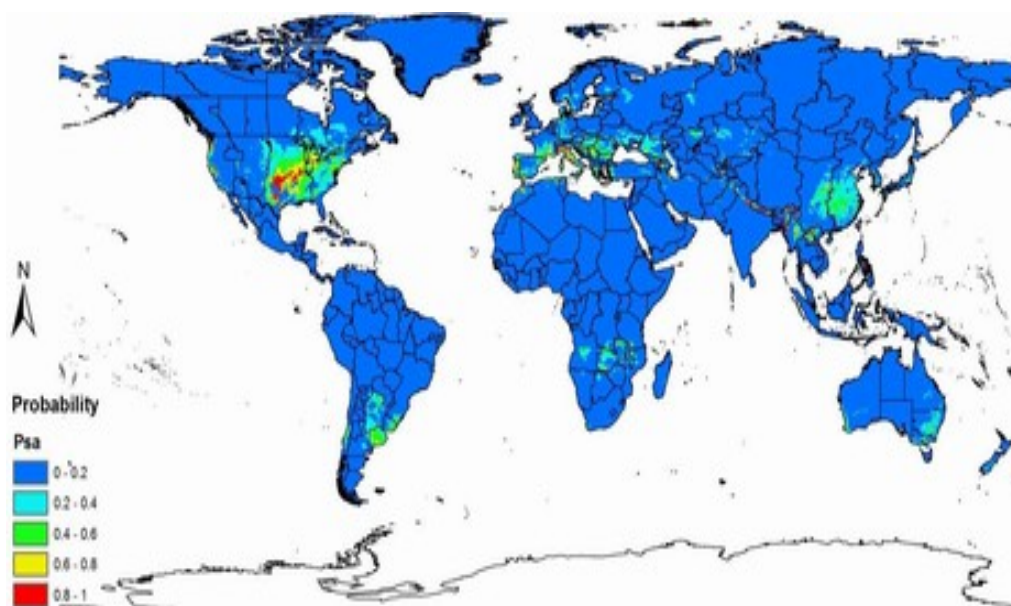


Fig. 1.11. Risultati della probabile distribuzione mondiale di PSA ottenuti mediante il modello MaxEnt. I colori in rosso ed in giallo indicano una maggiore idoneità climatica (Balestra, 2014).

La propagazione via polline per un batterio fitopatogeno è un modo molto comune di diffusione della malattia, ad esempio il polline è stato riportato essere una delle sorgenti di inoculo batterico per *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, agente causale del cancro batterico del noce (Ark, 1944; Garcin *et al.*, 2001). Gli organi fiorali, che sono vie di entrata per il patogeno, sono anche un'ottima via di evasione, sia attraverso i normali agenti atmosferici ed entomologici, sia anche soprattutto attraverso la commercializzazione del polline, particolare che aiuta e velocizza notevolmente la diffusione epidemica. Benché i fiori di actinidia siano fragranti, non producono nettare e non sono quindi attrattivi per gli insetti impollinatori, così l'impollinazione deve avvenire in un tempo relativamente corto di tempo, circa 6 giorni, quando gli stigmi sono ricettivi al polline (Vanneste *et al.*, 2011b).

L'impollinazione artificiale è una tecnica molto diffusa negli actinidietti, ma può portare dei rischi legati agli onerosi controlli della forte commercializzazione del

polline stesso. Esperimenti di inoculo controllato su piante di actinidia, con polline sano ed artificialmente contaminato, hanno portato all'isolamento del patogeno da fiori, foglie e frutticini immaturi, confermando la sopravvivenza del patogeno almeno per un giorno dopo l'impollinazione (Tontou *et al.*, 2014) esistono chiaramente limiti e considerazioni dipendenti dalle strategie di impollinazione, dallo stato di salute dell'ospite e dalla sua suscettibilità varietale, ma in ogni caso anche Psa può essere veicolato e diffondersi via polline (Ministry of Agriculture, Forestry NZ, 2011; Tontou *et al.*, 2014).

## **1.5 COMPARSA DELLA MALATTIA IN ITALIA E NEL MONDO**

Anche se la malattia del CBA è stata per la prima volta osservata in California (Opgenorth *et al.*, 1983), l'isolamento di Psa, ha inizio dal 1984 in Giappone (Takikawa *et al.*, 1989) e in Cina (Fang *et al.*, 1990); in seguito, nel 1992, Psa viene isolato per la prima volta in Italia in Lazio (Scortichini, 1994).

Successivamente le segnalazioni e gli studi si sono intensificati anche in riguardo alle popolazioni batteriche di *P. syringae* pv. *syringae* e di *P. syringae* pv. *viridiflava*, che sono in grado di determinare danni a carico di foglie, boccioli e fiori (Rossetti *et al.*, 2009), che possono essere erroneamente attribuiti a Psa. Aplotipi differenti delle diverse zone di comparsa rendono difficile l'interpretazione dell'origine di questa massiccia epidemia che nel corso di tre anni è riuscita a diffondersi nell'intero globo, portando a grosse perdite economiche e portando ad inserire Psa nelle liste di allerta per i patogeni da quarantena.

Cronologicamente nel 2010 la malattia è ormai globalmente diffusa arrivando a raggiungere il Cile (EPPO, 2011a); il batterio viene inoltre identificato ed isolato anche in altre zone d'Europa e non come Portogallo (Balestra *et al.*, 2010), Francia (EPPO, 2010, Vanneste *et al.*, 2011a), Spagna (Abelleira *et al.*, 2011; Balestra *et al.*, 2011), Svizzera (EPPO, 2011b), Germania (EPPO, 2013), Nuova Zelanda (Everett *et al.*, 2011) ed Australia (EPPO, 2011c) e Turchia (Bastas *et al.*, 2012). (Tabelle 1.2 e 1.3).

Luogo	Anno di ritrovamento	Anno di segnalazione	Bibliografia
Giappone	1984	1989	Serizawa <i>et al.</i> , 1989; Taticawa <i>et al.</i> , 1989.
Corea del Sud	1992	1994	Koh <i>et al.</i> , 1994.
Italia (Lazio)	1992	1994	Scortichini <i>et al.</i> , 1994.
Cina (Shaanxi)	1990	1993	Zhu <i>et al.</i> , 1993.
Francia	2010	2010	EPPO, 2010; Vanneste <i>et al.</i> , 2011.
Nuova Zelanda	2010	2010	Everett <i>et al.</i> , 2011.
Spagna	2011	2011	Abelleira <i>et al.</i> , 2011; Balestra <i>et al.</i> , 2011.
Australia	2011	2011	EPPO, 2011c.
Cile	2012	2012	EPPO, 2011a; SAG 2011.
Turchia	2012	2012	Bastas, <i>et al.</i> , 2012.
Germania	2013	2013	EPPO, 2013.

Tab. 1.2. Primi ritrovamenti di *Psa* in *A. deliciosa* cv Hayward.

Luogo	Anno di ritrovamento	Anno di segnalazione	Bibliografia
Giappone	1984	1989	Serizawa <i>et al.</i> , 1989; Taticawa <i>et al.</i> , 1989.
Cina (Sichuan)	1989	1990	Fang <i>et al.</i> , 1990.
Corea del Sud	1994	1994	Koh <i>et al.</i> , 1994.
Italia (Lazio)	2008	2009	Ferrante <i>et al.</i> , 2009.
Portogallo	2010	2010	Balestra <i>et al.</i> , 2010.
Francia	2010	2010	EPPO, 2010.
Nuova Zelanda	2010	2010	Everett <i>et al.</i> , 2011.
Cile	2010	2010	EPPO, 2011a; SAG 2011.
Svizzera	2011	2011	EPPO, 2011b.
Spagna	2011	2011	Abelleira <i>et al.</i> , 2011; Balestra <i>et al.</i> , 2011.
Australia	2011	2011	EPPO, 2011c.
Turchia	2012	2012	Bastas, <i>et al.</i> , 2012.
Germania	2013	2013	EPPO, 2013.

Tab. 1.3. Ritrovamento *Psa* in *A. chinensis* cvs Hort 16, Jin Tao e Soreli.

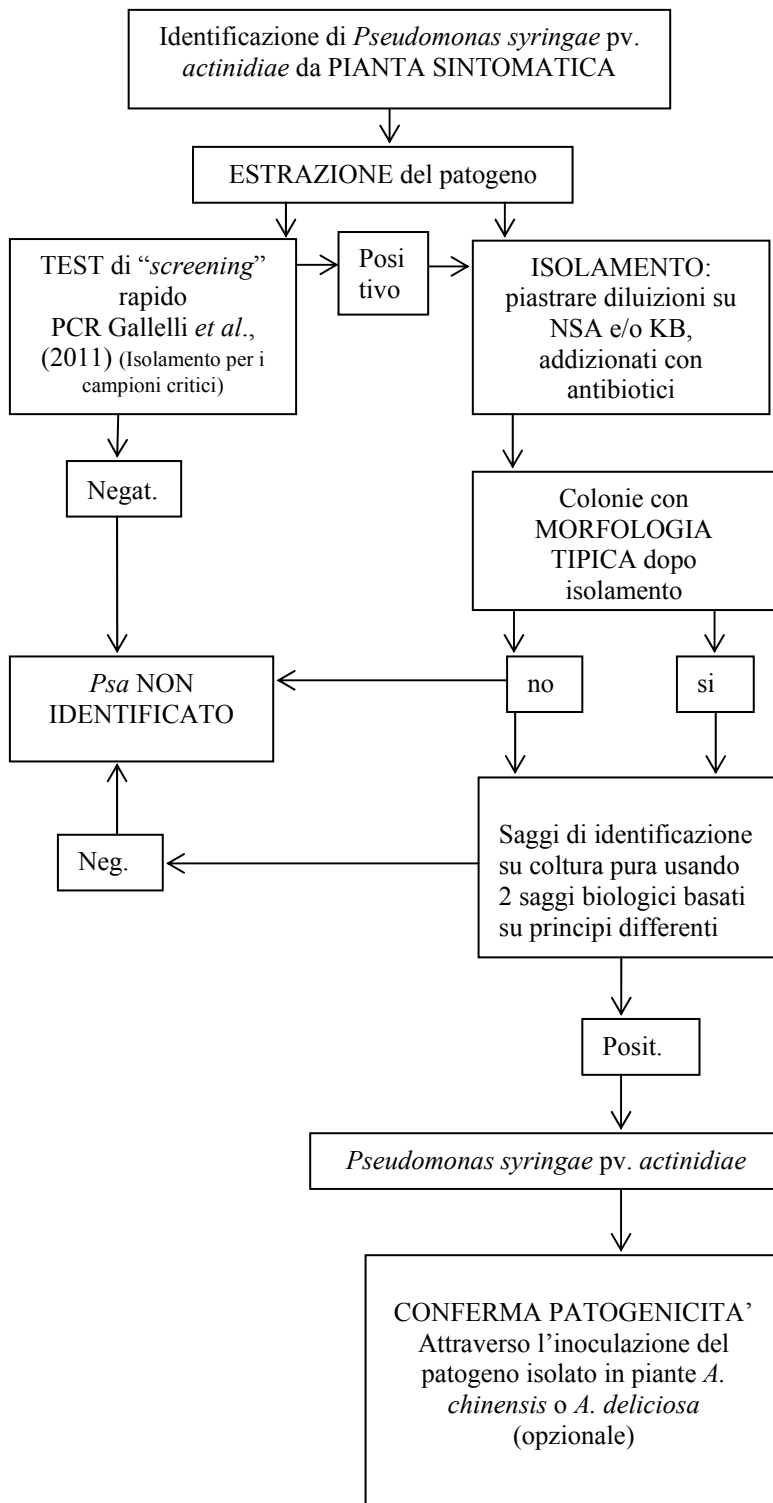
## 1.6. PREVENZIONE E DIAGNOSI PREVENTIVA

Non esiste, al momento, una soluzione definitiva per combattere in maniera specifica la batteriosi dell'actinidia, i protocolli sono basati sulle disposizioni operative utilizzate per altri patosistemi. Il tempestivo riconoscimento dei sintomi ha comunque un'importanza fondamentale per poter agire tempestivamente sulle piante colpite. Una volta che la malattia è stata identificata, il suo sviluppo può essere contenuto eliminando le parti sintomatiche e/o l'intera pianta che vanno immediatamente asportate e bruciate, nel caso sia il tronco a mostrare i sintomi la pianta va capitozzata.

Le operazioni di potatura, in particolar modo la potatura verde, sono importanti e da eseguire in condizioni asciutte, almeno i tagli più importanti vanno coperti con mastice

cicatrizzante. I tagli di potatura sono in grado di infettarsi anche dopo 30 giorni e se questa viene effettuata in prossimità del periodo del “pianto”, le ferite sono maggiormente infettabili (Antoniacci *et al.*, 2013).

Schema 1.1. “Flow chart” da per l’identificazione di Psa (molecolare e microbiologica) da piante sintomatiche ed asintomatiche di *Actinidia* spp. (EPPO, 2014).



La mancanza di un reale ed efficace metodo per contrastare la malattia rende ancora più necessario il controllo, il monitoraggio e la prevenzione. In questa situazione di evidente importanza appare la diagnosi preventiva; i sintomi più o meno precoci sono comunque un'espressione della presenza della malattia, essendo la malattia policiclica ed il patogeno capace di sopravvivere in nicchie all'interno dell'ospite, il riconoscimento visivo altro non è che una constatazione tardiva di un'infezione già avvenuta, presente ed insediata nell'ospite. Data la particolarità della malattia, il metodo diagnostico deve raggiungere livelli più sensibili e specifici di indagine in tutte le sue fasi (Mucini *et al.*, 2011; Minardi *et al.*, 2012a; 2012b).

Per quanto riguarda l'osservazione visiva in campo si può procedere con la visualizzazione dei sintomi, ad esempio in nuovi impianti asintomatici al momento della messa a dimora, utilizzando il fenomeno fisiologico del "pianto" dell'actinidia. Psa può rimanere in uno stato di latenza per periodi molto lunghi. Dalla collaborazione di più enti di ricerca coinvolti nel programma 2009/2011, finanziato dalla regione Emilia-Romagna, sono stati prodotti protocolli regionali in merito alla prevenzione, inoltre a livello europeo sono stati prodotti gli schemi per il riconoscimento e l'identificazione di Psa da materiale sintomatico e asintomatico (Schemi 1.1 e 1.2).

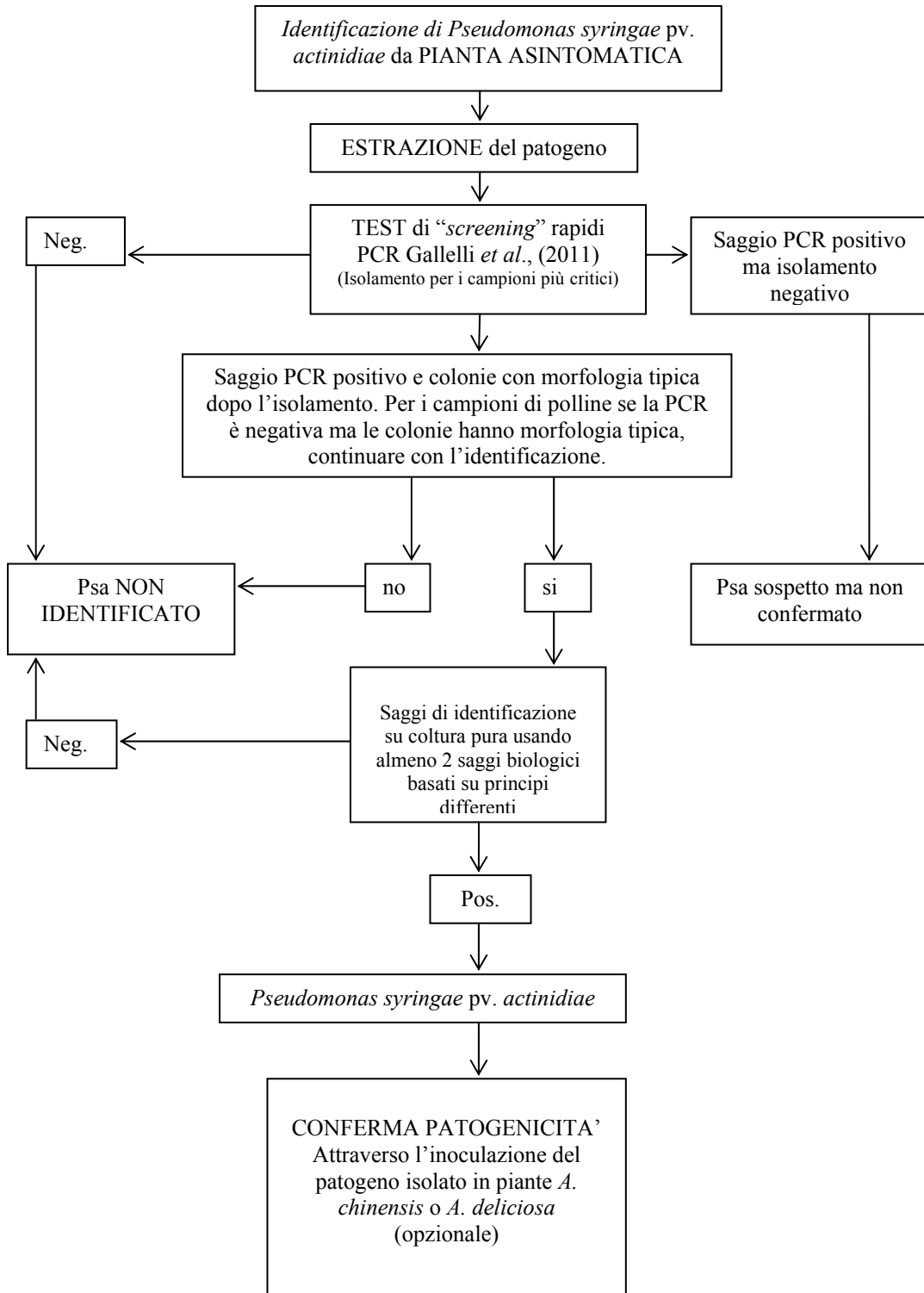
## **1.7. LA LOTTA**

La gazzetta ufficiale anno 152° numero 69 del 25 Marzo 2011, regola ed espone il piano d'azione per la prevenzione ed il controllo del CBA in Italia nelle zone di contenimento e disciplina la produzione vivaistica di piante di actinidia e relativi materiali di moltiplicazione.

In questi ultimi anni la lotta a Psa è progredita notevolmente su diversi fronti che vanno al di là delle consuete ed essenziali pratiche agronomiche volte al contenimento della malattia e che spaziano in tutti i settori possibili:

- trattamenti termici: termoterapia e/o trattamenti termici in condizioni controllate
- trattamenti fisici e meccanici: soluzioni applicative volte alla protezione del frutteto, tecniche agronomiche
- lotta chimica: impiego di sostanze chimiche per il trattamento delle piante, volte al limitare e/o eradicare una malattia (agrofarmaci, pesticidi)
- lotta biologica: sfrutta i rapporti di antagonismo fra gli organismi viventi al fine di controllare la dinamica di popolazione di un organismo

Schema 1.2. “Flow chart” da per l’identificazione di Psa (molecolare e microbiologica) da piante sintomatiche ed asintomatiche di *Actinidia* spp. (EPPO, 2014).





### **Trattamenti termici**

Il pirodiserbo è un trattamento termico di disinfezione delle potature a terra, opera direttamente in campo e sfrutta l'azione del calore istantaneo. Prove condotte dal CRA di Roma hanno mostrato risultati ottimali di disinfezione riuscendo ad eliminare la presenza di Psa dai residui di potatura, l'efficacia dell'operazione è stata valutata attraverso saggi microbiologici e molecolari (Tomasone *et al.*, 2014).

Esperimenti sul polline condotti da Everett e collaboratori (2012) suggeriscono che la vitalità del polline non viene compromessa da esposizioni a temperature di 35°C in condizioni di umidità relativa controllata, mentre si riesce a ridurre sensibilmente la quantità di Psa.

### **Trattamenti fisici e meccanici**

Tecniche agronomiche come la forma di allevamento, l'irrigazione, la gestione del suolo sono importanti per diminuire i rischi legati alla persistenza di elevata umidità relativa all'interno del frutteto e di una buona e precoce lignificazione dei rami per impedire la colonizzazione di Psa (Scortichini, 2014).

Un'altra soluzione interessante è quella proposta da uno studio condotto sull'utilizzo di reti antigrandine fotoselettive; perché indirettamente le reti antigrandine interagiscono con la profilassi anti Psa non solo riducendo le ferite causate da eventi come grandinate e vento, ma anche limitando l'insorgenza di condizioni di stress nella pianta. Considerata l'importanza che la luce riveste nella produzione di actinidia, per verificare l'effetto delle alterazioni che essa subisce sotto le reti protettive sono state messe a confronto diversi tipi di rete di diversi colori tenendo in considerazione molti elementi quali; il fattore di ombreggiamento o diffusione della luce, l'influenza sull'efficienza del processo fotosintetico, il contenuto di clorofilla, la traspirazione, la temperatura, gli scambi gassosi e non per ultimo la qualità delle stesse reti.

Ne è emerso che le reti di colore giallo non ostacolano la fotosintesi, il che viene tradotto in una maggiore fissazione del carbonio in forma di zuccheri da investire nella formazione di nuovi germogli e radici, e sono quindi le più indicate per questo tipo di coltivazione e non solo (Bravetti *et al.*, 2014).

### **Lotta chimica**

In Giappone, Cina e Corea contro Psa è autorizzato l'impiego di antibiotici e questo, oltre a non determinare un controllo efficace della batteriosi, ha causato lo sviluppo di popolazioni di Psa antibiotico-resistenti (Nakajima *et al.*, 1995).

In Nuova Zelanda è stato autorizzato l'impiego di 2 agrofarmaci a base di antibiotici (streptomicina e kasugamicina). In Italia invece le ricerche e lo sviluppo sono

indirizzate verso lo sviluppo e l'applicazione di strategie a basso impatto ambientale anche perché a livello europeo non è consentito l'uso di antibiotici in agricoltura. Accompagnato da reticenze iniziali, oggi l'impiego di sali di rame per la protezione di Psa rappresenta un'importante punto fermo (Balestra *et al.*, 2014b).

Come richiesto dalle regioni Emilia-Romagna, Piemonte e Veneto, è stato riconosciuto l'uso eccezionale in vegetazione di 14 formulati rameici ad un periodo limitato di 120 giorni; i prodotti rameici grazie all'azione preventiva possono infatti contribuire a bloccare la penetrazione del batterio (Armentano, 2011).

Unitamente ai sali di rame, alcune pratiche agronomico-colturali/nutrizionali hanno fornito utili indicazioni per ridurre situazioni di stress alle piante e renderle quindi meno suscettibili al patogeno (Fratarcangeli *et al.*, 2010, Quattrucci *et al.*, 2010, Mazzaglia *et al.*, 2011, Renzi *et al.*, 2012). Un'alternativa è l'uso di Bion 50 WG (Syngenta), un composto a base di acibenzolar-S-metile, attivatore delle difese naturali che ha funzione di prevenzione degli attacchi dei patogeni, se applicato tra la fase di prime foglie distese e quella di formazione dei frutticini. La registrazione di emergenza prevede un numero massimo di 6 interventi per stagione da cadenzare a intervalli di 21 giorni, rispettando un intervallo di sicurezza di 90 giorni, (registrazione di emergenza fitosanitaria) vista l'importanza del cancro batterico, il ministero della Salute ha autorizzato l'estensione all'impiego di BION 50 WG su colture di actinidia per un ulteriore periodo di 120 giorni (Ministero della Salute, 2014).

### **Lotta biologica**

Una ricerca quadriennale sulle capacità di contenimento di Psa ad opera di Bap (formulazione microbica denominata Amylo-X a base di *Bacillus amyloliquefacens* subsp. *plantarum*) e sali di rame ha evidenziato capacità biologiche di questo composto in grado di contrastare lo sviluppo, la moltiplicazione e la diffusione di Psa su piante di *Actinidia* spp. e, dal febbraio 2012 questo preparato microbiologico è registrato in Italia (n° 15302) ed è utilizzabile durante il periodo della fioritura dall'actinidia (Balestra *et al.*, 2014). La capacità di Bap di sopravvivere e di moltiplicarsi anche in presenza di rame non pone rischi di sviluppare popolazioni rame-resistenti né di trasferirne la resistenza ad altre popolazioni batteriche presenti nello stesso ambiente (Solioz *et al.*, 2010). L'efficacia antimicrobica di un ceppo di *Bacillus subtilis* nei confronti di Psa è stata valutata da Biondi e collaboratori (Biondi *et al.*, 2010).

Tutti questi metodi per contrastare il cancro batterico fanno parte della lotta integrata a Psa; esistono disciplinari, normative e regolamenti in merito all'utilizzo, ai periodi ed ai quantitativi di ogni soluzione. La regione Emilia-Romagna in particolare

ha prodotto nel 2010 un disciplinare con le normative e le tecniche di coltura dell'actinidia (Tabella 1.4).

	<b>Criteria di intervento</b>	<b>S.A. e Ausiliari</b>	<b>Limitazioni d'uso e note</b>
<b>CRITTOGAME</b> Muffa grigia <i>Botrytis cinerea.</i>	<b>Interventi agronomici :</b> Le concimazioni, irrigazioni e potature dovranno favorire il contenimento dello sviluppo vegetativo e l'arieggiamento dei frutti, <b>Interventi chimici :</b> Si consiglia di intervenire con antibiotici in fioritura se questa fase è preceduta da abbondanti e ripetute precipitazioni.	Iprodione	Al massimo 1 intervento all'anno contro quest'avversità.
<b>MARCIUME DEL COLLETO</b> <i>Phytophthora spp.</i>	<b>Interventi chimici :</b> Intervenire in od localizzato solo sulle piante ospiti.	Metalaxyl M Prodotti rameici	
<b>BATTERIOSI</b> Seccumi rameali <i>Pseudomonas spp.</i>	<b>Interventi agronomici :</b> Disinfettare accuratamente i grossi tagli di potatura. Asportare e distruggere i rami colpiti.	Prodotti rameici	
<b>CANCRO BATTERICO</b> <i>Pseudomonas syringae actinidiae.</i> pv.	<b>Interventi agronomici :</b> Impiegare materiale di propagazione sano secondo indicazioni stabilite dal Servizio Fitosanitario Regionale. Effettuare concimazioni equilibrate. Effettuare una potatura che consenta un buon arieggiamento della chioma. Effettuare la disinfezioni degli attrezzi da taglio con sali di ammonio quaternari, benzalconio cloruro. Disinfettare le superfici di taglio e ricoprire con mastici protettivi. Evitare irrigazioni sovrachioma. Monitorare frequentemente gli impianti. Tagliare ed eliminare le parti infette ad una distanza di almeno 60 cm al di sotto dell'area colpita. <b>Interventi chimici :</b> Intervenire in considerazione dell'andamento stagionale e sulla base delle indicazioni dei bollettini provinciali.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> : (1), (2). Prodotti rameici (3).	(1) Da impiegare preferibilmente in fioritura. (2) Al massimo 6 interventi l'anno indipendentemente dalle avversità. (3) Dalla ripresa vegetativa in poi il rame può dare fenomeni di fitotossicità soprattutto su kiwi giallo.
<b>FITOFAGI</b> Cocciniglia <i>Pseudaulacaspis pentagona.</i>	Soglia : presenza	Olio minerale (1) Eupofrezin (2)	Non impiegare dopo la "gemma gonfia". Si consigliano interventi localizzati sulle infestazioni. Si consiglia di rimuovere le incrostazioni sul fusto mediante spazzolatura. Oli ausiliari svolgono un ruolo importante nel contenimento dell'insetto. Si consiglia di intervenire alla migrazione della prima generazione (maggio). Al massimo due interventi l'anno.
<b>EULLA</b> <i>Argyrotaea pulchellana.</i>	Soglia : trattare al superamento della soglia di 60 adulti per trappola o con danni sui frutti. Il momento preciso per l'intervento è indicato dai bollettini tecnici provinciali.	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Installare entro inizio aprile almeno 2 trappole per azienda con le caratteristiche riportate nella tabella A. A prescindere dalla soglia utilizzata, l'installazione della trappola è obbligatoria in caso di trattamenti.
<b>CICALINE</b> <i>Empoasca vitis.</i>			I trattamenti con insetticidi contro altre avversità sono efficaci anche contro le cicaline.

<b>METCALFA</b> <i>Metcalfa pruinosa.</i>	<b><u>Interventi agronomici :</u></b> per contrastare lo sviluppo delle infestazioni si possono effettuare trattamenti ad alto volume con tensioattivi. <b><u>Interventi chimici :</u></b> Intervenire solo in caso di infestazioni in atto	Etofenprox (1)	Indipendentemente dall'avversità al massimo 2 interventi l'anno.
<b>NEMATODI</b> <i>Meloidogyne happla.</i>	Interventi agronomici : Controllare lo stato fitosanitario delle radici delle piante da mettere a dimora per accertare la presenza di eventuali galle di Meloidogyne. Evitare il ristoppo.		

Tab. 1.4. Difesa Integrata dell'actinidia. Regione Emilia Romagna - Disciplinari di produzione integrata 2010. Norme tecniche di coltura – *Actinidia*.

## 2. SCOPO DELLA TESI

L'improvviso scoppio epidemico del cancro batterico dell'actinidia nel 2008, ha portato ad un grande impegno ed interesse dei diversi settori scientifico-disciplinari verso la conoscenza e la comprensione dei meccanismi di azione di questo patogeno e del suo patosistema, fino a quel momento poco conosciuti.

Lo scopo di questo lavoro è stato in primo luogo l'approfondimento delle conoscenze in merito al comportamento di Psa all'interno del suo ospite specifico. E' stato studiato in modo specifico il comportamento del patogeno a seguito di inoculazione artificiale in condizioni controllate di piante di actinidia sia e adulte che in germogli e piante derivate da micropropagazione.

A questa specifica sperimentazione sono state fatte precedere prove preliminari per verificare la possibilità di studio tramite penetrazione stomatica del patogeno. In natura, molte malattie batteriche fogliari per manifestarsi necessitano di condizioni particolari come; alta umidità, piogge o temporali che possono promuovere l'apertura degli stomi Per queste prove preliminari sono state utilizzate giovani piantine in vaso di actinidia sulla lamina fogliare superiore ed inferiore delle quali è stato applicato collodio 5% (e/o sue diluizioni in glicole polietilenico, PEG). Sono state coperte superfici di almeno 1 cm<sup>2</sup>, avendo cura di formare uno strato sottile e privo di bolle d'aria. Lasciata evaporare la parte eterea della soluzione di collodio, la pellicola che si formava veniva rimossa delicatamente con una spatola in metallo e riposta in una piastra Petri contenente acqua distillata sterile per mantenere distesa la pellicola. Questa una volta entrata in contatto con l'acqua perde la sua trasparenza diventando opalescente, avendo cura di stendere la pellicola sul vetrino dal verso opportuno, si è proceduto alla montatura del vetrino coprioggetto e alla osservazione al microscopio a contrasto di fase. Dalle osservazioni al microscopio delle pellicole prodotte dalle pagine superiori risultavano chiari e netti i bordi delle cellule epiteliali ma non si distinguevano le cellule di guardia della rima stomatica. Dalle osservazioni delle pellicole prodotte sulla pagina inferiore delle foglioline è stato invece possibile distinguere l'impressione delle cellule di guardia. L'applicazione di diluizioni di collodio al 3,125% ha tecnicamente incrementato la capacità del metodo nel realizzare delle pellicole sottili e fruibili per le osservazioni. Le impressioni createsi dall'applicazione della soluzione filmante risultavano nel complesso più definite, come anche i margini delle cellule

epiteliali e delle cellule di guardia. Purtroppo Le soluzioni di collodio si sono mostrate aggressive rendendo inutilizzabile l'area saggiata per ulteriori analisi, la caratteristica presenza di peli sulle foglie di actinidia rende questa pianta inadatta a questo tipo di saggio per la conta stomatica per cui questo tipo di sperimentazione è stato abbandonato.

Sono invece sono stati predisposti distinti studi basati sull'inoculazione in condizioni controllate a basse dosi, con un ceppo di Psa appositamente modificato per essere individuabile al microscopio ad epifluorescenza, per lunghi periodi all'interno della pianta ospite viva. Questo ha permesso di studiare il comportamento e la sopravvivenza di Psa durante i vari passaggi del ciclo della malattia. Lo studio è stato eseguito sia in piante adulte che in materiale di micropropagazione.

Inoltre è stata studiata la possibilità di effettuare diagnosi precoce sui materiali di actinidia in campo durante le fasi asintomatiche della malattia mettendo a punto con successo metodologie specifiche.

## 3. COLONIZZAZIONE ENDOFITA DI PIANTE ADULTE

### 3.1. INTRODUZIONE

La permanenza prolungata di un batterio fitopatogeno come endofita attivo senza pregiudicare la sopravvivenza dell'ospite è segno di patoadattamento (Minardi *et al.*, 2012a). L'ipotesi che a basse dosi d'inoculo, Psa sia in grado di colonizzare piante suscettibili per lunghi periodi, causando lesioni locali nel punto d'inoculazione e rimanendo presente in organi asintomatici è stata testata in un impianto sperimentale di 60 piante *Actinidia chinensis* cv. Hort16A di due anni allestito il 23 giugno 2010 presso il Servizio Fitosanitario Regionale (Fig. 3.1). Al fine di studiare *in planta* le modalità di colonizzazione dell'ospite adottate da Psa, nell'ottobre del 2010 le piante erano state inoculate con il ceppo Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> virulento [ceppo trasformato esprime il gene per la proteina GFP ("green fluorescent protein")] e resistente alla rifampicina ed alla kanamicina] (Fig. 3.2 e Tab. 3.1).

Nelle piante è stata valutata ad intervalli regolari la progressione dei cancri lungo i germogli inoculati e in ciascuna data di rilievo sono state acquisite le temperature massime e minime al fine di correlare l'andamento della progressione assoluta dei cancri con le temperature registrate nei giorni dei rilievi. Parallelamente alcune piante sono state selezionate nell'arco dei tre anni per l'analisi *in toto* in modo da evidenziare la colonizzazione endofita di Psa.



Fig. 3.1. Impianto di *A. chinensis* cv. Hort16A predisposto presso il Servizio Fitosanitario Regionale (23 giugno 2010) a Bologna (Foto P. Minardi; Minardi, 2010).



Fig. 3.2. a) Inoculazione di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* in piante di *A. chinensis* di due anni nell'autunno 2010 ottenuta depositando 20  $\mu$ l di sospensione batterica ( $10^8$  UFC/ml) sulle superfici di tagli trasversali di rami a distanza di 40 cm dalla loro inserzione sul fusto principale. Le piante di controllo sono state contaminate sulle ferite con ADS. b) L'apice di ciascun tralcio trattato è stato immediatamente racchiuso in un sacchetto di plastica per 24 ore (temperatura 17°C) (Foto P. Minardi; Minardi, 2010).

Tunnel B		Tunnel A	
B1	B2	A1	A2
1 (2)	13 (2)	4C (3)	32 (2)
2 (2)	14 (3)	9C (2)	31 (2)
3 (2)	15 (5)	40 (3)	30 (3)
4 (2)	16 (1)	39 (3)	29 (2)
5 (2)	17 (1)	38 (1)	28 (3)
1C (3)	18 (3)	37 (2)	27 (3)
2C (2)	19 (4)	36 (2)	26 (3)
6 (3)	3C (3)	35 (4)	8C (3)
7 (3)	20 (2)	34 (3)	7C (3)
8 (2)	21 (3)	33 (2)	6C (3)
9 (1)	22 (3)		5C (3)
10 (3)	23 (2)		25 (3)
11 (2)	24 (4)		
12 (3)			

Tab. 3.1. Schema dell'impianto di *A. chinensis* cv. Hort16A predisposto presso il Servizio Fitosanitario Regionale (Minardi, 2010) – Piante trattate il 7 ottobre 2010 con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* (n°, piante inoculate) oppure con ADS (n° C, piante di controllo). Tra parentesi è indicato il numero dei germogli trattati.



## 3.2. MATERIALI E METODI

### 3.2.1. PIANTE OSPITI

Per la sperimentazione sono state usate piante di *A. chinensis* cv. Hort16A di due anni allevate in vaso all'aperto e precedentemente inoculate con una sospensione cellulare di Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> (Fig. 3.2). Nel periodo primavera/estate è stata fatta un'irrigazione automatica a goccia e tra i mesi aprile-novembre, le piante sono state ombreggiate con reti antigrandine (Fig. 3.1). Per garantire la crescita ottimale delle piante, in data 11 dicembre 2012 (Fig. 3.3) è stato effettuato il reinvaso di tutte le piante che sono state trasferite da vasi di 18 litri a vasi di 33 litri impiegando un terriccio universale di alta qualità miscelato a terra.



Fig. 3.3. Reinvaso delle piante di oltre quattro anni di *A. chinensis* cv. Hort16A. In data 11 dicembre 2012 è stato effettuato il reinvaso di tutte le piante da vasi da 18 litri a vasi di 33 litri (diametro di 43 cm e altezza di 30 cm) per garantire la crescita ottimale delle piante (Foto P. Minardi; Minardi, 2013).

### 3.2.2. COLTURA BATTERICA

Il ceppo virulento Psa8404 (Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup>) modificato geneticamente (per la resistenza alla rifampicina ed esprime il gene per la proteina GFP) da un ceppo isolato nel 2009 da *Actinidia chinensis* cv. Hort16A nella prima azienda emiliano-romagnola colpita dal cancro batterico dell'actinidia (Minardi, 2010) è stato allevato in piastre di substrato NSA (agar nutritivo con saccarosio al 5% p/vol; (Garret *et al.*, 1966; Schaad *et al.*, 2001) o di KB (King *et al.*, 1954) con l'aggiunta di kanamicina (Km<sup>50</sup>) e rifampicina (Rif<sup>50</sup>), conservate in termostato per 48 ore a 25°C ± 0,5 °C (Appendice 1).

### **3.2.3. MISURA DELLA LUNGHEZZA DEI CANCRI**

La progressione temporale dei cancri sviluppati nei tralci inoculati ed in quelli di controllo è stata misurata (mm) dal punto di contaminazione verso la base durante tutto l'anno circa ogni due settimane. Ad ogni rilievo è stato considerato lo stato di salute delle piante.

### **3.2.4. PARAMETRI CLIMATICI**

A cadenze settimanali, la temperatura e l'umidità sono stati registrati mediante un igrotermo-registratore collocato presso l'impianto. I dati raccolti sono stati integrati con i dati metereologici relativi al quadrante "Corticella" richiesti direttamente al Servizio Idrometeorologico dell'ARPA Emilia-Romagna fino a settembre 2013. Le temperature massime e minime giornaliere sono state correlate con la progressione temporale dei cancri.

### **3.2.5. ANALISI STATISTICA**

I dati relativi ai rilievi effettuati presso l'impianto sperimentale per misurare la lunghezza dei cancri e ai parametri climatici sono stati elaborati usando il software SigmaStat ver. 3.5 (2006, Systat Software, Inc. CA, USA).

### **3.2.6. ANALISI *IN TOTO* DELLE PIANTE**

Per verificare la presenza del ceppo Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> nelle varie parti del corno escluso le radici è stata effettuata l'analisi batteriologica e molecolare di intere piante sintomatiche. Piante asintomatiche precedentemente trattate solo con acqua distillata sterile (ADS) sono state usate come controllo.

**In campo:** per ogni pianta è stata predisposta una rappresentazione schematica siglando e misurando tutte le porzioni da sottoporre alle analisi e si è proceduto alla dissezione in un'area protetta lontana dall'impianto mediante il taglio dei tralci/fusti sintomatici partendo dall'apice fino al colletto in segmenti di 20 cm ciascuno utilizzando cesoie sterilizzate alla fiamma di un bunsen portatile passando da un campione al successivo.

Ciascun segmento è stato avvolto in carta stagnola, marcato con apposito cartellino e riposto singolarmente in sacchetto.

**In laboratorio: metodo 1.** I campioni sono stati portati in laboratorio e ciascun segmento, con estremità spalmate di vaselina filante sterile, è stato immerso

verticalmente in varecchina commerciale diluita 1/4 (v/v) entro un recipiente posto sotto una campana da vuoto e sottoposto a vuoto parziale (circa 0,3-0,4 Atm) per 10 minuti (Fig. 3.4) (Minardi *et al.*, 2012b). Ciascun campione è stato lavato abbondantemente con acqua di acquedotto (2-3 volte) e con acqua deionizzata sterile (2-3 volte). Dopo aver rimosso sotto cappa a flusso laminare le estremità trattate con vasellina e le porzioni immediatamente successive alle estremità rimosse per l'osservazione al microscopio, da ciascun campione sono stati preparati circa 20 frammenti di 1 cm che, dopo pesatura, sono stati riposti in beuta contenente soluzione fisiologica tamponata PBS (Appendice 2) aggiunta in proporzione al peso dei frammenti) e sottoposti ad un lavaggio di 30 min in agitatore rotativo (150 rpm). Il liquido di lavaggio filtrato attraverso 2 strati di garza sterile, è stato versato in tubi Falcon da 50 ml e centrifugato 15 min a 11000 g a 4°C. Il pellet ottenuto è stato risospeso in ADS ed usato per saggi microbiologici e molecolari.



Fig. 3.4. Sterilizzazione superficiale (10 min sotto vuoto) delle singole porzioni di fusto, con estremità sigillate da vasellina sterile, mantenute in posizione eretta in un recipiente contenente varecchina diluita all'interno di una campana da vuoto (Minardi, 2011; Minardi *et al.*, 2012b).

**Metodo 2.** I campioni sono stati portati in laboratorio e ciascun segmento di 20 cm è stato sterilizzato superficialmente con bibula immersa in varecchina commerciale diluita 1:4 e sottoposto ad un lavaggio abbondante sotto acqua corrente e con acqua deionizzata sterile (2-3 volte). I campioni sono stati distinti in due categorie e sottoposti ad un diverso trattamento: 1) tralci inoculati con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* con cancro evidente: prima della decorticazione si è proceduto all'isolamento diretto da un'area immediatamente adiacente al cancro (zona confine) e da due zone immediatamente successive (fino a 2 cm dal sintomo). Il tessuto dei 3 sub-campioni è stato macerato in circa 300 µl di ADS e 50 µl di soluzione madre (SM) e della diluizione 1:10 sono stati insemiati su piastre di NSA-SAM (Appendice 1). 2) campioni asintomatici: da ogni campione riposto su carta

bibula sterile, si è proceduto sotto cappa a flusso laminare sterile alla rimozione: a) delle estremità apicali (una porzione sottile della parte venuta in contatto con la varecchina è stata rimossa con bisturi e gettata) per l'osservazione al microscopio a fluorescenza; b) della parte corticale esterna con lame sterilizzate (pelapatate in acciaio).

In seguito, da ogni porzione di circa 18 cm sono stati preparati frammenti da 1 cm che, dopo pesatura, sono stati riposti in beuta con PBS in volume sufficiente per assicurare una completa immersione. Le beute sono lasciate 1 ora in agitatore (120 rpm) a temperatura ambiente. Il liquido di lavaggio è stato trattato come descritto nel metodo 1. Il pellet finale di ciascun campione è stato risospeso in 1,5 ml di ADS e considerato come sospensione madre (SM). Aliquote di SM sono state così distribuite:

a) 550 µl di SM aggiunti a tubi Falcon sterili con 4,45 ml di NSA-SAM sono stati riposti a 20-24°C per 48-72 ore su un supporto inclinato con agitazione molto blanda (fase di arricchimento), a due tubi Falcon contenenti ciascuno 4,45 ml di NSA-SAM sono stati aggiunti rispettivamente 550 µl di ADS (controllo negativo) e 550 µl di una sospensione di 24 h ( $\approx 10^8$  UFC/ml) di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* (controllo positivo). Dopo il periodo di arricchimento, la sospensione è stata diluita (1:10; 1:100 in base alla torbidità raggiunta) e 50 µl di ciascuna diluizione sono stati insemiati in piastre di NSA-SAM e NSA+ Rif<sup>50</sup> (Appendice 1).

Analisi BIO-PCR: Dopo la fase di arricchimento, le Falcon di ciascun campione vengono centrifugate a 3.000g per 1 min, 2 mL del sopranatante sono poi centrifugati a 10.000g per 10 min. Il pellet risospeso di ciascun campione è stato sottoposto ad analisi PCR diretta (Rees-George *et al.*, 2010) e/o nested (Biondi *et al.*, 2013). Il volume rimanente di ciascun campione arricchito è stato conservato a 4°C per eventuali subcolture in substrati liquidi con antibiotici.

b) 500 µl di SM conservato a -20°C per successiva estrazione DNA (Kit Qiagen) e analisi PCR (Rees-George *et al.*, 2010).

c) 450 µl di SM con aggiunta di glicerolo 30% per la conservazione a  $-80 \pm 0,5$  °C per ulteriori isolamenti in altri substrati (ad es. KB+Km<sup>50</sup> Rif<sup>50</sup>, Appendice 1).

### **3.2.7. REISOLAMENTO DI *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>***

Dai campioni vegetali provenienti dalle piante analizzate come indicato nel paragrafo precedente, l'isolamento batteriologico del ceppo marcato è stato fatto su piastre di substrati semiselettivi (NSA-SAM e KBC, Appendice 1) dopo un'incubazione di 48-72

h a 20-24°C (P. Minardi, 2013, dati non pubblicati). Le colonie Psa-“like” levano-positive su substrato NSA e non fluorescenti su substrato KB sono state selezionate, purificate ed identificate mediante analisi PCR. Per la selezione sono state considerate le principali caratteristiche morfologiche di Psa nei diversi substrati semi-selettivi (Loreti *et al.*, 2014).

### **3.2.8. OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO: ESPRESSIONE *Gfp***

La presenza del ceppo Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> è stata verificata mediante microscopio a epifluorescenza, con ingrandimenti 10X e 40X.

Da ciascun frammento di 20 cm sterilizzato superficialmente come descritto sopra, le estremità di circa 0,5 cm sono state rimosse e utilizzate per evidenziare, mediante l'uso del microscopio ottico a epifluorescenza (Zeiss, Mod. 471691-0000/03), la luce fluorescente emessa dall'espressione del gene *gfp* presente nel ceppo Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup>. Dai suddetti frammenti di campioni sono stati preparati vetrini cercando di tagliare delle fettine il più sottile possibili con una lama da bisturi, per un'osservazione più accurata sono state effettuate sezioni sia trasversali che longitudinali del dischetto, specialmente per l'osservazione della porzione xilematica. All'intensità della fluorescenza emessa dall'espressione del gene *gfp* presente nel ceppo mutato è stato assegnato un valore crescente da 0 a 5.

### **3.2.9. ESTRAZIONE DEL DNA DA ESTRATTO VEGETALE**

Dalle aliquote di campione conservate a -20°C sia prima che dopo la “fase di arricchimento” è stato estratto il DNA mediante il Plant Mini Kit (Qiagen) secondo il metodo messo a punto nell'ambito del Progetto regionale di ricerca sul Cancro batterico dell'actinidia (Minardi, 2010).

La quantità di campione usato in ogni estrazione è stata  $\geq 100$  mg. La concentrazione e la purezza del DNA estratto è stata determinata attraverso la lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro (Beckman Coulter DU 730) alla lunghezza d'onda di 260 nm (OD<sub>260</sub>) e di 280 nm (OD<sub>280</sub>). La concentrazione di ciascun campione è stata calcolata in base alla seguente formula:

$$Q = OD_{260} \times 50 \times \text{Fattore di Diluizione}$$

La purezza di ciascun campione è stata verificata mediante il rapporto fra OD<sub>260</sub> (DNA) e OD<sub>280</sub> (proteine). I campioni di DNA sono conservati a 4°C per un uso previsto entro 1 settimana, altrimenti vengono conservati a -20°C.

### **3.2.10. ANALISI PCR**

Le colonie Psa-“like” levano-positive su NSA e non fluorescenti su KB sono state selezionate e 5µl di loro sospensioni acquose corrispondenti a circa 10<sup>7</sup> UFC/ml sono stati usati come templati per l’analisi PCR diretta (Rees-George *et al.*, 2010; Minardi, 2010;) e/o nested (Biondi *et al.*, 2013).

#### **3.2.10.1. PCR diretta**

L’analisi PCR è stata eseguita in un termociclatore Gene AmpPCR System 2400 (Applied Biosystems) secondo un protocollo modificato in precedenza relativamente alle concentrazioni dei reagenti e al profilo termico (Minardi, 2010; Rees-George *et al.*, 2010). Per questa analisi sono stati usati i “primer” PsaF1 (“forward” 5’-TTT TGC TTT GCA CAC CCG ATT TT-3’) e PsaR2 (“reverse” 5’-CAC GCA CCC TTC AAT CAG GAT G-3’) progettati per essere complementari ad una porzione della regione ITS (“intertranscribed spacer”) dell’rDNA 16S-23S (Rees-George *et al.*, 2010).

Nella miscela di reazione (25 µl) la concentrazione finale dei reagenti era la seguente: GoTaq® G2 DNA Polymerase Buffer 1X (Promega), dNTP 200µM (Promega), ogni primer 0,5 µM, Taq DNA polimerasi 0.025 U (GoTaq® G2 DNA Polymerase, Promega). In ogni provetta sono stati messi 22,5 µl di miscela di reazione e 2.5 µl (da 1 a 10 ng di DNA) di campione oppure per l’analisi di sospensioni cellulari a 20 µl di miscela di reazione sono stati aggiunti 5 µl di una sospensione corrispondente a circa 10<sup>7</sup> UFC/ml. Il profilo termico della reazione ha previsto una denaturazione iniziale a 95°C per 2 minuti seguita da 30 cicli ciascuno costituito da 30 secondi a 95°C, 30 secondi a 65°C e 30 secondi a 72°C; infine 5 minuti a 72°C per l’estensione finale (Minardi, 2010). Il prodotto di amplificazione (≈ 280 bp) è stato controllato su gel di agarosio all’1,5% (p/vol) mediante elettroforesi in tampone TAE (Appendice 2) a 90V e successiva colorazione in soluzione acquosa di bromuro di etidio 0,03% e rilevazione con UV λ<sub>312 nm</sub>, del prodotto di amplificazione. I campioni sono stati conservati a 4°C.

#### **3.2.10.2. PCR-“nested”**

Dai ceppi di Psa CRA-FRU 3.1, PHSER 1875.3, ISPaVe 019 (=NCPPB 3873) e *Pseudomonas syringae* pv. *theae* (Psth) ceppo CFBP 4097 sono stati clonati ampliconi

di 631 bp (Biondi *et al.*, 2013), corrispondenti ad una porzione del gene *ompP1*; le sequenze sono depositate in Genebank (NCBI): numero di accesso: JX297572, JX297573, JX297574, JX297575, rispettivamente. Queste sequenze sono state allineate con algoritmo ClustalW utilizzando il programma DNASTAR Lasergene MegAlign versione 7.0.0 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).

La coppia di “primer” B1/B2 E’ stata disegnata sulla sequenza parziale del gene *ompP1* del ceppo di Psa CRA-FRU 3.1 (Biondi *et al.*, 2013), la sequenza dei “primer” e la lunghezza degli amplificati sono elencati in Tab. 3.2. I “primer” KNF/KNR disegnati sul profilo RAPD dei prodotti di amplificazione dello stesso gene *ompP1* (Koh e Nou, 2002) sono stati usati nel passaggio di “nested”. Entrambi i passaggi di PCR-nested sono stati messi a punto separatamente su sospensioni batteriche di colture pure, su campioni naturalmente e artificialmente infetti e su campioni naturalmente infetti di “pianto”. Per valutare e confermare la precisione del metodo, diversi campioni sono stati saggiati mediante i protocolli di PCR disponibili per l’identificazione di Psa (Gallelli *et al.*, 2011, Rees-George *et al.*, 2010).

Primer	Gene	Dimensione (bp)	Sequenza (5'- 3')	Referenza
B1	<i>ompP1</i>	631	5'-GTGATTATCGGCACTGACGG-3'	Biondi <i>et al.</i> , 2013
B2			5'-CAAGCACACCATTGGTCATTGA-3'	
KNF	<i>ompP1</i>	502	5'-CACGATACATGGGCTTATGC-3'	Koh & Nou, 2002
KNR			5'-CTTTTCATCCACACTCCG-3'	

Tab. 3.2. Sequenze dei “primer” usati per l’analisi PCR-“nested” (Biondi *et al.*, 2013).

Per quanto riguarda la prima amplificazione con i “primer” B1/B2, nella miscela di reazione (25 µl) la concentrazione finale dei reagenti era la seguente: GoTaq® Flexi DNA Polimerasi Buffer 1X (Promega), dNTP 200µM (Promega), ogni primer 0,4 µM, DMSO 5% (Sigma-Aldrich), Taq DNA polimerasi 0.5 U (GoTaq® G2 DNA Polymerase, Promega). In ogni provetta sono messi 20 µl di miscela di reazione e 5 µl di sospensione cellulare. Il profilo termico della reazione ha previsto una denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti seguita da 35 cicli ciascuno costituito da 20 secondi a 94°C, 20 secondi a 57°C e 30 secondi a 72°C; infine 10 minuti a 72°C per l’estensione finale. Per la seconda amplificazione con i “primer” KNF/KNR (Koh e

Nou, 2002) nella miscela di reazione (25 µl) la concentrazione finale dei reagenti era la seguente: GoTaq® Flexi DNA Polimerasi Buffer 1X (Promega), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 200µM (Promega), ogni “primer” 0,5 µM, DMSO 5% (Sigma-Aldrich), Taq DNA polimerasi 1.25 U (GoTaq® G2 DNA Polymerase, Promega). In ogni provetta sono messi 24 µl di miscela di reazione e 1 µl del prodotto della prima amplificazione. Il profilo termico della reazione ha previsto una denaturazione iniziale a 94°C per 3 minuti seguita da 30 cicli ciascuno costituito da 1 minuto a 94°C, 50 secondi a 57°C e 50 secondi a 72°C; infine 10 minuti a 72°C per l’estensione finale.

Per quanto riguarda l’analisi eseguita sugli estratti vegetali dopo la “fase di arricchimento” alla miscela di reazione relativa alla prima amplificazione è stato aggiunto il Blotto al 2% (“Bovine Lacto Transfer Technique Optimiser”: 10% latte scremato in NaN<sub>3</sub> allo 0,2%; De Boer *et al.*, 1995).

Il prodotto di amplificazione (≈ 502 bp), interno alla regione di amplificazione delimitata dai primers B1/B2, è stato controllato su gel di agarosio all’1,5% (p/vol) come descritto sopra.

### **3.2.11. SAGGI DI PATOGENICITÀ E DI IPERSENSIBILITÀ IN PLANTA**

La capacità del ceppo Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> reisolato di causare i sintomi tipici della malattia è stata verificata su piantine di *A. deliciosa* var. Tomuri secondo il test di patogenicità (TP) messo a punto nell’ambito del Progetto Regionale di Ricerca 2009-2011 sul Cancro Batterico dell’Actinidia (Minardi, 2010; Minardi *et al.*, 2011).

La sua abilità di indurre la risposta ipersensibile (RI) è stata determinata in foglie di piante di tabacco (*Nicotiana tabacum* L. ‘White Burley’).

## **3.3. RISULTATI**

### **3.3.1. PROGRESSIONE DEI CANCRI E CORRELAZIONE CON PARAMETRI CLIMATICI**

Dopo l’inoculazione del 7 ottobre 2010 (Tab. 3.1) con Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> i primi rilievi nell’impianto sperimentale per evidenziare i sintomi indotti dal patogeno sulle piante sono stati effettuati a partire dalla primavera del 2011 circa ogni 15 giorni (Fig. 3.5) e precisamente il: 10 e 31 maggio; 13 e 27 giugno, 12 e 27 luglio, 25 agosto, 15 e 28 settembre, 13 ottobre 2011 (P. Minardi, dati non pubblicati). Per ogni pianta (procedendo dalle piante di controllo a quelle inoculate con il patogeno) è stata misurata la lunghezza dei cancri presenti nei germogli inoculati col patogeno, per una valutazione



complessiva. L'impianto è stato analizzato nella sua interezza: per ogni data di rilievo, sono state calcolate le medie delle progressioni dei cancri di tutte le misurazioni effettuate nell'anno 2011 per ciascuna pianta. L'andamento del grafico rappresenta la progressione dei cancri nella totalità delle piante (P. Minardi, dati non pubblicati).

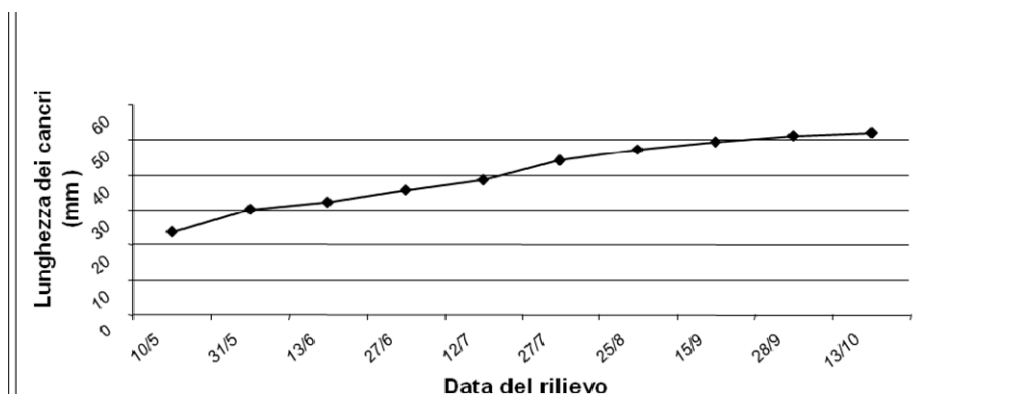


Fig. 3.5. Progressione media delle necrosi e dei cancri durante il periodo maggio-ottobre 2011 nell'impianto, presso il SFR, di piante adulte di actinidia inoculate il 7 ottobre 2010 con il ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* rilevati a partire dal 10 maggio 2011 (Minardi, 2011).

In ciascuna data di rilievo sono state acquisite le temperature massime e minime dai bollettini ARPA (Fig. 3.6) così da correlare la progressione assoluta dei cancri con le temperature registrate nei giorni dei rilievi.

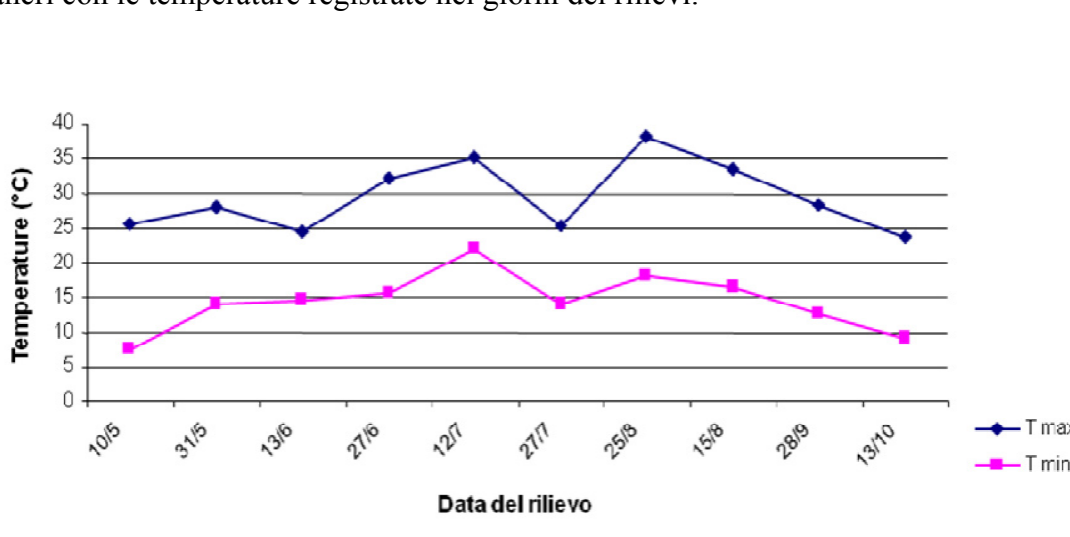


Fig. 3.6. Andamento delle temperature durante il periodo maggio-ottobre 2011 nell'impianto di piante adulte di actinidia presso il SFR in corrispondenza delle date in cui sono stati eseguiti i rilievi dei sintomi nelle piante inoculate il 7 ottobre 2010 con il ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* (Minardi, 2011).

A partire dall'autunno del 2011 fino all'estate del 2012 sono stati effettuati 17 rilievi; più precisamente nel 2011 le date dei rilievi sono state le seguenti: 13 ottobre, 3

e 16 novembre, 23 dicembre; mentre nel 2012: 26 gennaio, 7 e 23 marzo, 2 e 24 aprile, 4 e 15 maggio, 13 e 29 giugno, 24 luglio, 13 agosto e 21 settembre. La progressione dei cancri nelle piante inoculate con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* e nelle piante di controllo per ogni data di rilievo è illustrata in Fig. 3.7 (P. Minardi, dati non pubblicati). Le differenze tra le lunghezze dei cancri nelle piante inoculate e quelle dei cancri nelle piante di controllo sono risultate statisticamente significative ( $P < 0,05$ ; 95%) e nei controlli, la risposta alla ferita è risultata aumentare nel tempo. Il confronto tra le distribuzioni delle lunghezze dei cancri nelle piante inoculate e nelle piante di controllo nello stesso intervallo di tempo (Fig. 3.8) ha evidenziato che le differenze tra le medie sono risultate statisticamente significative e le due distribuzioni sono risultate significativamente differenti tra loro (Minardi *et al.*, 2012b).

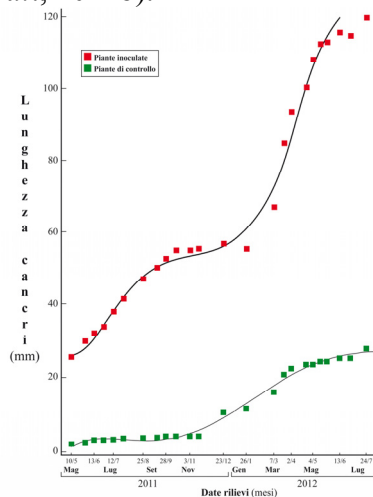


Figura 3.7. Allungamento dei cancri nelle piante inoculate con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* e nelle piante di controllo. Per ogni data di rilievo, tra le lunghezze dei cancri nelle piante inoculate e nelle piante di controllo è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa ( $P < 0,05$ ; 95%) (Minardi, 2012).

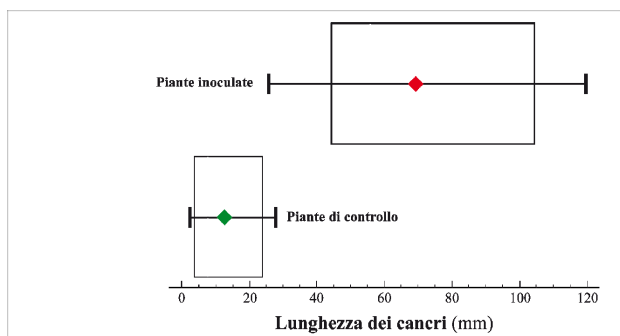


Figura 3.8. Confronto tra le distribuzioni delle lunghezze dei cancri nelle piante inoculate e nelle piante di controllo. Nel diagramma a baffi, le differenze tra le medie sono risultate statisticamente significative e le due distribuzioni sono risultate significativamente differenti tra loro con un livello di confidenza del 95% ( $P < 0,05$ ). Per le piante inoculate ogni valore rappresenta la media di 94 valori, mentre nelle piante di controllo ogni valore rappresenta la media di 26 valori.  $\blacklozenge$  = media della distribuzione; I—I = intervallo di variazione). Nei riquadri è indicata la zona di maggior frequenza dei dati sperimentali (Minardi, 2012).

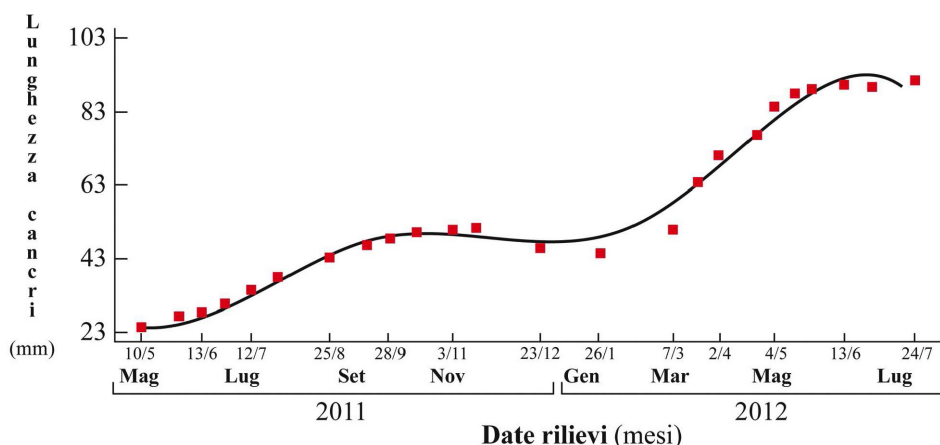
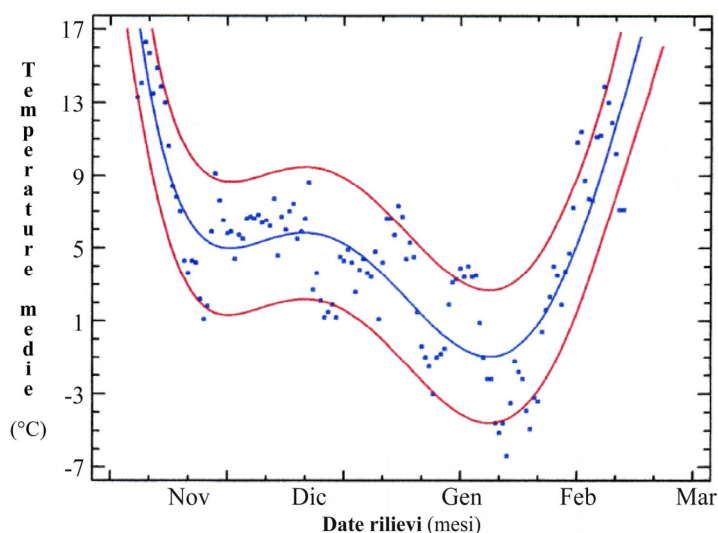


Fig. 3.9. Progressione netta dei cancri nelle piante inoculate con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* nel periodo 10 maggio 2011 - 24 luglio 2012. In ordinata le differenze tra le lunghezze (mm) dei cancri nelle piante inoculate e quelle dei cancri nelle piante di controllo per ogni data di rilievo (Minardi 2012).

In riferimento al grafico che si ottiene dall'analisi statistica dei diversi rilievi, la progressione netta dei cancri nelle piante inoculate con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* nel periodo 10 maggio 2011 - 24 luglio 2012 (Fig. 3.9), ha presentato tre fasi: una prima fase ascendente (maggio-agosto) che ha rallentato a settembre/ottobre; una seconda fase di stasi: tra novembre e gennaio; ed infine una terza fase ascendente caratterizzata da una ripresa dell'allungamento a partire da fine gennaio (Minardi *et al.*, 2012b).

Per quanto riguarda la relazione tra allungamento dei cancri e le temperature medie giornaliere, nell'autunno 2011 è stato evidenziato che nonostante a novembre la temperatura fosse scesa rapidamente, i cancri in quel breve periodo erano ancora in espansione lineare (Minardi *et al.*, 2012b).



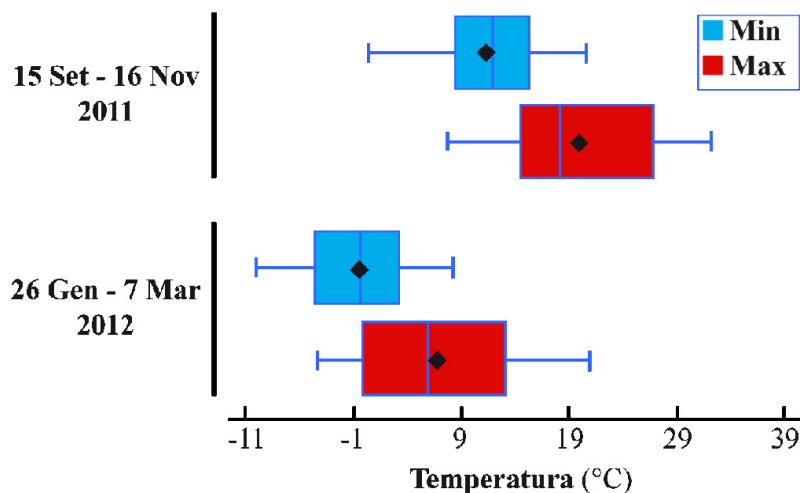


Fig. 3.11. Comparazione delle temperature massime e minime giornaliere nei due periodi settembre-novembre 2011 e gennaio-marzo 2012 (Minardi, 2012b).

Nel periodo novembre 2011 - marzo 2012, nelle variazioni delle temperature medie giornaliere (Fig. 3.10) si sono osservati un “plateau” con temperature medie comprese tra 2 e 9°C tra novembre e dicembre corrispondente alla fase di stasi di allungamento del cancro (Fig. 3.9) ed una fase discendente con temperature medie comprese tra 2,5 e -4,5°C tra dicembre 2011 e gennaio 2012.

Tra fine gennaio e metà febbraio si è registrato un crollo nelle temperature, caratterizzato da nevicate eccezionali, ma al contrario la progressione del cancro è aumentata indicando che quest’ultima non è influenzata solo dal fattore temperatura (P. Minardi, dati non pubblicati; Minardi *et al.*, 2012b). In questo periodo, la bassa temperatura non è il solo fattore che condiziona la virulenza del batterio come invece avviene tra novembre e dicembre in cui sono state registrate temperature analoghe. Ai primi di marzo è stato registrato un intervallo di temperature compreso tra 9 e 13°C compatibile con la crescita di diversi batteri fitopatogeni (P. Minardi, dati non pubblicati; Minardi *et al.*, 2012b).

Il confronto tra le temperature massime e minime giornaliere nei due periodi settembre-novembre 2011 e gennaio-marzo 2012 (Fig. 3.11), evidenzia valori di temperature simili. In particolare, le temperature massime comprese tra 10 e 20°C sono compatibili con la crescita dei batteri e questo rispecchia la progressione lieve e lineare dei cancri; per quanto riguarda le temperature minime, in corrispondenza di temperature non favorevoli al batterio (-7 e 10°C), nel secondo periodo il batterio pare non moltiplicarsi. In Fig. 3.9 infatti, si evidenzia che a fine gennaio i cancri hanno ripreso l’attività e sono in espansione parabolica crescente. Inoltre, nel periodo compreso tra il

26 gennaio ed il 13 febbraio abbondanti nevicate hanno portato ad un manto nevoso di circa 60 cm (Fig. 3.12) perdurato fino a inizio marzo. Il vistoso allungamento dei cancri nelle piante inoculate rispetto ai controlli tra il 23 gennaio ed il 22 marzo è stato concomitante o immediatamente successivo ai maggiori abbassamenti termici. La progressione dei cancri è risultata diversa in intervalli di temperature simili, ma in fasi diverse del ciclo vegetativo (P. Minardi, dati non pubblicati; Minardi *et al.*, 2012b).



Fig. 3.12. Condizioni dell'impianto sperimentale di *A. chinensis* cv. Hort16A in data 16 febbraio 2012. Le piante di tre anni allevate in vaso all'aperto presso il SFR (Corticella, BO) distribuite in 4 file di 15 piante/fila con interfilare di 3 metri sono state trattate il 7 ottobre 2010 con il ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* (piante inoculate) con ADS (piante di controllo) (Foto P. Minardi; Minardi, 2012).

A partire dall'autunno del 2012 fino all'autunno del 2013 sono stati fatti 11 rilievi. Più precisamente nel 2012 le date dei rilievi sono state le seguenti: 9 ottobre e 2 novembre; mentre nel 2013: 8 gennaio, 19 febbraio, 15 marzo, 11 aprile, 9 e 31 maggio, 2 luglio, 5 settembre ed 11 ottobre. Come per l'anno precedente è stato evidenziato come le differenze tra le lunghezze dei cancri nelle piante inoculate e di controllo siano risultate statisticamente significative, e come le relative distribuzioni delle progressioni dei cancri siano risultate significativamente differenti tra loro. La progressione netta dei cancri nelle piante inoculate con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* nel periodo 24 luglio 2012 – 19 febbraio 2013 è illustrata in Fig. 3.13 (P. Minardi, dati non pubblicati). Si nota una prima fase ascendente estiva (luglio-agosto) che rallenta a settembre/ottobre; una seconda fase di stasi fino a novembre ed una fase di ripresa nel periodo invernale (gennaio-febbraio).

Per quanto riguarda la relazione tra allungamento dei cancri e le temperature medie giornaliere, nell'autunno 2012 si evidenzia che nonostante a novembre la temperatura sia scesa rapidamente ( $5^{\circ}\text{C}$ ), i cancri in quel breve periodo sono risultati ancora in espansione lineare (Fig. 3.14).

Nel periodo dicembre 2012 - gennaio 2013, nelle variazioni delle temperature medie giornaliere (Fig. 3.14) si osserva che nella fase discendente le temperature medie sono state comprese tra  $5,4$  e  $-2,9^{\circ}\text{C}$  mentre nell'anno precedente i valori erano molto inferiori (compresi tra  $2,5$  e  $-4,5^{\circ}\text{C}$ ). Questo è in accordo con quanto individuato già nell'inverno 2011-12 quando l'allungamento dei cancri è stato più intenso in concomitanza o immediatamente dopo maggiori abbassamenti termici. Nei mesi successivi, i rilievi hanno evidenziato che le variazioni relative all'allungamento dei cancri sono state molto limitate e tali da non essere considerate significative del fenomeno (P. Minardi, dati non pubblicati).

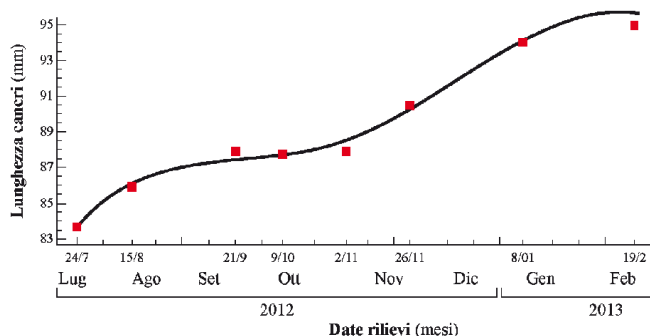


Fig. 3.13. Progressione netta dei cancri nelle piante inoculate con *Psa:gfP-Rif<sup>res</sup>* nel periodo 24 luglio 2012 - 19 febbraio 2013. In ordinata è riportata la differenza tra la lunghezza (mm) dei cancri nelle piante inoculate e quella dei cancri nelle piante di controllo per ogni data di rilievo (Minardi, 2013).

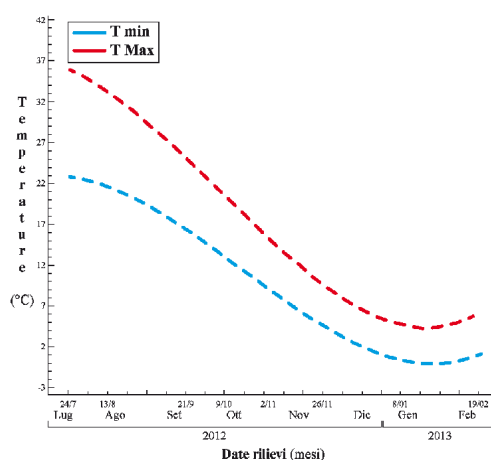


Fig. 3.14. Andamento delle medie delle temperature minime e massime giornaliere nel periodo 24 luglio 2012 - 19 febbraio 2013 (Minardi, 2013).

### 3.3.2. RILIEVO DEGLI ENDOFITI: ANALISI *IN TOTO* DELLE PIANTE

#### 3.3.2.1. Reisolamento di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* da pianta n° 7

I primi sintomi su fusto, foglie e fiori si sono manifestati a inizio maggio 2011 nella pianta n°7 (Fig. 3.15; tunnel B fila 1 - Tab. 3.1): completo disseccamento di uno (identificato come A) dei tre germogli inoculati (A-B-C), maculature e accartocciamenti della lamina fogliare (Fig. 3.16.a), disseccamento dei fiori (Fig. 3.16.b), presenza di cancri con imbrunimento corticale nei germogli (Fig. 3.17a) e lungo il fusto (Fig. 3.17b).



Fig. 3.15. Pianta n° 7 inoculata con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* il 7 ottobre 2010 con sintomi da CBA rilevati il 12 maggio 2011. Si noti sulla sinistra il Disseccamento completo di uno dei tre germogli inoculato con Psa (Foto P. Minardi; Minardi 2011).

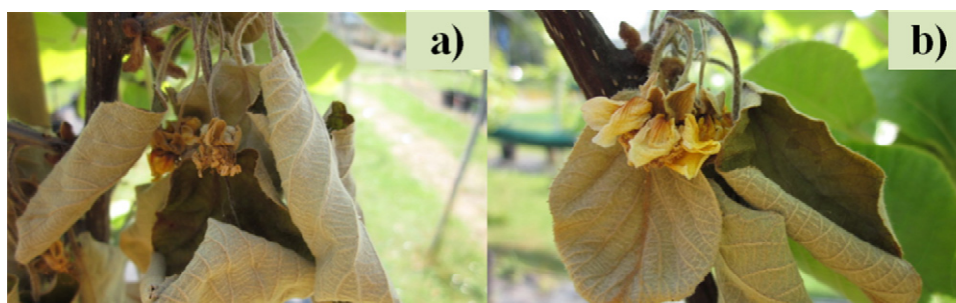


Fig. 3.16. Pianta n° 7 (tunnel B fila 1) inoculata con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* il 7 ottobre 2010 con sintomi da CBA rilevati il 12 maggio 2011. a) Accartocciamenti fogliari e b) disseccamenti fiorali (Foto P. Minardi; Minardi 2011).



Fig. 3.17. Pianta n° 7 (tunnel B fila 1) inocolata con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* il 7 ottobre 2010 con sintomi da CBA rilevati il 12 maggio 2011. a) Cancri corticali nei germogli inocolati e b) lungo il fusto (Foto P. Minardi; Minardi 2011).

In seguito ai rilievi si è proceduto all'analisi dell'intera pianta sintomatica, rappresentata schematicamente in Fig. 3.18 (Minardi *et al.*, 2012b) per verificare la presenza del ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* nelle varie parti della pianta come descritto in 3.2.6.2. (Metodo 1). Al momento dell'analisi la lunghezza dei cancri nei tre germogli inocolati (A, B e C) era di 25 mm (A), 3 mm (B) e 60 mm (C). Da ciascun campione sono stati preparati ca. 20 frammenti di 1 cm riposti in beuta con 150 ml di PBS dopo essere stati pesati (Tab. 3.3b). Tutti i 16 campioni illustrati in Tab. 3.3.a più due campioni di essudato fuoriuscente dal fusto dopo l'ultimo taglio basale, indicati con la lettera L (L1 ed L2), sono stati sottoposti ad analisi microbiologiche e molecolari come descritto in 3.2.6.2.

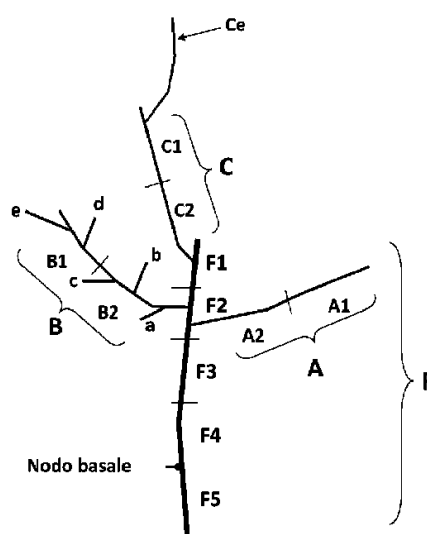


Fig. 3.18. Rappresentazione schematica della pianta inocolata n° 7 (analisi *in toto* effettuata il 12-5-11). Le sigle indicano i frammenti in cui la pianta è stata sezionata e che sono stati analizzati come descritto nei Materiali e Metodi (Minardi *et al.*, 2012a).



a)			
Frammento (cm)	sub-campioni	cm/frammento	
A (40)	A1+A2	20,0	
B (42)	B1+B2	21,0	
Be (35)	Be1+Be2	17,5	
C (40)	C1+C2	20,0	
Ce (23)			
F (112)	F1+F2+F3+F4+F5+F6	20,0	
Fd (22)			

b)			
Campioni	misura (cm)	frammenti(n°)	Peso (gr)
Be1	15.5	16	2.72
Be2	15.52	17	5.55
C1	18	19	10.50
C2	17.5	16	9.86
Ce	20	21	3.25
F1	16.5	11	20.49
F2	16	16	20.99
F3	16.5	13	35.70
F4	16	15	54.96
F5	16	13 <sup>1</sup>	48.42
Fd	18.5	19	5.73
B1	11.4	16	19.70
B2	17.9	21	11.84
Bd	18	17	3.43

<sup>1</sup> in sez trasversale si nota il cancro

Tab. 3.3. a) Campionamento in campo dei frammenti dei germogli e del fusto della pianta sintomatica n° 7. I 3 germogli inoculati con il ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* sono indicati con le lettere A, B, C. Le sigle successive indicano i vari frammenti sezionati secondo quanto riportato nell'elenco sottostante. Con la lettera F si indica il fusto: il numero progressivo che segue la lettera F indica la progressione basipeta con cui sono stati prelevati i campioni lungo il fusto (ad es. 1: più vicino all'apice della pianta; 5: porzione adiacente al colletto). b) Campionamento in laboratorio dei campioni in ordine di prelievo. Per ciascun campione sono stati registrati il numero ed il peso dei frammenti (Minardi, 2011).

Il ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* è stato reisolato su substrato semiselettivo fino ad arrivare al frammento F2 del fusto. Il risultato è stato confermato sia dalle prove *in planta* (induzione di reazione di ipersensibilità in piante di tabacco e dei sintomi della malattia in piantine di actinidia) e dall'analisi PCR (Fig. 3.19).

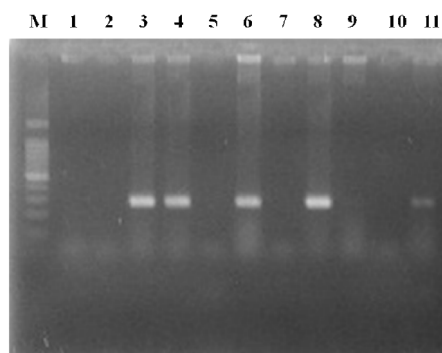


Fig. 3.19. Analisi PCR diretta (280 bp) su isolati *Psa*-“like” da vari frammenti di germogli/fusto della pianta sintomatica n° 7. M: MWM 100 bp; 1) A2; 2) L2; 3) F1; 4) F2; 5) H<sub>2</sub>O; 6) C2; 7) L1; 8) *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>*; 9) F4; 10) H<sub>2</sub>O; 11) F4 (Foto P. Minardi, Minardi, 2011).

### 3.3.2.2. Reisolamento di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* da pianta n° 9

In data 1 giugno 2011, la seconda pianta in cui è stata evidenziata una progressione dei sintomi di CBA su fusto e foglie è stata la n° 9 (Fig. 3.20a; tunnel B fila 1 - Tab. 3.1). I sintomi evidenziati sono stati: disseccamento dell'unico germoglio inoculato con *Psa* (Fig. 3.20b), necrosi marginali e accartocciamento delle lamine fogliari (Fig. 3.20c) e maculature fogliari con alone clorotico.

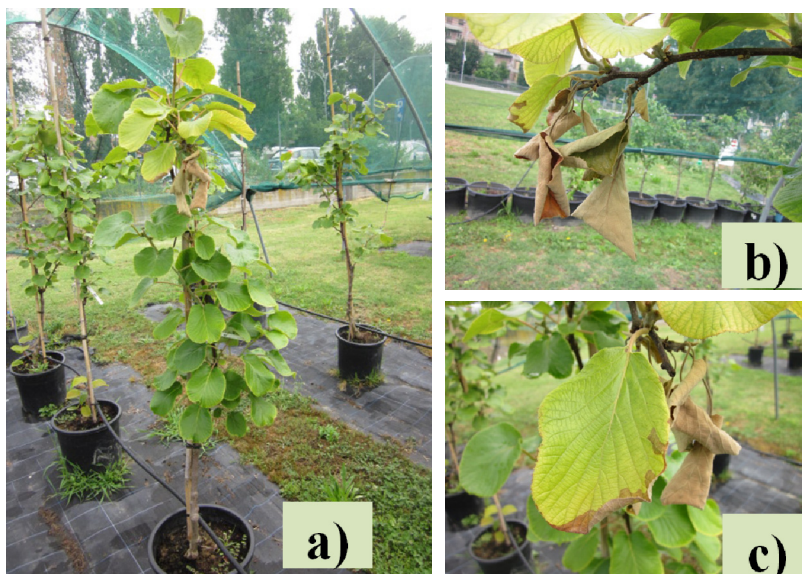


Figura 3.20. a) Pianta n° 9 (tunnel B fila 1) inoculata con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* il 7 ottobre 2010 con sintomi da CBA rilevati l'1 giugno 2011. b) Disseccamento dell'unico germoglio inoculato con *Psa*. c) Necrosi marginali e accartocciamento delle lamine fogliari (Foto P. Minardi; Minardi, 2011).

Questa pianta, rappresentata schematicamente in Fig. 3.21 (Minardi *et al.*, 2012 b), è stata analizzata come descritto sopra per la pianta n° 7 (Tab. 3.4). Al momento dell'analisi la lunghezza del cancro nell'unico germoglio inoculato (A) era di 15. Per quanto riguarda il reisolamento del ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* al termine di tutti i cicli di isolamento e purificazioni selettive è stato evidenziato che dai frammenti F2, F5, F6-2, A2 è stato possibile reisolare ceppi incapaci di crescere in substrato semiselettivo con antibiotici (KBC con kanamicina e rifampicina: KBC+Km<sup>50</sup> Rif<sup>50</sup>) mentre in KBC le colonie non hanno mostrato una morfologia *Psa*-“like”, pertanto non si è proceduto all'analisi PCR. Questa analisi effettuata sul DNA estratto dai campioni vegetali conservati a -20°C ha evidenziato la presenza di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* nel campione A2 e non negli altri frammenti. Nel campione di DNA estratto da A2 è stato amplificato un frammento di 280 kb compatibile con quello atteso per *Psa* (Fig. 3.22).

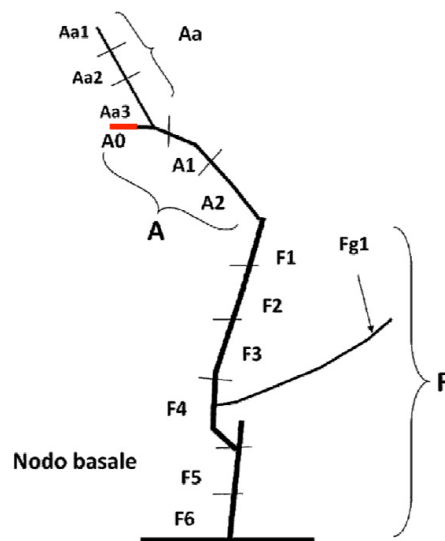


Fig. 3.21. Rappresentazione schematica della pianta inoculata n° 9 (analisi *in toto* effettuata il 1-6-11). Le sigle indicano i frammenti in cui la pianta è stata sezionata e che sono stati analizzati come descritto nei Materiali e Metodi (Minardi *et al.*, 2012b).

M 1 2 3 4 5 6

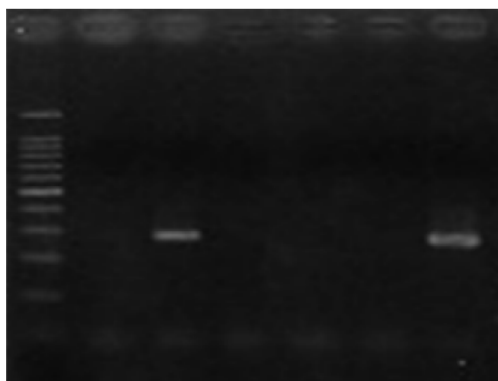


Fig. 3.22. Analisi PCR diretta (280 bp) su DNA estratto da campioni frammenti di germogli/fusto della pianta sintomatica n° 9. M: MWM 100 bp; 1) Aa; 2) A2; 3) F1; 4) F2; 5) H<sub>2</sub>O; 6) Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> (Minardi, 2011).

a)			
Frammento (cm)	sub-campioni	cm/frammento	
A (19)	A1 (15)+A2 (4)		
Aa (48)	Aa1+Aa2+Aa3	16	
F (120)	F1+F2+F3+F4+F5+F6	20	
Fg (20)			

b)  
A1, A0, A2, Aa1, Aa2, Aa3, FG1, F1, F2, F3, F4, F5, F6-1, F6-2.

Tab. 3.4. a) Campionamento in campo dei frammenti dei germogli e del fusto della pianta sintomatica n° 9. L'unico germoglio inoculato con il ceppo Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> è indicato con la lettera A. Le sigle successive indicano i vari frammenti sezionati secondo quanto riportato nell'elenco sottostante. Aa: fa riferimento ad un nuovo germoglio. Con la lettera F si indica il fusto. b) Campionamento in laboratorio dei campioni in ordine di prelievo (Minardi, 2011).

### 3.3.2.3. Reisolamento di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* da pianta n° 20

In data 17 novembre 2011 la pianta n° 20 (Fig. 3.23; tunnel B fila 2 - Tab. 3.1) è stata analizzata *in toto* perché mostrava una progressione significativa dei cancri e risultava asintomatica negli altri organi. Al momento dell'analisi, nella pianta n° 20, rappresentata schematicamente in Fig. 3.24 (Minardi *et al.*, 2012b), la lunghezza dei cancri nei due germogli inoculati (A e B) era di 140 mm (A) e 92 mm (B). I frammenti prelevati in campo sono stati siglati e misurati come riportato in Tab. 3.5 prima di essere sottoposti alle analisi di laboratorio. I campioni finali ottenuti dopo essere stati trattati seguendo il metodo 1 (3.2.6.2.) sono riportati in Tab. 3.6 (P. Minardi, dati non pubblicati).



Fig. 3.23. Pianta inoculata con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* n° 20 (tunnel B fila 2) il 7 ottobre 2010 ed analizzata il 17 novembre 2011 (Foto P. Minardi; Minardi, 2012).

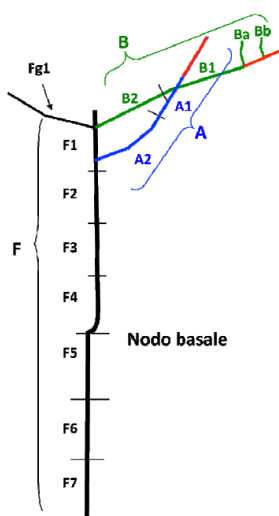


Fig. 3.24. Rappresentazione schematica della pianta inoculata n° 20 (analisi *in toto* effettuata il 17-11-11). Le sigle indicano i frammenti in cui la pianta è stata sezionata e che sono stati analizzati come descritto nei Materiali e Metodi (Minardi *et al.*, 2012a).

<b>Campioni</b>	<b>Misura (cm)</b>	<b>Sub-campioni</b>	<b>cm/frammento</b>
<b>A</b>	38	<b>A1</b>	20
		<b>A2</b>	18
<b>B</b>	41	<b>B1</b>	16
		<b>B2</b>	15,5
		<b>B1N</b>	10,3
<b>Ba</b>	20		20
<b>Bb</b>	20	-	20
<b>Fg1</b>	20		20
<b>F</b>	64	<b>F1</b>	19,4
		<b>F2</b>	18
		<b>F3</b>	16
		<b>F4</b>	14,5
		<b>F5</b>	20

Tab. 3.5. Campionamento in campo dei frammenti dei germogli e del fusto della pianta n° 20. I due germogli inoculati con il ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* sono indicati con la lettera A e B. Le sigle successive indicano i vari frammenti sezionati secondo quanto riportato nell'elenco sottostante. Ba e Bb: fanno riferimento a nuovi germogli su B procedendo rispettivamente dalla base all'apice. Con la lettera F si indica il fusto. Fg1 rappresenta un germoglio tra A e B. (Minardi, 2012).

<b>Campioni</b>	<b>Misura (cm)</b>	<b>Frammenti (n°)</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>PBS (ml)</b>
<b>B1N</b>	10,3 per ID	-	-	-
<b>Ba</b>	20	19	6	20
<b>Bb</b>	20	19	5,2	20
<b>B1</b>	16	12	8,5	30
<b>B2</b>	15,5	13	11,4	30
<b>A1</b>	9 per ID	-	-	-
	<b>A1.1 = 6</b>	-	-	-
	<b>A1.2 = 5.3</b>	-	-	-
<b>A2</b>	18	12	10,4	30
<b>Fg1</b>	20	17	7,4	30
<b>F1</b>	19,4	15	10,8	30
<b>F2</b>	18	15	23,3	45
<b>F3</b>	16	15	31,9	45
<b>F4</b>	14,5	13	26,6	45
<b>F5</b>	16	14	47,5	80
<b>F6</b>	17	14	54,1	80
<b>F7</b>	17	15	54,9	80

Tab. 3.6. Campionamento in laboratorio dei frammenti vegetali in ordine di prelievo dalla pianta n° 20 (Minardi, 2012).

L'isolamento diretto su substrati semiselettivi ha messo in evidenza la presenza di numerose colonie batteriche tra le quali sono state scelte e purificate solo le colonie Psa-“like”. Il ceppo Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> è stato reisolato con successo su substrato semiselettivo fino ad arrivare al frammento F6 del fusto. L'analisi PCR degli isolati Psa-“like” dai vari frammenti di tralci/fusto provenienti dalla pianta n° 20 ha permesso di amplificare la banda attesa di 280 bp (Fig. 3.25).

Il DNA estratto dai campioni elencati in Tab. 3.6 usato nell'analisi PCR ha permesso di rilevare la presenza di Psa fino al frammento F6 mentre in F7 ed Fg sono risultati negativi (Fig. 3.26). L'analisi PCR è risultata negativa anche nel germoglio Bb apicale rispetto ai due germogli inoculati A e B (Fig. 3.27).

Il ceppo re-isolato è stato in grado di riprodurre i sintomi della malattia in piantine di actinidia e di indurre reazione di ipersensibilità in piante di tabacco. I risultati ottenuti dagli isolamenti diretti e dall'analisi PCR sono stati confermati dall'osservazione dei campioni al microscopio epifluorescente.

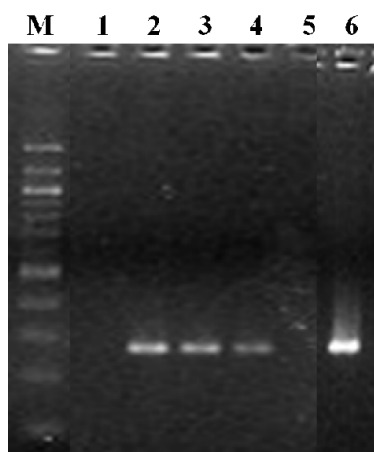


Fig. 3.25. Analisi PCR diretta su isolati Psa-“like” da vari frammenti di tralci/fusto provenienti dalla pianta n° 20. M: marker molecolare DNA 100 bp; 1: Ba; 2: B1; 3: B2; 4: A2; 5: ADS; 6: Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> (Minardi, 2012).

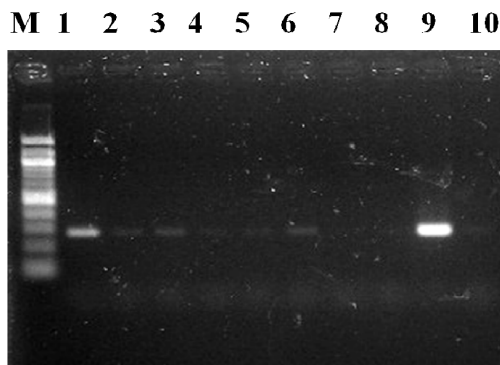


Fig. 3.26. Analisi PCR diretta su DNA estratto da campioni vegetali di tralci/fusto provenienti dalla pianta n° 20. M: marker molecolare DNA 100 bp; 1: F1; 2: F2; 3: F3; 4: F4; 5: F5; 6: F6; 7: F7; 8: Fg1; 9: Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup>; 10: ADS (Minardi, 2012).

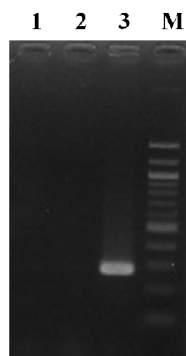


Fig. 3.27. Analisi PCR diretta su DNA estratto da campione vegetale Bb proveniente dalla pianta n° 20. 1: Bb; 2: ADS; 3: Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>; M: marker molecolare DNA 100 bp (Minardi, 2012).

#### 3.3.2.4. Analisi *in toto* della pianta di controllo 2C

In data 17 novembre 2011 la pianta n° 2C (Fig. 3.28; tunnel B fila 1 - Tab. 3.1) rappresentata schematicamente in Fig. 3.29 (Minardi *et al.*, 2012a) è stata analizzata *in toto*. Al momento dell'analisi la lunghezza dei cancri nei due germogli trattati con acqua distillata sterile (A e B) era di 3 mm (A) e 128 mm (B). I frammenti prelevati in campo sono stati siglati e misurati come riportato in Tab. 3.7 prima di essere sottoposti alle analisi di laboratorio. I campioni finali ottenuti dopo essere stati trattati seguendo il metodo 1 sono riportati in Tab. 3.8 (P. Minardi, dati non pubblicati).

Le analisi microbiologiche hanno evidenziato la presenza di numerosi batteri endofiti, ma hanno escluso la presenza di Psa.

L'analisi PCR endofiti Psa-“like” isolati nei vari frammenti della pianta non ha portato ad alcuna amplificazione (Fig. 3.30).



Fig. 3.28 Pianta di controllo n° 2C (tunnel B Fila 1) trattata con ADS il 7 ottobre 2010 ed analizzata il 17 novembre 2011 (Foto P. Minardi; Minardi, 2012).

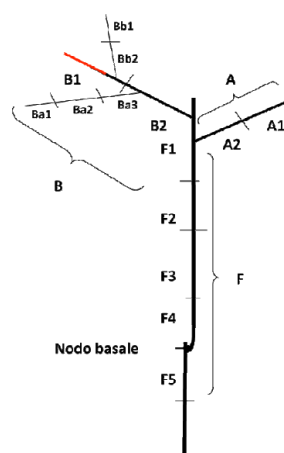


Fig. 3.29. Rappresentazione schematica della pianta di controllo n° 2C (analisi *in toto* effettuata il 17-11-11). Le sigle indicano i frammenti in cui la pianta è stata sezionata e che sono stati analizzati come descritto nei Materiali e Metodi (Minardi *et al.*, 2012b).

Campioni	Misura (cm)	Sub-campioni	cm/frammento
<b>A</b>	40	<b>A1- A2</b>	20
<b>B</b>	34	<b>B</b> (tolti 13 cm necrosi)	21
<b>Ba</b>	48	<b>Ba1-Ba2-Ba3</b>	16
<b>Bb</b>	40	<b>Bb1</b> (secco)	-
		<b>Bb2</b>	21
<b>F</b>	72	<b>F1-F2</b>	20
		<b>F3-F4</b>	16,5
		<b>F5</b>	11

Tab. 3.7. Campionamento in campo dei frammenti dei germogli e del fusto della pianta n° 2C. I due germogli trattati con ADS sono indicati con la lettera A e B. Le sigle successive indicano i vari frammenti sezionati secondo quanto riportato nell'elenco sottostante. Ba e Bb: fanno riferimento a nuovi germogli su B procedendo rispettivamente dalla base all'apice. Con la lettera F si indica il fusto (Minardi, 2012).

Campioni	Misura (cm)	Frammenti (n°)	Peso (g)	PBS (ml)
<b>Ba1</b>	16	11	1,8	20
<b>Ba2</b>	16	11	3,7	30
<b>Ba3</b>	16	11	5,4	30
<b>Bb2</b>	20	12	2,5	30
<b>B</b>	21	19	11,7	30
<b>A1</b>	20	13	8,9	20
<b>A2</b>	20	20	4,4	30
<b>F1</b>	20	17	11,4	40
<b>F2</b>	20	20	15,7	45
<b>F3</b>	16,5	17	14,8	45
<b>F4</b>	16,5	17	18,9	45
<b>F5</b>	11	9	36,8	45

Tab. 3.8. Campionamento in laboratorio dei frammenti vegetali in ordine di prelievo dalla pianta n° 2C. (Minardi, 2012).



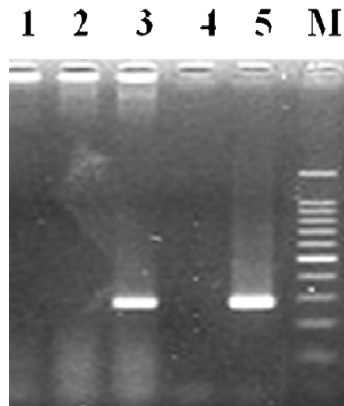


Fig. 3.30. Analisi PCR diretta su endofiti Psa-“like” isolati da frammenti di fusto provenienti dalla pianta di controllo n° 2C. 1: F3.1; 2: F3.2; 3: Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>; 4: F2; 5: ADS; 6: Psa3739; M: marker molecolare DNA 100 bp (Minardi, 2012).

### 3.3.2.5. Reisolamento di Psa::gfp-Rif<sup>res</sup> da pianta n° 8

In data 15 giugno 2012 nella pianta 8 (Fig. 3.31; tunnel B fila 1 - Tab. 3.1), rappresentata schematicamente in Fig. 3.32 (Minardi *et al.*, 2013), al momento dell’analisi la lunghezza dei cancri nei due germogli inoculati (A e B) era di 150 mm (A) e 305 mm (B). La pianta risultava asintomatica nel resto del corno. I frammenti prelevati in campo sono stati siglati e misurati come riportato in Tab. 3.9 prima di essere sottoposti alle analisi di laboratorio. I campioni finali ottenuti dopo essere stati trattati seguendo il metodo 2 (sez. 3.2.6.2.) sono riportati in Tab. 3.10.



Fig. 3.31. Pianta inoculata con Psa::gfp-Rif<sup>res</sup> n° 8 (tunnel B fila 1) ed analizzata il 15 giugno 2012 (Foto P. Minardi; Minardi, 2012).

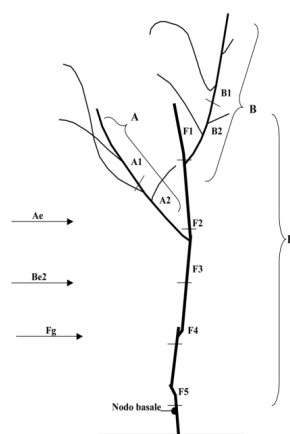


Fig. 3.32. Rappresentazione schematica della pianta inoculata n° 8 (analisi *in toto* effettuata il 15-6-12). Le sigle indicano i frammenti in cui la pianta è stata sezionata e che sono stati analizzati come descritto nei Materiali e Metodi (Minardi *et al.*, 2013).

Campioni	Misura (cm)	Sub-campioni	cm / frammento
<b>Be1</b>	11,5 (secco)	-	-
<b>Be2</b>	70,5	<b>Be2</b>	30,5
<b>Be3</b>	6 (secco)	-	-
<b>Be4</b>	5,7 (secco)	-	-
<b>Be5</b>	35	-	-
<b>B</b>	42	<b>B1</b> (secco)	-
		<b>B2</b> solo ID	21
<b>Ae1</b>	15,5	<b>Ae1</b>	
<b>Ae2</b>	20,5	<b>Ae2</b>	20,5
<b>Ae3</b>	7,2	-	
<b>A</b>	40 (14,8 nect)	<b>A1</b> solo ID	20
		<b>A2</b>	20
<b>Fg</b>	45	<b>Fg</b>	29
<b>F</b>	98	<b>F128</b> (-8 tessuto morto)	20
		<b>F2</b>	20,5
		<b>F3</b>	7
		<b>F4</b>	21
		<b>F5</b>	21,5

Tab. 3.9. Campionamento in campo dei frammenti dei germogli e del fusto della pianta n° 8. I due germogli inoculati con il ceppo Psa: *gfp-Rif<sup>res</sup>* sono indicati con la lettera A e B. Le sigle successive indicano i vari frammenti sezionati secondo quanto riportato nell'elenco sottostante. Aa e Ba: fanno riferimento a nuovi germogli su A e B procedendo rispettivamente dalla base all'apice. Con la lettera F si indica il fusto. (Minardi, 2012).

Campioni	Misura (cm)	Frammenti (n°)	Peso (g)	PBS (ml)
<b>Be2</b>	29,5	16	7,3	40
<b>Ae1+Ae2</b>	35	19	6,1	25
<b>A2</b>	19	15	9,1	50
<b>Fg</b>	28	19	5	20
<b>F1</b>	19	12	15,8	60
<b>F2</b>	19,5	18	19,9	60
<b>F3</b>	6	5	10	40
<b>F4</b>	20	16	56,6	140
<b>F5</b>	20,5	17	55,4	140

Tab. 3.10. Campionamento in laboratorio dei frammenti vegetali in ordine di prelievo dalla pianta n° 8 (Minardi, 2012).

L'analisi BIO-PCR campioni (Fig. 3.33) ha evidenziato l'amplificazione del frammento di 280 bp nei segmenti A2, F1, F2 ed F3; al contrario non vi è stata alcuna amplificazione nei germogli laterali Be2 ed Ae in posizione acropeta rispetto ai germogli inoculati A e B; nei segmenti di fusto F4 ed F5 e nel germoglio Fg.

Il ceppo re-isolato è stato in grado di riprodurre i sintomi della malattia in piantine di actinidia e di indurre reazione di ipersensibilità in piante di tabacco. I risultati ottenuti dagli isolamenti diretti e dall'analisi PCR sono stati confermati dalla presenza di epifluorescenza all'osservazione dei campioni al microscopio.

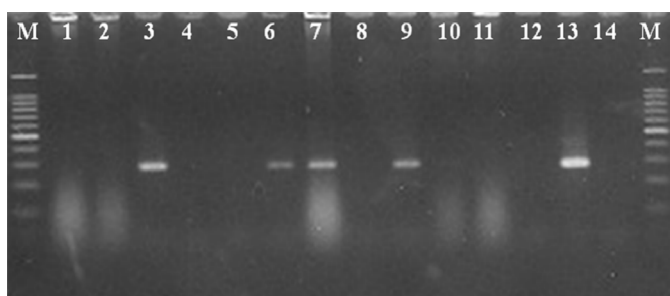


Fig. 3.33. Analisi BIO-PCR diretta su campioni ottenuti da vari frammenti di tralci/fusto provenienti dalla pianta n° 8. M: marker molecolare DNA 100 bp; 1: Be2; 2: Ae; 3: A2; 4: ADS; 5: Fg; 6: F1; 7: F2; 8: ADS; 9: F3; 10: F4; 11: F5; 12: ADS; 13: Psa::*gfp-Rif<sup>res</sup>*; 14: MixPCR (Minardi, 2012).

### 3.3.2.6. Reisolamento di Psa::*gfp-Rif<sup>res</sup>* da pianta n° 31

In data 20 giugno 2012 nella pianta 31 (Fig. 3.34; Tunnel A Fila 2 - Tab. 3.1), rappresentata schematicamente in Fig. 3.35 (Minardi *et al.* 2013), al momento dell'analisi la lunghezza dei cancri nei due germogli inoculati (A e B) era di 145 mm (A) e 220 mm (B). La pianta risultava asintomatica nelle altre sue parti. I frammenti prelevati in campo sono stati siglati e misurati come riportato in Tab. 3.11 prima di essere sottoposti alle analisi di laboratorio. I campioni ottenuti dopo essere stati trattati seguendo il metodo 2 (3.2.6.2.) sono elencati in Tab. 3.12 (P. Minardi, dati non pubblicati).

Le analisi BIO-PCR dei campioni cresciuti in substrato di arricchimento per 72 ore e successivamente re-inoculati in substrato fresco per 48 ore hanno dato esito negativo. L'isolamento su substrati semiselettivi ha portato all'identificazione di una cinquantina di endofiti non Psa-“like” mentre alcuni endofiti Psa-“like” all'analisi PCR non hanno prodotto l'amplicone caratteristico. In questo caso è stata confermata la difficoltà di re-isolare il batterio da porzioni asintomatiche di tralci/fusti nel periodo

estivo come riportato in letteratura per molti batteri fitopatogeni in diversi sistemi pianta ospite-patogeno.



Fig. 3.34. Pianta inoculata con *Psa::gfp-Rif<sup>rES</sup>* n° 31 (tunnel A fila 2) analizzata il 20 giugno 2012 (Foto P. Minardi; Minardi, 2012).

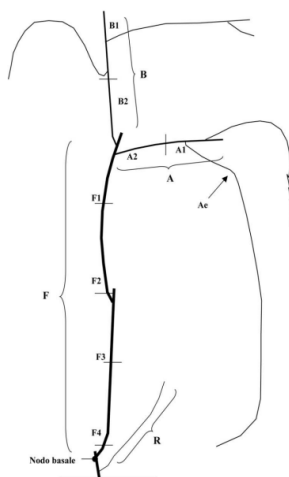


Fig. 3.35. Rappresentazione schematica della pianta inoculata n° 31 (analisi *in toto* effettuata il 20-6-12). Le sigle indicano i frammenti in cui la pianta è stata sezionata e che sono stati analizzati come descritto nei Materiali e Metodi (Minardi *et al.* 2013).

Campioni	Misura (cm)	Sub-campioni	cm/frammento
<b>Be1</b>		-	-
<b>Be2</b>		<b>Be2</b> solo ID	
<b>B</b>	41,5	<b>B1</b> solo ID	
		<b>B2</b> solo ID	25
<b>Ae1</b>		<b>Ae1</b> ID	21
<b>Ae2</b>		<b>Ae2</b> ID	20
<b>A</b>	41	<b>A1</b> solo ID	21
		<b>A2</b>	20
<b>F</b>	112	<b>F134</b> (-8 tessuto morto)	26
		<b>F2</b>	26
		<b>F3</b>	21
		<b>F4</b>	28
<b>R</b>		parte basale	37

Tab. 3.11. Campionamento in campo dei frammenti dei germogli e del fusto della pianta n° 31. I due germogli con il ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* sono indicati con la lettera A e B. Le sigle successive indicano i vari frammenti sezionati secondo quanto riportato nell'elenco sottostante. Aa e Ba: fanno riferimento a nuovi germogli su A e B procedendo rispettivamente dalla base all'apice. Con la lettera F si indica il fusto (Minardi, 2012).

Campioni	Misura (cm)	Frammenti (n°)	Peso (g)	PBS (ml)
<b>Ae1+Ae2</b>	35	29	9,4	40
<b>A2</b>	19,5	19	11,6	40
<b>F1</b>	24	21	24,4	60
<b>F2</b>	26	28	20,9	60
<b>F3</b>	20	13	30,9	60
<b>F4</b>	26	18	63,1	140
<b>R</b>	37	48	11,6	20

Tab. 3.12. Campionamento in laboratorio dei frammenti vegetali in ordine di prelievo dalla pianta n° 31 (Minardi, 2012).

### 3.3.2.7. Analisi *in toto* della pianta di controllo 4C

In data 20 giugno 2012, nella pianta di controllo 4C (Fig. 3.36; tunnel A fila 1 - Tab. 3.1), rappresentata schematicamente in Fig. 3.37 (Minardi *et al.*, 2013), al momento dell'analisi la lunghezza dei cancri nei tre germogli trattati con acqua distillata sterile (A, B e C) era di 31 mm (A), 3 mm (B) e 70 mm (C). I frammenti prelevati in campo sono stati siglati e misurati come riportato in Tab. 3.13 (P. Minardi, dati non pubblicati) prima di essere sottoposti alle analisi di laboratorio. I campioni finali ottenuti dopo essere stati trattati seguendo il metodo 1 (3.2.6.2.) sono riportati in Tab. 3.14 (P. Minardi, dati non pubblicati). Dai frammenti A1, A01 e C1 sono stati effettuati isolamenti diretti prelevando dalla parte midollare rosso scura (ad 1 cm dalla necrosi)

quattro piccoli frammenti sottocorticali che sono stati pestati in mortaio sterile e macerati in 600 µl di ADS. Per ciascun campione, 50 µl sono stati insemiati con ansa ad L in piastre di NSA-SAM. Nel frammento C1 sono stati evidenziati leggeri arrossamenti sottocorticali ad 1 cm dalla necrosi.

L'osservazione al microscopio non ha evidenziato alcuna fluorescenza come del resto ci si aspettava dal momento che la pianta non è stata inoculata con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>*. Le analisi microbiologiche hanno evidenziato la presenza di numerosi batteri endofiti, ma hanno escluso la presenza di *Psa*.



Fig. 3.36. Pianta di controllo n° 4C (tunnel A fila 1) trattata con ADS il 7 ottobre 2010 ed analizzata il 20 giugno 2012 (Foto P. Minardi; Minardi, 2013).

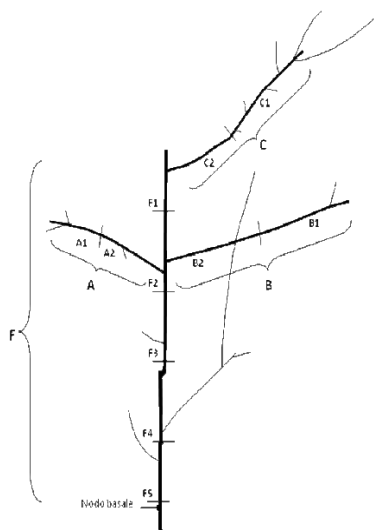


Fig. 3.37. Rappresentazione schematica della pianta di controllo n° 4C (analisi *in toto* effettuata il 20-6-12). I tre germogli (A, B e C) precedentemente trattati con ADS sono stati tagliati in diversi frammenti indicati da numeri consecutivi secondo quanto riportato nei Materiali e Metodi (Minardi *et al.*, 2013).

Campioni	Misura (cm)	Campioni	cm/frammento
<b>C</b>	41	<b>C1 (ID)</b>	20,0
		<b>C2</b>	21,0
<b>A</b>	37,5	<b>A1 (ID)</b>	17,5
		<b>A2</b>	20,0
<b>B</b>	39,5	<b>B1</b>	19,5
		<b>B2</b>	20,0
<b>A0</b>		<b>A01 (ID) 3 cm</b>	9,0
		<b>A02</b>	20,0
<b>F</b>	120,5	<b>F1</b>	25,0
		<b>F2</b>	25,0
		<b>F3</b>	25,0
		<b>F4</b>	22,0
		<b>F5</b>	22,0

Tab. 3.13. Campionamento in campo dei segmenti di tralci e del fusto della pianta n° 4C analizzata *in toto*. I tre germogli trattati con ADS sono indicati con la lettera A, B e C. Le sigle successive indicano i vari frammenti sezionati secondo quanto riportato nell'elenco sottostante. Nel germoglio C lungo 78 cm era presente una necrosi e screpolature/annerimenti lungo tutta la lunghezza. Si è deciso di analizzare il frammento C1 per isolamento diretto (ID) (Minardi, 2013).

Campioni	Lunghezza (cm)	Frammenti (n°)	Peso (g)	PBS (ml)	GFP (0-5)
<b>A0</b>	20,0	29	11	40	0
<b>A2</b>	20,0	14	4,4	25	0
<b>B1</b>	21,0	13	3,3	25	0
<b>B2</b>	21,0	13	6	25	0
<b>C2</b>	20,0	12	12	40	0
<b>F1</b>	25,0	21	17,1	60	0
<b>F2</b>	25,0	22	19	45	0
<b>F3</b>	25,0	14	18,5+22,4	140	0
<b>F4</b>	22,0	13	24,7	60	0
<b>F5</b>	22,0	14	30,1+29,5	140	0

Tab. 3.14. Campionamento in laboratorio dei segmenti di tralci e del fusto della pianta n° 4C. Per ciascun campione si è tenuto conto del numero dei frammenti, del loro peso e del volume di PBS in cui sono stati immersi (Minardi, 2013).

L'analisi BIO-PCR dei campioni dopo 48 ore in fase di arricchimento (Fig. 3.38) ha evidenziato che non vi è stata alcuna amplificazione in nessuno dei dieci segmenti elencati in Tab. 3.15. L'analisi PCR su colonie di endofiti Psa-“like” isolati e purificati su NSA-SAM in particolare dal frammento A2 non ha portato ad alcuna amplificazione.

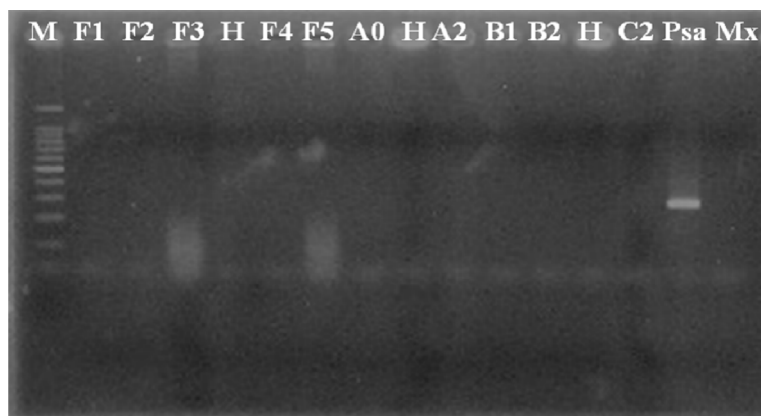


Fig. 3.38. Analisi BIO-PCR- diretta su campioni ottenuti da vari segmenti di tralci e del fusto provenienti dalla pianta n° 4C. M: marker molecolare DNA 100 bp; 1: F1; 2: F2; 3: F3; 4, 8, 12: ADS; 5: F4; 6: F5; 7: A0; 9: A2; 10: B1; 11: B2; 13: C2; 14: Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>; Mx: MixPCR (Minardi, 2013).

Campioni	Misura (cm)	Sub-campioni	Lunghezza (cm)
E	41,5	E1 (ID)	18,0
		E2 2,5 cm (ID) base	24,0
D	42,0	D1 (ID)	18,0 (solo 3 cm asim)
		D2	23,5
B	42,8	B1(ID) (34 cm cancro)	11,5
		B2	31,5
C	40,5 necrosi	C1 (ID)	10,0
		C2	30,5
A	44,0	A1 (ID)	16,0
		A2	28,0
F	107,0	F1	26,5
		F2	21,0
		F3	19,0
		F4	21,0
		F5	21,5
N	73,5	N1	36,0
		N2	37,0

Tab. 3.15. Campionamento in campo dei segmenti di tralci e del fusto della pianta n° 15 analizzata *in toto*. I cinque germogli inoculati con Psa::gfp-Rif<sup>res</sup> sono indicati con la lettera A, B, C, D ed E. Le sigle successive indicano i vari frammenti sezionati secondo quanto riportato nell'elenco sottostante. I numeri 1 ed 2 dopo la sigla dei germogli indicano rispettivamente apice e base. N1 ed N2: fanno riferimento a nuovi germogli sul fusto. Con la lettera F si indica il fusto. Alcuni segmenti di germogli sono stati analizzati solo attraverso l'isolamento diretto (ID) (Minardi, 2013).

### 3.3.2.8. Reisolamento di Psa::gfp-Rif<sup>res</sup> da pianta n° 15

In data 17 luglio 2012, nella pianta n° 15 (Fig. 3.39; tunnel B fila 2 - Tab. 3.1), rappresentata schematicamente in Fig. 3.40 (Minardi *et al.*, 2013), al momento dell'analisi la lunghezza dei cancri nei cinque germogli inoculati (A, B, C, D ed E) era di 94 mm (A), 31 mm (B), 34 mm (C), 135 mm (D) e 120 mm (E). La pianta risultava



asintomatica nel resto delle sue parti. I frammenti prelevati in campo (Tab. 3.15) sono stati siglati e misurati prima di essere sottoposti alle analisi di laboratorio. I campioni finali ottenuti dopo essere stati trattati seguendo il metodo 1 (sez. 3.2.6.2.) sono riportati in Tab. 3.16 (P. Minardi, dati non pubblicati).



Fig. 3.39. Pianta inoculata con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* n° 15 (tunnel B fila 2) analizzata il 17 luglio 2012 (Foto P. Minardi; Minardi, 2013).

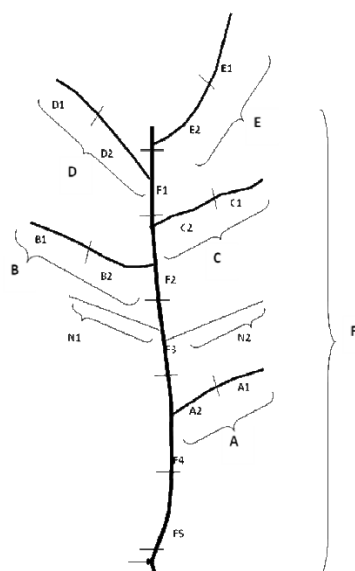


Fig. 3.40. Rappresentazione schematica della pianta inoculata n° 15 (analisi *in toto* effettuata il 17-7-12). Le sigle indicano i frammenti in cui la pianta è stata sezionata e che sono stati analizzati come descritto nei Materiali e Metodi (Minardi *et al.* 2013).

Campioni	Lunghezza (cm)	Frammenti (n°)	Peso (g)	PBS (ml)	GFP (0-5)
A2	28	19	4,6	25	0
B2	31,5	24	10,7	40	1
C2	30,5	23	7,8	25	2
D2	23,5	18	11,2	40	1
E2	24	17	7,8	35	1
N1	36	29	7,6	30	1
N2	37	28	3,8	25	2
F1	26,5	15	18,6	60	2
F2	21	18	23,9	60	2
F3	19	17	24,3	60	2
F4	21	17	44,4	80	3
F5	21,5	18	43,8	80	0

Tab. 3.16. Campionamento in laboratorio dei segmenti di tralci e del fusto della pianta n° 15. I cinque germogli (A, B, C, D ed E) precedentemente inoculati con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* sono stati tagliati in diversi frammenti indicati da numeri consecutivi secondo quanto riportato nei Materiali e Metodi. Per ciascun campione è riportata la misura iniziale, il numero ed il peso dei frammenti, il volume di PBS in cui ciascun campione è stato immerso e l'intensità della fluorescenza dovuta all'espressione della GFP (Minardi, 2013).

L'osservazione dei campioni prelevati alle estremità di ciascun frammento elencato in Tab. 3.15 ha evidenziato una fluorescenza con valore 2 nei campioni C2, N2, F1, F2 ed F3 e con valore 1 nei campioni B2, D2, E2 ed N1.

L'analisi BIO-PCR dei campioni dopo 48 ore in fase di arricchimento ha dato risultato positivo solo nel frammento A2. La successiva analisi PCR ha evidenziato l'amplificazione della banda tipica di 280 bp solo nei frammenti A2 ed E2. L'analisi PCR-“nested” (Biondi *et al.*, 2013) è invece risultata positiva per i seguenti frammenti: F1, F2, F4, D2, E2, N1, N2 ed A2 (Fig. 3.41; Minardi *et al.*, 2013).

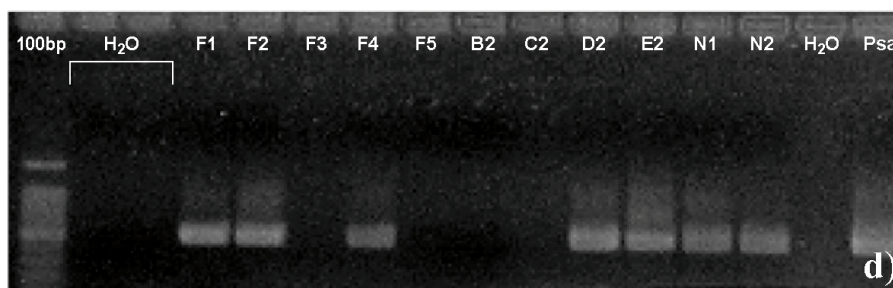


Fig. 3.41. Analisi PCR-nested del DNA estratto dai diversi segmenti di tralci e del fusto provenienti dalla pianta n° 15. Marker molecolare DNA 100 bp e controllo positivo *Psa::gfp* (Minardi, 2013).

### 3.3.2.9. Reisolamento di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* da pianta n° 19

In data 13 novembre 2012, nella pianta n° 19 (Fig. 3.42; tunnel B fila 2 - Tab. 3.1), rappresentata schematicamente in Fig. 3.43 (Minardi *et al.*, 2013), al momento dell'analisi la lunghezza dei cancri nei quattro germogli inoculati (A, B, C e D) era di 130 mm (A), di 332 mm (B), di 168 mm (C) e di 118 mm (D). La pianta risultava asintomatica nelle rimanenti parti. I frammenti prelevati in campo sono stati siglati e misurati come riportato in Tab. 3.17 (P. Minardi, dati non pubblicati) prima di essere sottoposti alle analisi di laboratorio. I campioni finali ottenuti dopo essere stati trattati seguendo il metodo 2 (sez. 3.2.6.2.) sono riportati in Tab. 3.18 (P. Minardi, dati non pubblicati). L'osservazione dei campioni prelevati alle estremità di ciascun frammento ha evidenziato un debole fluorescenza solo in due campioni A2 ed F2. L'isolamento diretto su substrati selettivi ha messo in evidenza numerose colonie batteriche tra le quali sono state scelte e purificate solo le colonie *Psa*-“like”. Il ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* è stato reisolato su substrato semiselettivo solo a livello dei germoglio inoculati e non nel fusto. Il ceppo re-isolato è stato in grado di riprodurre i sintomi della malattia in piantine di actinidia e di indurre reazione di ipersensibilità in piante di tabacco.



Fig. 3.42. Pianta inoculata con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* n° 19 (tunnel B fila 2) ed analizzata il 13 novembre 2012 (Foto P. Minardi; Minardi, 2013).

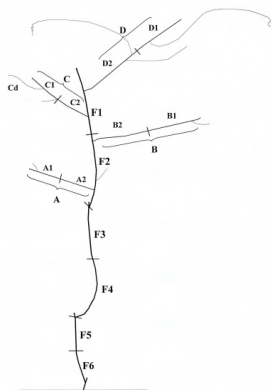


Fig. 3.43. Rappresentazione schematica della pianta inoculata n° 19 (analisi *in toto* effettuata il 13-11-12).. Le sigle indicano i frammenti in cui la pianta è stata sezionata e che sono stati analizzati come descritto nei Materiali e Metodi (Minardi *et al.* 2013).

Campioni	Misura (cm)	Sub-campioni	cm/frammento
<b>D</b>	42.8	<b>D1 (ID) 12,5 cancro</b>	22.0
		<b>D2</b>	21.0
<b>C</b>	26.0	<b>C1 (ID) (cancro)</b>	6.5
		<b>C2</b>	20.0
<b>Cd</b>	16.0		
<b>B</b>	41.0	<b>B1 secco</b>	20.5
		<b>B2 (ID)</b>	20.5
<b>A</b>	41.0	<b>A1 (ID)</b>	20.5
		<b>A2</b>	20.5
<b>F</b>	117.0	<b>F1</b>	23.5
		<b>F2</b>	23.5
		<b>F3</b>	16
		<b>F4</b>	16
		<b>F5</b>	17.5
		<b>F6</b>	17.5

Tab. 3.17. Campionamento in campo dei segmenti di tralci e del fusto della pianta n° 19 analizzata *in toto*. I quattro germogli (A, B, C e D) precedentemente inoculati con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* sono indicati con la lettera A, B, C, D ed E. Alcuni segmenti di germogli sono stati analizzati solo attraverso l'isolamento diretto (ID) (Minardi, 2013).

Campioni	Lunghezza (cm)	Frammenti (n°)	Peso (g)	PBS (ml)	GFP (0-5)
<b>A2</b>	20.5	17	6.8	25	0/1
<b>Cd</b>	16.0	15	5.2	25	0
<b>C2</b>	20.0	14	12.2	50	0
<b>D2</b>	21.0	20	19.1	60	0
<b>F1</b>	23.5	15	39.5	80	0
<b>F2</b>	23.5	17	40.0	80	0/1
<b>F3</b>	16.0	12	37.4	80	0
<b>F4</b>	16.0	12	34.4	70	0
<b>F5</b>	17.5	13	46.0	80	0
<b>F6</b>	17.5	13	57.0	80	0

Tab. 3.18. Campionamento in laboratorio dei segmenti di tralci e del fusto della pianta n° 19. Per ciascun campione è riportata la misura iniziale, il numero ed il peso dei frammenti, il volume di PBS in cui ciascun campione è stato immerso e l'intensità della fluorescenza dovuta all'espressione della GFP. 0/1: debole fluorescenza (Minardi, 2013).

L'analisi BIO-PCR dei campioni dopo 72 ore di crescita in fase di arricchimento (Fig. 3.44) ha evidenziato che non vi è stata alcuna amplificazione in nessuno dei dieci segmenti elencati in Tab. 3.18 (P. Minardi, dati non pubblicati).

L'analisi PCR su sospensione cellulare di una colonia Psa-“like” purificata dal segmento A1-2 ha permesso di amplificare la banda di 280 bp (Fig. 3.45). Analogamente la stessa analisi su sospensioni cellulari di colonie Psa-“like” purificate dai seguenti frammenti di tralci/fusti: A1-1; B2-2; C1-1; C1-2; D1-2 ha permesso di amplificare la banda specifica tipica di Psa (Fig. 3.46).



Fig. 3.44. Analisi BIO-PCR-diretta su campioni ottenuti da vari segmenti di tralci/fusto provenienti dalla pianta n° 19. M: marker molecolare DNA 100 bp; 1: A2; 2: C2; 3: Cd; 4: D2; 5, 10, 13: ADS; 6: F1; 7: F2; 8: F3; 9: F4; 11: F6; 12: F7; 14: Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup>; 15: MixPCR (Minardi, 2013).

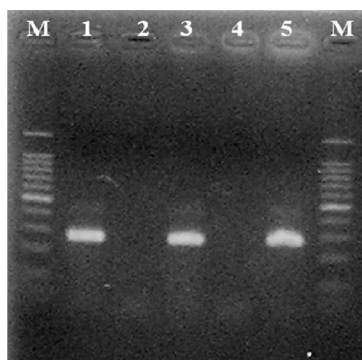


Fig. 3.45. Analisi PCR-diretta su sospensione cellulare di colonia purificata dal segmento A1-2 di tralcio proveniente dalla pianta n° 19. M: marker molecolare DNA 100 bp; 1: Psa 3.1; 2, 4: ADS; 3: A1-2; 5: Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> (Minardi, 2013).

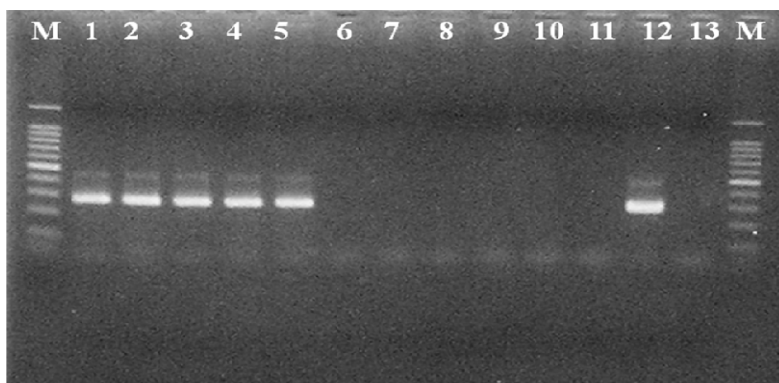


Fig. 3.46. Analisi PCR-diretta su sospensioni cellulari di colonie purificate da segmenti di tralci/fusti provenienti dalla pianta n° 19. M: marker molecolare DNA 100 bp; 1: A1-1; 2: B2-2; 3: C1-1; 4: C1-2; 5: D1-2; 6, 11: ADS; 7: F3; 8: F4; 9: F5; 10: F6; 12: Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup>; 13 Mix PCR (Minardi, 2013).

### 3.3.2.10. Reisolamento di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* da pianta n° 40

In data 23 aprile 2013, nella pianta n° 40 (Fig. 3.47; tunnel A fila 1 - Tab. 3.1), rappresentata schematicamente in Fig. 3.48 (Minardi *et al.*, 2013), al momento dell'analisi la lunghezza dei cancri nei tre germogli inoculati (A, B e C) era di 166 mm (A), 189 mm (B) e di 225 mm (C). Le parti rimanenti della pianta risultavano asintomatiche. I frammenti prelevati in campo sono stati siglati e misurati come riportato in Tab. 3.19 prima di essere sottoposti alle analisi di laboratorio. I campioni finali ottenuti dopo essere stati trattati seguendo il metodo 2 (3.2.6.2.) sono riportati in Tab. 3.20 (P. Minardi, dati non pubblicati). L'osservazione dei campioni prelevati alle estremità di ciascun frammento elencato in tabella ha evidenziato una fluorescenza elevata nei tre germogli trattati: A2 (valore 5), C2 (valore 4) e B2 (valore 2). mentre nel fusto la fluorescenza è diminuita al valore 1 nel tratto compreso tra F1 ed F4 ed è risultata assente nei due frammenti inferiori (F5 ed F6).

L'isolamento diretto su substrati semiselettivi ha messo in evidenza numerose colonie batteriche tra le quali sono state scelte e purificate solo le colonie *Psa*-“like”. L'analisi PCR di colonie *Psa*-“like” provenienti dai segmenti A2, B2, C2, F2, F1, F4, F5 ed F6 non ha evidenziato alcuna amplificazione.

Al contrario, l'analisi PCR-“nested” del DNA estratto dai campioni dopo 72 ore di crescita in fase di arricchimento (Fig. 3.49) ha evidenziato l'amplificazione del frammento atteso in tutti i nove segmenti elencati in Tab. 3.20 (P. Minardi, dati non pubblicati).



Fig. 3.47. Pianta inoculata con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* n° 40 (tunnel A fila 1) ed analizzata il 23 aprile 2013 (Foto P. Minardi; Minardi, 2013).

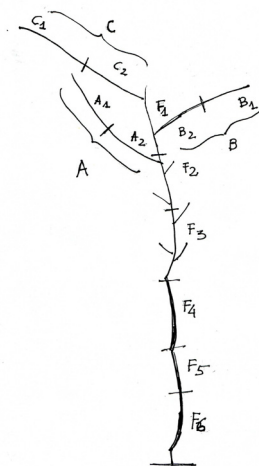


Fig. 3.48. Rappresentazione schematica della pianta inocolata n° 40 (analisi *in toto* effettuata il 23-4-13). Le sigle indicano i frammenti in cui la pianta è stata sezionata e che sono stati analizzati come descritto nei Materiali e Metodi (Minardi *et al.*, 2013).

Campioni	Misura (cm)	Sub-campioni	cm/frammento
A	41,5	A1 (ID)	20,5
		A2	21
B	39,5	B1 (ID)	19,5
		B2	20
C	42	C1 (ID)	22,5
		C2	20
F	121,5	F1	20
		F2	20
		F3	21,5
		F4	21,5
		F5	21
		F6	19

Tab. 3.19. Campionamento in campo dei frammenti dei tralci e del fusto della pianta n° 40 analizzata *in toto*. I tre germogli inoculati con *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* sono indicati con la lettera A, B e C. Alcuni segmenti di germogli sono stati analizzati solo attraverso l'isolamento diretto (ID) (Minardi, 2013).

Campioni	Lunghezza (cm)	Frammenti (n°)	Peso (g)	PBS (ml)	GFP (0-5)
A2	21,0	15	14,4	30	5
B2	20,0	16	11,4	30	2
C2	20,0	16	14,8	30	4
F1	20,0	16	23,8	45	1
F2	20,0	20	24,9	45	1
F3	21,5	16	29,8	45	1
F4	21,5	20	38,8	45	1
F5	21,0	16	65,1	80	0
F6	19,0	17	77,4	80	0

Tab. 3.20. Campionamento in laboratorio dei segmenti di tralci e del fusto della pianta n° 40. Per ciascun campione è riportata la misura iniziale, il numero ed il peso dei frammenti, il volume di PBS in cui ciascun campione è stato immerso e l'intensità della fluorescenza dovuta all'espressione della GFP (Minardi, 2013).

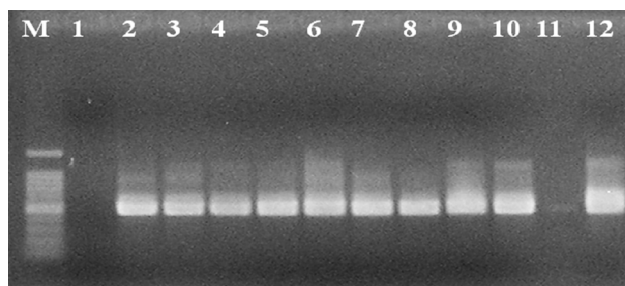


Fig. 3.49. Analisi PCR-nested del DNA estratto dai diversi arricchimenti dei frammenti di tralci/fusti provenienti dalla pianta n° 40. M: Marker molecolare DNA 100 bp, 1 e 11: ADS; 2: A2; 3: B2; 4: C2; 5: F1; 6: F2; 7: F3; 8: F4; 9: F5; 10: F6; 12: controllo positivo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* (Minardi, 2013).

### 3.4. CONCLUSIONI

In piante adulte di actinidia inoculate con il ceppo virulento *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>*, la progressione dei cancri lungo i tralci inoculati nel 2011 ha avuto una pausa tra metà novembre e fine gennaio, è ripresa poi a fine inverno ed è stata maggiore dopo periodi di marcati abbassamenti termici. L'allungamento dei cancri è proseguita in primavera ed è rimasta molto elevata tra marzo e giugno (Minardi, 2012b). Nel 2012, la progressione dei cancri lungo i tralci ha avuto una pausa tra fine settembre ed inizio dicembre, è ripresa ma molto debolmente a fine inverno. La lenta progressione dei cancri nei mesi successivi durante l'inverno 2012-13 potrebbe essere messa in relazione con la mancanza di periodi di marcati abbassamenti termici. Di fatto è molto probabile che dopo il lungo periodo trascorso dall'inoculazione sperimentale già dalla primavera del 2013 possano avere avuto luogo fenomeni secondari in grado di condizionare la risposta della pianta rendendo i risultati delle osservazioni relative alla progressione dei cancri poco affidabili (Minardi, 2013).

Per quanto riguarda lo studio della colonizzazione da parte di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* attraverso re-isolamento del patogeno ed analisi PCR del DNA estratto dai campioni vegetali provenienti dalle piante analizzate *in toto*, nella pianta n°20 la presenza di *Psa* è stata evidenziata nei campioni provenienti dai due tralci inoculati e nel fusto procedendo dall'apice in direzione basipeta fino a 110 cm (su una lunghezza totale del fusto di 118 cm). Nella pianta n°8 il re-isolamento del patogeno e l'analisi PCR hanno evidenziato la presenza di *Psa* nei campioni provenienti dai due tralci inoculati e nel fusto procedendo dall'apice in direzione basipeta fino a 45,5 cm (su una lunghezza totale del fusto di 98 cm). Nella pianta n°31 le analisi microbiologiche e molecolari non hanno consentito né il re-isolamento di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* né la produzione dell'amplicone di 280 bp tipico di



Psa, confermando la difficoltà di isolamento di batteri fitopatogeni da fusti di piante asintomatiche nel periodo estivo (Minardi, 2012b).

Nella pianta n°15 l'analisi BIO-PCR su campioni mantenuti 48 ore in fase di arricchimento ha dato risultato positivo solo per il germoglio inoculato A, mentre l'analisi PCR convenzionale ha permesso di identificare il batterio solo in due germogli inoculati (A ed E). L'analisi PCR-“nested” del DNA estratto dai campioni vegetali provenienti dalla pianta analizzate *in toto*, ha evidenziato la presenza di Psa nei campioni provenienti da due tralci inoculati (A ed E) sui cinque totali e nel fusto procedendo dall'apice in direzione basipeta fino a 88 cm (su una lunghezza totale del fusto di 107 cm). Nella pianta n°19 il re-isolamento del patogeno su substrato selettivo è stato possibile a livello dei germogli inoculati e non a livello del fusto. L'analisi BIO-PCR su campioni mantenuti per un periodo più prolungato in fase di arricchimento (72 ore invece di 48 ore) non ha dato risultato positivo in nessun campione. L'analisi PCR sulle sospensioni cellulari delle colonie Psa-“like” ha confermato i risultati degli isolamenti diretti dai germogli inoculati, ma dal fusto. L'analisi dei dati fa ritenere che sia comunque più difficile ottenere Psa endofita nel fusto asintomatico ed è possibile che la concentrazione raggiunta dal patogeno sia al di sotto della soglia rilevata con il metodo adottato. L'impiego di tecniche più sofisticate potrebbe consentire l'individuazione del batterio presente a concentrazioni molto basse. Considerata la diversità delle singole piante, non si può comunque escludere che in questo caso il patogeno sia rimasto circoscritto a livello endofita solo a livello dei germogli inoculati. Nella pianta n°40 l'analisi PCR-nested del DNA estratto dai campioni dopo la fase di arricchimento di 72 ore ha evidenziato l'amplificazione del frammento di DNA della lunghezza attesa in tutti i campioni testimoniando la progressione di Psa::*gfp-Rif<sup>res</sup>* lungo tutto il fusto oltre che nei germogli inoculati (Minardi, 2013).

In conclusione, *P. syringae* pv. *actinidiae* inoculato a bassa dose per ferita autunnale è in grado di sopravvivere durante il primo inverno e colonizzare attivamente i tessuti nella stagione vegetativa successiva causando infezioni locali a progressione basipeta visibili al punto d'inoculazione e infezioni sistemiche in parti di fusto che sono rimaste asintomatiche (Minardi *et al.*, 2012b). La sopravvivenza di Psa è stata rilevata anche durante il secondo inverno e si è riattivata molto prima della ripresa vegetativa della pianta ospite a temperature relativamente basse. I risultati indicano che nel patosistema actinidia - *P. syringae* pv. *actinidiae* il patogeno mostra di aver raggiunto un alto grado di patoadattamento e pertanto è quanto mai opportuna un'accurata

revisione e messa a punto delle strategie di lotta che tengano conto di questo importante aspetto epidemiologico (Minardi *et al.*, 2012b).

Tra le analisi PCR adottate, la PCR-“nested” si è rilevata come il metodo più veloce per evidenziare la presenza del patogeno in campioni ottenuti usando il metodo 2 e lasciati per 72 ore in fase di arricchimento (P. Minardi, dati non pubblicati). Viene confermata la difficoltà nell’isolare direttamente il patogeno verosimilmente per la bassa concentrazione all’interno di tessuti che rimangono appunto asintomatici perché non ci sono le condizioni tali da raggiungere la soglia necessaria per il *quorum sensing* alla base dell’innesco della patogenesi (von Bodman *et al.*, 2003; Dulla *et al.*, 2010; Silby *et al.*, 2011; Reinhold-Hurek e Hurek, 2011; Minardi *et al.*, 2012b). L’impiego di metodiche più sofisticate che consentano di quantificare all’interno dei tessuti la concentrazione del patogeno potrà fornire ulteriori dettagli sulla distribuzione endofita del patogeno in piante asintomatiche e la sua possibile localizzazione in organi specifici della pianta che confermino l’elevato grado di patoadattamento raggiunto dal patogeno (Ma *et al.*, 2006; Block e Alfano, 2011; Minardi *et al.*, 2012b; 2013).

## 4. SOPRAVVIVENZA IN MATERIALE MICROPROPAGATO

### 4.1. INTRODUZIONE

La notevole crescita del settore kiwi registrata in Italia (CSO, 2014) ha determinato un corrispondente e incremento nella richiesta di materiale micropropagato *in vitro*. In Italia la diffusione del cancro batterico causato da Psa purtroppo comporta seri problemi all'industria vivaistica per quanto riguarda la precoce rilevazione del patogeno nel materiale vegetale micropropagato da cui proviene la maggior parte delle piante che vengono usate per la costituzione dei nuovi impianti nelle aziende agricole (Minardi, 2011; Minardi *et al.*, 2012c). Lo stato sanitario della piante madri rappresenta quindi un punto cruciale nel controllo della diffusione della malattia specialmente se si considera che nella legislazione fitosanitaria nazionale ed europea l'*Actinidia* spp. è tuttora considerata una specie ornamentale e fino al 2013 non era neppure assoggettata, come altre specie fruttifere tradizionali, all'emissione del passaporto fitosanitario al momento della commercializzazione (Minardi *et al.*, 2012c). Negli ultimi anni la produzione di piante di *Actinidia* spp. è stata regolamentata prima con il DM del 7-2-11 "Misure di emergenza per la prevenzione, il controllo o l'eradicazione del cancro batterico dell'*actinidia* causato da Psa", poi recentemente con la Decisione UE 756 del 5-12-2012 relativa "alle misure per impedire l'introduzione e la diffusione nell'Unione Europea di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*" che dal 2013 ha reso appunto obbligatorio il passaporto delle piante. In particolare nel DM 7-2-2011, l'art.10 prevede che per la produzione di piante di *Actinidia* spp. sia impiegato materiale controllato secondo un apposito disciplinare riportato nell'allegato II del decreto stesso.

Pertanto nel recente passato in Italia la mancanza di regole e di tracciabilità dei materiali micropropagati *in vitro* hanno certamente rappresentato l'anello debole della filiera produttiva nei confronti della diffusione del CBA. Infatti, il rischio che Psa possa essere associato al materiale micropropagato e quindi trasferito ai nuovi individui è molto elevato quando le piante madri risultano asintomatiche (Minardi, 2011). In particolare negli ultimi anni è stata più volte segnalata l'esigenza di mettere a punto un disciplinare per la produzione e moltiplicazione di materiale certificato attraverso l'uso di tecniche innovative per rilevare in modo affidabile e veloce Psa in materiale

micropropagato asintomatico prima e durante tutte le fasi di micropropagazione con l'obiettivo principale di evitare l'ulteriore diffusione del patogeno che potrebbe rimanere in fase latente per lungo tempo a concentrazioni molto basse e comunque inferiori a quelle rilevabili con le metodologie molecolari disponibili (Minardi *et al.*, 2012c).

Per studiare la sopravvivenza di *Psa in vitro* associato a microtalee *in vitro* ottenute da un espianto iniziale (germoglio) prelevato da pianta madre sana e asintomatica, e infettate artificialmente nell'aprile del 2011 fino all'ottenimento di 7 generazioni di germogli micropropagati. Questo studio, precedentemente avviato nell'ambito del Progetto Regionale di Ricerca 2009-2011 sul Cancro Batterico dell'Actinidia (Minardi, 2011), è stato condotto per verificare se la micropropagazione *in vitro* possa considerarsi una tecnica capace di garantire la produzione di plantule esenti da *Psa*. Porzioni apicali di germogli micropropagati sono stati contaminati artificialmente nel 2011 con il ceppo virulento *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* (mutante esprimente la proteina fluorescente *gfp* e resistente agli antibiotici kanamicina e rifampicina) ed usati come espianti per la produzione di piante di actinidia. In substrato complesso o minimale il ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* emette fluorescenza verde ed è quindi possibile studiare *in vitro* ed *in planta* le modalità di colonizzazione dell'ospite adottate da *Psa*.

Inoltre, l'uso del ceppo marcato consente di distinguere la presenza di eventuali ceppi di *Psa* pre-esistenti in piantine assolutamente asintomatiche oppure introdotti successivamente durante le pratiche di micropropagazione (Minardi, 2011).

Nei mesi successivi all'inoculazione, sono state ottenute 7 generazioni di germogli in cui è stata confermata la presenza di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* (Minardi *et al.*, 2012c). Nell'arco della sperimentazione a partire dalla contaminazione artificiale, lo stato sanitario del diverso materiale vegetale è stato verificato mediante analisi microbiologiche e molecolari (isolamento su substrato nutritivo batteriologico selettivo, analisi al microscopio a epifluorescenza dei tessuti vegetali, identificazione degli isolati batterici mediante analisi PCR, estrazione del DNA da materiale vegetale).

Le analisi microbiologiche e molecolari hanno evidenziato che *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* è in grado di sopravvivere endofiticamente nelle piante senza indurre alcun sintomo della malattia (Minardi, 2013).

## **4.2. MATERIALI E METODI**

### **4.2.1. MICROTALIEE**

Come materiale vegetale di partenza sono stati usati germogli micropropagati di *A. deliciosa* cv. Hayward (clone 8) ( $\approx$  15 ceppi/vaso) con accrescimento alla base e microtalee.

Microtalee apicali con almeno 2 foglioline immature ben distese a livello del meristema apicale sono state prelevate per effettuare le subcolture, due plantule selezionate sono state disposte in vaschette di plastica contenenti il medesimo substrato di crescita (2 plantule/vaschetta). In totale sono state preparate 36 vaschette e selezionate 72 microtalee.

Per il substrato di moltiplicazione (SM) sono stati usati i macroelementi Lepoivre (Quoirin e Lepoivre, 1977) ed i microelementi MS (Murashige e Skoog, 1962). I campioni sono stati conservati in camera di crescita a temperatura di  $\pm$  23-25°C con fotoperiodo di 16/8 ore luce/buio rispettivamente (intensità luminosa pari a ca 3.500 lux) presso il CRA-FRF [Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura - Unità di Ricerca per la Frutticoltura – Magliano (FC)] (Minardi, 2011).

#### **4.2.1.1. SUBCOLTURE**

A cadenze regolari ( $\approx$  40 giorni) da ciascun campione contenuto nella vaschetta è stato prelevato il materiale vegetale necessario per effettuare una subcoltura in una nuova vaschetta costituendo una nuova generazione, mentre il materiale rimanente è stato analizzato in laboratorio. Nei 10 mesi successivi all'inoculazione sono state ottenute 7 generazioni di germogli (Minardi, 2012c).

Nel gennaio 2012 le microtalee sono state trasferite in substrato di radicazione (SR; Revilla *et al.*, 1992).

### **4.2.2. COLTURE BATTERICHE**

Il ceppo virulento Psa8404 (Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup>; Minardi, 2010) modificato geneticamente descritto in sez. 3.2.2. è stato allevato in piastre di substrato NSA o di KB con l'aggiunta di Km<sup>50</sup> e Rif<sup>50</sup>, conservate in termostato per 48 ore a 25°C  $\pm$  0,5°C.

### **4.2.3. CONTAMINAZIONE BATTERICA DELLE MICROTALIEE**

#### **4.2.3.1. PREPARAZIONE DELLE SOSPENSIONI BATTERICHE**

Tre diverse concentrazioni batteriche (“a”, “b”, “c”) sono state preparate per valutare l’effetto della dose di inoculazione sulla capacità di sopravvivenza di Psa nelle piantine *in vitro*. Sospensioni cellulari di Psa::*gfp-Rif<sup>res</sup>* sono state calibrate allo spettrofotometro per ottenere la concentrazione più elevata ( $\approx 1 \times 10^6$  UFC/ml). Questa sospensione è stata diluita per ottenere concentrazioni verosimilmente corrispondenti a  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^4$  UFC/ml rispettivamente per “b” e “c”.

Per confermare l’effettiva concentrazione batterica nelle sospensioni usate per la contaminazioni delle plantule si è proceduto alle opportune diluizioni seriali per il conteggio delle colonie batteriche su piastre contenenti substrato selettivo (Minardi, 2011).

#### **4.2.3.2. CONTAMINAZIONI BATTERICHE DELLE PLANTULE**

Per ciascuna delle 3 concentrazioni batteriche (“a”, “b”, “c”) sono state predisposte 9 vaschette (18 plantule/concentrazione batterica) e una quantità nota di sospensione è stata depositata in corrispondenza dell’apice vegetativo di ciascuna plantula in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare.

Trattati      Vaschette: 27   Plantule: 54

Nove vaschette sono state usate come controlli e identificate con la lettera “d”. Nelle vaschette di controllo 10  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O distillata sterile sono stati depositati in corrispondenza dell’apice vegetativo di ciascuna plantula.

Controlli      Vaschette: 9   Plantule: 18

Una vaschetta contenente solo il substrato di crescita è stata usata per riporre le 3 sospensioni batteriche in triplice copia per valutare la crescita del batterio in quel substrato.

Dopo i trattamenti, i quattro sub-campioni (trattati: A, B e C; controlli: D) sono stati riposti in camera di crescita a temperatura di  $\pm 23-25^\circ\text{C}$  e tenuti in osservazione presso il laboratorio CRA-FR (Magliano, FC).

#### 4.2.4. ANALISI DEI CAMPIONI

##### 4.2.4.1. OSSERVAZIONI VISIVE

Lo stato sanitario delle microtalee all'interno delle vaschette di plastica è stato seguito giornalmente mediante normali controlli visivi. Successivamente, il rilievo di eventuali sintomi è stato seguito nelle piante trasferite in vaso.

##### 4.2.4.2. OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO : ESPRESSIONE *GFP*

La presenza del ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* impiegato per la contaminazione è stata verificata essenzialmente come già descritto in sez. 3.2.8. mediante un microscopio a epifluorescenza (Zeiss, Mod. 471691-0000/03) con ingrandimenti 10X e 40X. Nelle piante di oltre due anni analizzate *in toto*, all'intensità della fluorescenza emessa dall'espressione del gene *gfp* presente nel ceppo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* è stato assegnato un valore crescente da 0 a 5 (Minardi, 2013).

##### 4.2.4.3. ESTRAZIONE DEL DNA DA MATERIALE VEGETALE

Da ciascun campione appartenente alle varie generazioni è stato ottenuto un estratto vegetale secondo il protocollo messo a punto nell'ambito del Progetto Regionale di Ricerca 2009-2011 sul Cancro Batterico dell'Actinidia (Minardi, 2010) (Fig. 4.1), apportando le necessarie modifiche in base ai risultati ottenuti nel corso della sperimentazione.



Fig. 4.1. Fasi preparative dei campioni di actinidia da micropropagazione per le successive verifiche della presenza di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* (Foto P. Minardi).

Da ogni estratto vegetale, un'aliquota è stata usata per estrarre il DNA mediante il Plant Mini Kit (Qiagen) mentre il materiale rimanente è stato conservato a -80°C con 30% di glicerolo per ulteriori analisi.

#### **4.2.4.4. REISOLAMENTO DI PSA::*GFP-RIF*<sup>RES</sup>.**

Dai campioni vegetali, l'isolamento batteriologico del ceppo marcato è stato effettuato su piastre contenenti substrati selettivi [NSA-SAM, KBC (Mohan e Schaad, 1987; Loreti *et al.*, 2013), KBC+ Km<sup>50</sup> + Rif<sup>50</sup>] dopo un'incubazione di 48-72 h a 23-25°C (Minardi, 2013). Le colonie Psa-“like” levano-positivo e non fluorescenti sono state selezionate, purificate ed identificate mediante analisi PCR.

#### **4.2.4.5. ANALISI PCR**

Le colonie Psa-“like” levano-positivo e non fluorescenti sono state selezionate e 5 µl di loro sospensioni acquose corrispondenti a circa 10<sup>7</sup> UFC/ml sono stati usati come templati per l'analisi PCR diretta (Rees-George *et al.*, 2010; Minardi, 2010) e/o PCR-nested (Biondi *et al.*, 2013) come descritto in 3.2.10.

#### **4.2.4.6. SAGGI DI PATOGENICITA' E DI IPERSENSIBILITA' IN PLANTA**

La capacità del ceppo Psa::*gfp-Rif*<sup>RES</sup> reisolato di causare i sintomi tipici della malattia è stata verificata su piantine di *A. deliciosa* var. Tomuri secondo il test di patogenicità (TP) messo a punto nell'ambito del Progetto Regionale di Ricerca 2009-2011 sul Cancro Batterico dell'Actinidia (Minardi, 2010; Minardi *et al.*, 2011).

La sua abilità di indurre la risposta ipersensibile è stata determinata in foglie di piante di tabacco (*Nicotiana tabacum* L. 'White Burley').

#### **4.2.4.7. RILIEVO DEI BATTERI ENDOFITI IN PIANTE IN VASO**

L'analisi batteriologica è stata effettuata su intere piante per verificare la presenza del ceppo Psa::*gfp-Rif*<sup>RES</sup> nelle varie parti della pianta escluse le radici (Fig. 4.2). Piante asintomatiche precedentemente trattate solo con ADS sono state usate come controllo. Per ogni pianta è stata predisposta una rappresentazione schematica siglando e misurando tutte le porzioni da sottoporre alle analisi e si è proceduto alla dissezione mediante il taglio dei tralci/fusti sintomatici partendo dall'apice fino al colletto in segmenti di 40-50 cm ciascuno utilizzando cesoie sterilizzate alla fiamma di un bunsen portatile passando da un campione al successivo. Ciascun segmento è stato avvolto in carta stagnola, marcato con apposito cartellino e riposto singolarmente in sacchetto. I



campioni sono stati portati in laboratorio e ciascun segmento è stato sterilizzato superficialmente spruzzandolo con etanolo 70% e sottoposto ad un lavaggio abbondante sotto acqua corrente e con acqua deionizzata sterile. Dopo aver rimosso sotto cappa a flusso laminare le estremità apicali e le porzioni immediatamente successive per l'osservazione al microscopio, da ogni porzione sono stati preparati frammenti da 2 cm che, dopo pesatura, sono stati riposti in beuta contenente soluzione fisiologica tamponata (PBS+ Tween 0.1%, aggiunta in proporzione al peso dei frammenti) per assicurare una completa immersione (Minardi, 2013). Le beute sono state lasciate 1 ora e 30 minuti in agitatore rotativo (120 rpm) a temperatura ambiente. Il liquido di lavaggio filtrato attraverso 2 strati di garza sterile, è stato versato in tubi Falcon da 50 ml e centrifugato 15 min a 11000 g a 4°C. Il pellet finale di ciascun campione è stato risospeso in 1,5 ml di ADS e considerato come sospensione madre (SM). Aliquote di SM sono state così distribuite: a) 550 µl di SM aggiunti a tubi sterili con 4,45 ml di NSA-SAM sono stati riposti in termostato a 23-25°C per 48-72 ore su un supporto inclinato (fase di arricchimento) (Minardi, 2013). Un tubo contenente 550 µl di ADS aggiunti a 4,45 ml NSA-SAM è stato usato come controllo negativo. Dopo il periodo di arricchimento la sospensione è stata diluita (1:10; 1:100 in base alla torbidità raggiunta) e 50 µl di ciascuna diluizione sono stati insemiati in piastre di NSA-SAM e NSA+Rif<sup>50</sup>. Analisi BIO-PCR: metà del brodo di arricchimento (2,5 ml) è stato centrifugato 10 min a 10.000g e sul pellet risospeso è stata eseguita l'analisi PCR. b) 500 µl di SM conservato a -20°C per successiva estrazione DNA (Kit Qiagen) e analisi PCR. c) 450 µl di SM con aggiunta di glicerolo 30% per la conservazione a -80 ± 0,5 °C per ulteriori isolamenti in altri substrati (ad es. KB+Rif<sup>50</sup>).



Fig. 4.2. Pinate di actinidia da micropropagazione ambientate in vaso e mantenute in serra utilizzate per la verifica della presenza di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>*.

## **4.3. RISULTATI**

### **4.3.1 SUBCULTURE IN MICROPROPAGAZIONE**

Le subcolture di germogli micropropagati di *A. deliciosa* cv. Hayward (clone 8) sono state analizzate sia mediante saggi molecolari che isolamenti microbiologici a partire dalla quinta generazione e fino al trasferimento delle piantine in torba.

Alla produzione di ogni generazione micropropagata, di volta in volta è stato scelto il materiale vegetale da analizzare, avendo cura di selezionare materiale proveniente da ogni differente concentrazione di inoculo batterico iniziale; concentrazioni decrescenti siglate come “a”-“b”-“c”, e dal materiale di controllo non inoculata.

#### **4.3.1.1 ISOLAMENTI MICROBIOLOGICI**

Per tutte le generazioni di micropropagazione successive alla quinta e fino al trasferimento dei germogli in torba, da ogni campione di materiale vegetale asintomatico prelevato dalle vaschette, è stato effettuato l'isolamento microbiologico: prima in substrati nutritivi e successivamente in substrati semiselettivi per il ceppo inoculato Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup>.

L'isolamento microbiologico del ceppo Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> è risultato positivo da tutti i campioni saggiati; anche i campioni di materiale vegetale provenienti da una dose di inoculo iniziale più bassa hanno permesso l'isolamento, solo il materiale proveniente da germogli non inoculati non ha fatto riscontrare la presenza del patogeno.

#### **4.3.1.2 ANALISI PCR**

Da ogni campionamento, lo stesso materiale vegetale utilizzato durante gli isolamenti microbiologici è stato utilizzato per i saggi molecolari di PCR, sia come estratto crudo che dopo l'estrazione del DNA.

Come verificato anche dagli isolamenti microbiologici, da ogni campione analizzato si ha avuto un risultato positivo; il ceppo di inoculo Psa::*gfp*-Rif<sup>res</sup> è stato ritrovato in tutte le generazioni di micropropagazione a tutte le diverse condizioni di concentrazione di inoculo batterico iniziale, mentre il materiale proveniente dai germogli non inoculati è risultato negativo

### **4.3.2 PIANTE IN VASO**

Al termine dei passaggi di micropropagazione, i germogli sono stati trasferiti in torba e successivamente in vaso.

#### **4.3.2.1 ISOLAMENTI MICROBIOLOGICI**

Diverse piante adulte in vaso per ogni concentrazione di inoculo iniziale sono state analizzate per gli isolamenti microbiologici in piastra, prima in substrato nutritivo e successivamente in substrato selettivo per il ceppo di inoculo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>*. Tutte le piante analizzate hanno permesso l'identificazione microbiologica di *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>*.

#### **4.3.2.2 ANALISI PCR**

Dagli stessi estratti vegetali prodotti da ogni singola pianta per la semina in substrato di crescita, si è proceduto ai vari passaggi di arricchimento (4.2.4.7) e di estrazione del DNA. I saggi molecolari effettuati sia sui campioni provenienti dalle fasi di arricchimento, sia dai DNA estratti, hanno confermato la presenza del ceppo di inoculo *Psa::gfp-Rif<sup>res</sup>* in tutti i campioni saggiati.

## **4.4 CONCLUSIONI**

I risultati ottenuti indicano chiaramente la capacità di *Psa* di contaminare piantine di actinidia micropropagate e come la presenza del batterio sia trasversale ad ogni concentrazione saggiata e senza manifestare nessuna sintomatologia, infatti il materiale di micropropagazione si è sempre mostrato asintomatico al momento delle analisi.

Considerato che sono state rispettate le tempistiche abituali per i passaggi micropropagativi, l'asintomaticità rappresenta un rischio reale di veicolo di materiale di micropropagazione infetto.



# 5. MESSA A PUNTO DI METODI DI ANALISI INNOVATIVI

## 5.1. INTRODUZIONE

L'emergenza causata dall'epidemia di CBA ha portato sempre più in primo piano la necessità di rilevare precocemente il patogeno soprattutto in piante asintomatiche che rappresentano il veicolo di infezione più pericoloso. Infatti, dal punto di vista della lotta al CBA, la prevenzione rappresenta tuttora l'unico strumento efficace per contenere la diffusione del patogeno negli impianti (Serizawa e Ichikawa, 1993a; 1993b; 1993c; Minardi, 2010; Mazzaglia *et al.*, 2010; Scortichini *et al.*, 2012; Renzi *et al.*, 2012). In Italia, soprattutto a partire dal secondo scoppio epidemico del 2009, la ricerca si è focalizzata in modo particolare sulla messa a punto di metodi di campionamento, in piante sintomatiche e asintomatiche, e per l'identificazione di Psa (EPPO, 2014).

L'identificazione del patogeno prima della comparsa dei sintomi continua ad essere essenziale per poter applicare strategie efficienti di contenimento della malattia. L'individuazione di Psa nei primi stadi infettivi è necessaria, anche se spesso difficile, poiché sovente i sintomi non appaiono durante i primi 2 o 3 anni di infezione (Serizawa *et al.*, 1989; Koh e Nou, 2002; Minardi *et al.*, 2012a; Scortichini *et al.*, 2012)..

La capacità di Psa di sopravvivere per lungo tempo in uno stato di latenza nelle piante senza indurre i sintomi della malattia (Minardi, 2010; Minardi *et al.*, 2012b; 2012c; Minardi *et al.*, 2014b) rappresenta certamente uno dei pericoli maggiori per l'insorgenza di nuovi focolai di infezione. Un metodo che focalizza l'attenzione sulla prevenzione attraverso il rilievo di Psa in materiale asintomatico è quello basato sul fenomeno fisiologico del "pianto" dell'actinidia, proposto da Biondi e collaboratori (2013) ed applicato in maniera estesa nella presente sperimentazione.

### 5.1.1 II "PIANTO" DELL'ACTINIDIA

La fisiologia dell'actinidia (Ferguson, 1984) presenta un fenomeno tipico che può essere utilizzato per verificare la presenza del patogeno nella pianta prima ancora della ripresa vegetativa, e della comparsa dei sintomi. Infatti, il "pianto" è dovuto principalmente all'aumento della pressione idrica all'interno dei vasi xilematici

dell'apparato radicale della pianta. Lo sviluppo della pressione radicale, definita come pressione xilematica positiva, è una caratteristica delle piante di actinidia che si presenta solo all'inizio della primavera (Davison, 1990; Clearwater *et al.*, 2007). La pressione radicale generalmente aumenta prima della rottura delle gemme e comporta un cospicuo flusso idrico che, attraversando l'intero apparato xilematico fino ad arrivare alle branche, determina un abbondante fuoriuscita di liquidi dai tagli di potatura e la completa rottura delle gemme.

Il "pianto" è legato alla temperatura, sia stagionale ma anche e soprattutto del terreno, ed alla pressione atmosferica ambientale, per questa ragione subisce oscillazioni nell'intensità durante l'arco della giornata. Infatti è più abbondante nelle prime ore del giorno e si esaurisce con il progredire della giornata. Altri fattori che influiscono sull'entità del fenomeno sono la natura del terreno, le condizioni meteorologiche, l'età dell'impianto e la cultivar (Clearwater *et al.*, 2007).

I "pianti" possono essere raccolti per effettuare saggi chimici e microbiologici, ed il loro utilizzo per l'identificazione dei patogeni è un metodo già conosciuto ed utilizzato per il patosistema vite-*Agrobacterium vitis* (Szegedi e Bottka, 2002; Flamini *et al.*, 2006).

## **5.2. MATERIALI E METODI**

### **5.2.1. RACCOLTA**

Per il prelievo di campioni di "pianto" occorre rimuovere i 2-3 cm distali della branca, precedentemente sterilizzata con etanolo 70% e posizionare un tubo Falcon da 15 mL in corrispondenza del taglio attendendo quindi che il tubo si riempia. I campioni di "pianto" vengono poi riposti in un contenitore refrigerato da campo e mantenuti a 4°C fino alla centrifugazione in laboratorio 10.000 g per 20 minuti a 4°C. Il "pellet" che viene ottenuto viene risospeso in un 1.000 µL di ADS, 300 µL del risospeso vengono incubati a 100°C per 15 minuti ed utilizzati per i saggi di PCR; il restante volume viene addizionato di glicerolo, conservato a -80°C ed impiegato per gli isolamenti successivi. Tutti gli isolati di Psa ottenuti da "pianto", sono stati sottoposti ai seguenti saggi biochimici (Shaad, 2001): produzione di levano, presenza di ossidasi, marciume della patata, arginina de idrolasi, risposta ipersensibile in foglie di tabacco (saggi LOPAT) e fluorescenza su substrato di cultura KB.

## 5.2.2. ANALISI RFLP-PCR

### 5.2.2.1. SAGGIO PCR-“nested”

E' stato applicato il protocollo per il saggio PCR-“nested” per l'analisi diretta dei piante (Biondi *et al.*, 2013) con una modifica che vede l'impiego di “Blotto” al posto di DMSO.

Di seguito la miscela di reazione per un volume finale di 25 µL:

- 1X PCR Go Taq Flexi buffer (Promega)
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,2 mM dNTPs
- 0,5 U Go.Taq Flexi DNA polimerasi (Promega)
- 0,4 µM per ogni “primer” (B1 e B2)
- 2% “Blotto”
- 5 µL “pianto” (tal quale o centrifugato come descritto)

Il profilo termico è stato il medesimo applicato nei saggi della prova di colonizzazione endofitica sia per i saggi diretti che per quelli “nested” (Biondi *et al.*, 2013).

### 5.2.2.2. RFLP

I prodotti di amplificazione diretta e “nested” sono stati utilizzati per le analisi RFLP effettuate con l'impiego dei tre enzimi di restrizione *AluI*; *BfmI*; *BclI* (ditta: Promega) secondi il protocollo seguente:

200 ng di amplificato vengono tagliati con:

- |                                    |                           |
|------------------------------------|---------------------------|
| - PCR diretta (“primers” B1/B2)    | <i>AluI</i> 10U 37°C 48 h |
| - PCR diretta (“primers” B1/B2)    | <i>BfmI</i> 5 U 37°C 16 h |
| - PCR-“nested” (“primers” KNF/KNR) | <i>BclI</i> 10 U 37°C 4 h |

I prodotti di restrizione sono quindi stati separati in gel di agarosio al 2,0% w/v in tampone TAE (0,004 M TRIS; 0,001 M NaEDTA e 0,002 M acido acetico glaciale), colorati in una soluzione acquosa allo 0,003% di etidio bromuro e visualizzati a luce UV (312 nm).

### 5.2.3. ISOLAMENTI MICROBIOLOGICI

Dopo la conferma molecolare della presenza di Psa si è proceduto all'isolamento in piastra del batterio sia direttamente dal “pianto” che dagli stessi campioni conservati a -80°C, in substrato di crescita minimo (KB) e differenziale (NSA).

Le piastre riposte in termostato ad una temperatura compresa tra i 23°C ed i 25°C, sono state mantenute in osservazione per 48-72 h prima dei trasferimenti per la purificazione per ottenere colture pure per lo stoccaggio.

#### **5.2.4. LA SPERIMENTAZIONE**

Nei primi mesi del 2012, tra la fine della stagione invernale e l'inizio della primavera boreale, è stato sperimentato l'utilizzo del "pianto" dell'actinidia a fini diagnostici.

Per verificare la validità del metodo (Biondi *et al.*, 2013) sono state scelte 14 piante asintomatiche in Emilia-Romagna ed una sintomatica in Lazio.

Il "pianto" prelevato, circa 15 mL per pianta, è stato sottoposto ai saggi di PCR/RFLP ed agli isolamenti microbiologici.

Le analisi molecolari sono state effettuate mettendo a confronto i metodi disponibili (Rees-George *et al.*, 2010; Gallelli *et al.*, 2011) con quello in sperimentazione (Biondi *et al.*, 2013). Questi esperimenti preliminari hanno mostrato che i primers B1/B2 (Biondi *et al.*, 2013) per il gene *ompP1* erano più sensibili e specifici per l'individuazione di Psa e quindi si è applicato nuovamente quest'ultimo metodo durante il 2013 su larga scala in Italia ed in Cile.

##### **5.2.4.1. ITALIA**

Per la sperimentazione in Italia, sono stati selezionati campi in tre regioni localizzate nel nord e nel centro Italia: Veneto, Emilia Romagna e Lazio. In ogni impianto sono stati scelti tre rami principali di un anno da 12 piante di actinidia per ogni impianto, la dislocazione delle piante campionate è stata casuale, ma distribuita in modo da campionare l'intera area dell'impianto.

Nei campi di Veneto e Lazio, le piante (rispettivamente, *A. deliciosa* cv. Hayward ed *A. chinensis* cv. Hort 16A) non avevano presentato sintomi della malattia in precedenza, tali campi, pertanto, sono stati ritenuti esenti dalla presenza di Psa fino al momento del prelievo dei campioni. Nel campo sito in Emilia-Romagna, le piante (*A. deliciosa* cv. Hayward) erano risultate infette da Psa a seguito di analisi di laboratorio ed avevano mostrato i sintomi della malattia la primavera precedente il prelievo dei campioni.

In ciascun campo sono stati effettuati tre prelievi, in un periodo compreso fra l'inizio di marzo e la prima metà di aprile. La raccolta dei pianti è stata seguita da analisi microbiologiche e molecolari in laboratorio, la tempistica dei prelievi è riportata nella Tab. 5.1.



Prelievo	Emilia-Romagna	Veneto	Lazio
I	12/03/13	21/03/13	14/03/13
II	19/03/13	28/03/13	25/03/13
III	04/04/13	11/04/13	-

Tab. 5.1. Date dei prelievi di “pianto” effettuati in Italia per ogni regione.

#### 5.2.4.2. CILE

Nello stesso anno, durante la primavera australe, è stata condotta anche la sperimentazione in Cile.

Sono stati scelti 3 impianti di *A. deliciosa* cv. Hayward da zone a sud della regione metropolitana di Santiago, dichiarati esenti da Psa dal servizio fitosanitario locale (SAG; Servicio Agrícola y Ganadero).

I prelievi sono stati effettuati nelle regioni Maule e Bio-Bio. Le procedure di prelievo sono state identiche a quelle utilizzate negli impianti italiani e sono state campionate ed analizzate 10 piante per ogni parcella scelta. Anche in questo caso il campionamento è stato effettuato in maniera casuale, in modo da coprire al massimo l’area di coltivazione ed avere così un campione il più indicativo possibile dello stato fitosanitario del frutteto. Nella prima regione (Maule), è stato possibile investigare un solo im”pianto”, mentre per la seconda regione (Bio-Bio) sono stati investigati due impianti in due diverse zone, Tab. 5.2. La raccolta dei piante è stata seguita da analisi microbiologiche e molecolari effettuate presso i laboratori di batteriologia del SAG di Santiago.

Prelievo	Regione Maule (Curicò)	Regione Bio-Bio (San Carlo)	Regione Bio-Bio (Chillan)
I	3/10/13	11/10/13	11/10/13

Tab. 5.2. Date dei prelievi di “pianto” in Cile.

## 5.3. RISULTATI

### 5.3.1. ITALIA

#### 5.3.1.1. VOLUME DEI “PIANTI”

Nei diversi prelievi non tutte le piante analizzate hanno manifestato l'evento fisiologico del “pianto” (Tabella 5.3). Fatta eccezione per i prelievi effettuati in Veneto dove si è sempre ottenuta la piena manifestazione del fenomeno del “pianto” da tutte le piante in analisi ed in tutti e tre i rilievi, nelle altre due zone di prelievo (Emilia – Romagna e Lazio) l'evento fisiologico è aumentato con il progredire del tempo, avvicinandosi quindi al periodo della rottura delle gemme.

Durante il terzo ed ultimo prelievo in Emilia - Romagna il 92% (equivalente a 11/12 piante) delle piante ha consentito la raccolta di “pianto”, in Lazio invece, già al secondo rilievo è stato possibile raccogliere il “pianto” dalla totalità delle piante.

Prelievo	N°campioni raccolti / N° piante		
	Data del prelievo		
	Veneto	E-R*	Lazio
I	12/12	5/12	10/12
	21/3/2013	12/3/2013	14/3/2013
II	12/12	9/12	12/12
	28/3/2013	19/3/2013	25/3/2013
III	12/12	11/12	-----
	11/4/2013	4/4/2013	

Tab. 5.3. Riassunto dei risultati ottenuti al prelievo del “pianto” nelle diverse epoche di campionamento. \*E-R: Emilia-Romagna.

Il volume medio dei “pianti” collezionati ad ogni prelievo col progredire della stagione, è risultato decrescente in Veneto: da oltre 40 ml ottenuti durante il primo prelievo, sono stati raccolti poco meno di 20 ml all'ultimo campionamento, mentre è risultato crescente in Emilia-Romagna e Lazio. In Emilia Romagna il volume di “pianto” medio è stato di circa 9 ml nel primo rilievo, di 7 ml nel secondo e di circa 16 ml nel terzo; in Lazio, al primo prelievo di circa 17 ml, ne è seguito un secondo di circa 30 ml (Grafico 5.1).

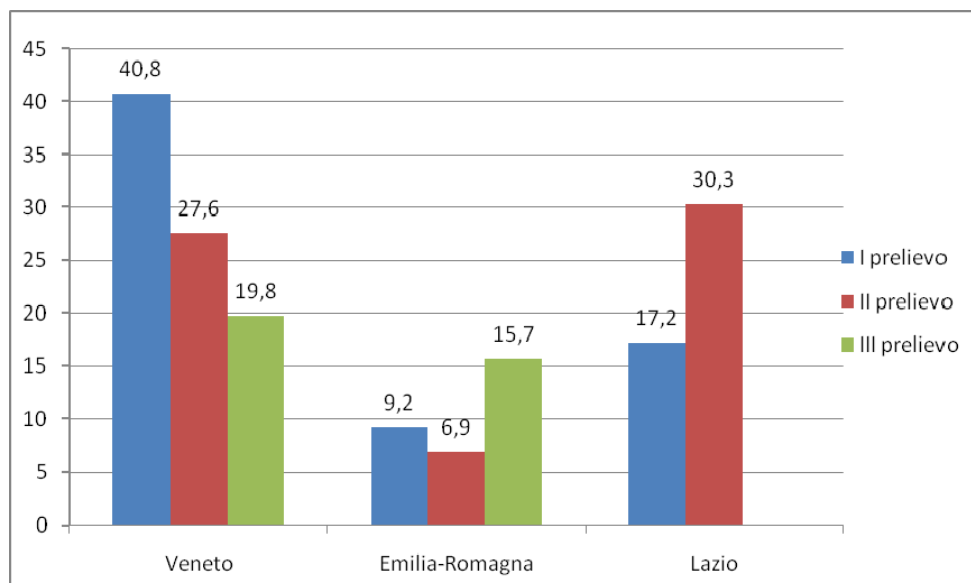


Grafico 5.1. Volume medio di “pianto” raccolto ad ogni campionamento.

### 5.3.1.2. ANALISI MOLECOLARI DEL “PIANTO”

In Veneto, il 25% dei campioni del primo prelievo è risultato positivo al saggio di amplificazione diretta, mentre al saggio “nested” è risultato positivo il 75%, nei due prelievi successivi le percentuali di individuazione di Psa sono state rispettivamente di circa il 90% e il 25% in PCR diretta, e di 100% e 60% in “nested”.

Tutti i campioni di “pianto” prelevati in Emilia-Romagna e sottoposti direttamente al saggio sono risultati positivi per la presenza di Psa in entrambi i saggi PCR. In Lazio, nei due prelievi effettuati, il saggio di PCR è stato in grado di identificare Psa nel 30% e nel 80% dei casi, mentre il saggio PCR-“nested” è risultato positivo rispettivamente nel 40% e 100% dei casi.

Facendo una media per zona di prelievo sulla totalità dei campioni raccolti la percentuale di identificazione molecolare di Psa è risultata diversa nei campioni provenienti dalle varie regioni. Dai prelievi effettuati in Veneto si è identificato Psa attraverso i saggi molecolari nel 46% e nel 78% dei casi, rispettivamente in PCR e PCR-“nested”; in Emilia-Romagna le percentuali per gli stessi saggi sono state del 100% in entrambi i casi, in Lazio invece del 55% e del 70% rispettivamente (Tab. 5.5).

La corrispondenza della positività del saggio molecolare con l’isolamento microbiologico in piastra è risultata solo parziale; è stato possibile isolare Psa dai “pianti” solo nel 13% dei casi per il Veneto, nel 59% per l’Emilia-Romagna e nel 9,5% per il Lazio (Tabella 5.5).

Regione del prelievo dei campioni di “pianto”	% campioni positivi alle analisi PCR <sup>#</sup> da “pianto”		
	analisi PCR con B1/B2	Analisi PCR-“nested” con KNF/KNR	isolamenti diretti
Veneto	46	78	16,5
E-R*	100	100	59
Lazio	55	70	13,5

Tab. 5.5. Percentuali di positività nelle analisi molecolari e negli isolamenti diretti dei campioni prelevati in Italia. \*, Emilia-Romagna. # Analisi PCR-“nested” (Biondi *et al.* 2013).

### 5.3.1.3. ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE MICROBIOLOGICA

In Veneto, in tutti i prelievi, non vi è stata differenza nell’isolamento di Psa tra l'uso di substrato nutritivo e semiselettivo: le percentuali di campioni positivi isolati ed identificati come Psa, utilizzando entrambi i substrati sono state di circa 17% al primo prelievo e di circa 8% nei due campionamenti successivi. Anche i campioni provenienti dai primi due prelievi eseguiti in Emilia-Romagna, quando sottoposti ad isolamento diretto su substrato nutritivo e semiselettivo non hanno mostrato differenze, sono risultati positivi rispettivamente circa il 43% dei campioni nel primo prelievo e l’89% nel secondo. I campioni del terzo prelievo invece sono risultati positivi circa nel 9% dei casi quando isolati su substrato nutritivo e circa nel 46% su substrato semiselettivo.

In Lazio, l’8,3% dei “pianti” del primo prelievo è risultato positivo quando veniva utilizzato un substrato semiselettivo; nessuna colonia riferibile a Psa è stata invece identificata in substrato nutritivo. Nel secondo prelievo, è stato possibile identificare il 10% di positivi dagli isolati su substrato nutritivo ed il 20% usando il substrato semiselettivo (Tabella 5.6).

Prelievi	Veneto		Emilia - Romagna		Lazio	
	N	SS	N	SS	N	SS
I	17%	17%	43%	43%	0%	8,3%
II	8%	8%	89%	89%	10%	20%
III	8%	8%	9%	46%	---	---

Tab. 5.6. Percentuali degli isolamenti positivi di Psa da “pianti” su substrati nutritivi e semi-selettivi dalle diverse regioni per ogni campionamento: N = % positivi di Psa isolati su substrato nutritivo (NSA) ; SS = % positivi di Psa isolati su substrato semiselettivo.

## 5.3.2. CILE

### 5.3.2.1. VOLUME DEI “PIANTI”

Durante la prima decade di ottobre 2013, da campi a coltivazione Hayward dichiarati Psa-esenti dal servizio fitosanitario locale, sono stati raccolti campioni di “piano” (da 3 tralci di un anno per ogni pianta). Gli individui dai quali sono stati raccolti i campioni non mostravano sintomi riconducibili alla presenza di cancro batterico al momento del prelievo dei “piani”. I campi da dove sono stati prelevati i “piani” sono stati tre, in due distinte regioni del Cile:

- 1- Curicò regione del Maule
- 2- Chillan regione del Bio-Bio
- 3- San Carlo regione del Bio-Bio

Per ogni campo si sono scelte dieci piante femmine in maniera casuale, in modo da coprire al massimo l’area di coltivazione ed avere un campione il più indicativo possibile del livello fitosanitario del frutteto; anche qui non tutte le piante per le diverse zone di campionamento hanno mostrato il fenomeno al momento della raccolta (Tabella 5.7). I volumi medi dei “piani” raccolti sono stati diversi, ma comunque sufficienti a condurre le analisi, in particolare: Curicò: 14,2 ml, Chillan: 21,1 ml, San Carlo: 23,8 ml (Grafico 5.2).

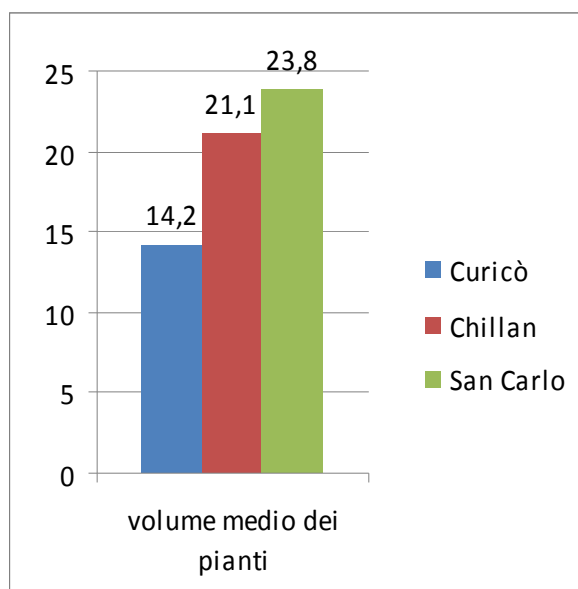


Grafico 5.2. Medie dei volumi di “piano” raccolti in Cile per zona di campionamento.

### 5.3.2.2. ANALISI MOLECOLARI DEL “PIANTO”

Prelievo	N° campioni raccolti / N° piante		
	Curicò	Chillan	San Carlo
I	7/10	8/10	10/10

Tab. 5.7. Campioni di “piano” prelevati nelle diverse zone cilene.

Dai campioni raccolti nella regione del Maule, (Curicò) 4 su 7 sono risultati positivi alle analisi molecolari di PCR-“nested” da “piano” diretto, di cui uno solo in PCR diretta. Dai campioni raccolti nella regione Bio-Bio, dalla zona di Chillan 7 campioni su 8 sono risultati positivi alle analisi molecolari, di cui 2 in PCR diretta. Dalla regione di San Carlo invece 9 campioni su 10 sono stati identificati positivi al saggio molecolare di cui 3 in PCR diretta (Tabella 4.8).

Regione del prelievo dei campioni di “piano”	% positivi alle analisi PCR <sup>#</sup> da ““piano””		
	Analisi PCR con B1/B2	Analisi PCR-“nested” con KNF/KNR	isolamenti diretti
Curicò	14	71	19,7
Chillan	25	87	32,2
San Carlo	30	90	24,4

Tab. 5.8. Percentuali di campioni positivi in analisi PCR da “piano” e da isolamenti diretti in Cile.<sup>#</sup> Analisi PCR-“nested” (Biondi *et al.*, 2013).

	PCR positivi da ““piano”” fresco/campioni totali	PCR positivi da ““piano”” conservato a -80°C
Curicò	4/7	1/7
Chillan	7/8	6/8
San Carlo	9/10	8/10
Totale	20/25	15/25

Tab. 5.9. Risultati del saggio PCR-“nested” sui campioni di “piano” prima e dopo la conservazione.

Le ripetizioni delle analisi PCR-“nested” degli stessi campioni di “piano” conservati a -80°C, hanno mostrato una perdita nella capacità di individuazione di Psa (Tabella 5.9); in particolare si è notata una perdita nella positività del saggio pari al

20%, infatti da “pianto” fresco è stato possibile identificare Psa nell’80% dei campioni, mentre dai “pianti” congelati è stato possibile confermare il risultato solo nel 60% dei campioni.

### **5.3.2.3. ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE MICROBIOLOGICA**

Gli isolamenti in piastra dai “pianti” prelevati sono stati eseguiti unicamente su substrato nutritivo e fatti crescere in termostato a  $23^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , si è scelto di operare piastrandolo diluizioni del campione di “pianto” fino a  $10^{-5}$  per poter effettuare un primo riconoscimento visivo delle colonie, da questa identificazione preliminare sono state individuate colonie riferibili a Psa in 5 campioni. Rispettivamente: 1 colonia dai campioni provenienti da Curicò; 2 colonie dai campioni provenienti da Chillan e ancora 2 colonie dai campioni provenienti da San Carlo (Tabella 5.8). Le purificazioni di queste colonie e l’analisi PCR-“nested” sulle colture pure hanno confermato l’identità di questi ceppi come Psa.

## **5.4. CONCLUSIONI**

I volumi dei “pianti” raccolti sono stati discreti e comunque sufficienti alle analisi microbiologiche e molecolari. L’efficienza della capacità di isolare microbiologicamente Psa paragonata a quella della sua individuazione mediante analisi molecolari è risultata mediamente compresa tra il 20% ed il 30% sia per i campioni analizzati in Italia che per quelli analizzati in Cile. Si ritiene quindi, nonostante il numero non altissimo di campioni analizzati, che la minore sensibilità del saggio microbiologico si possa attribuire alla maggiore sensibilità del saggio diagnostico di PCR-“nested”.

Non sono stati evidenziati vantaggi considerevoli nell’isolamento microbiologico dall’utilizzo del substrato semiselettivo rispetto a quello nutritivo, in Italia infatti solo al terzo prelievo in Emilia – Romagna si è potuto notare un suo effetto positivo. In Cile è stato adoperato unicamente il substrato nutritivo ed il risultato nella capacità di isolamento, comparato all’identificazione mediante saggio molecolare, è stato simile a quello ottenuto in Italia.

Dalle ripetizioni di saggi molecolari dei “pianti” conservati, è stata notata una perdita (intorno al 20%) nella capacità di individuare di Psa, probabilmente dovuta a condizioni di conservazione non ottimali e/o a degradazioni del materiale durante le

manipolazioni. Infine, la buona sensibilità del saggio PCR-“nested” è stata generalmente dimostrata in tutti i casi analizzati: in Italia, dove l’identificazione molecolare dei campioni positivi era già al di sopra del 50% con PCR diretta si è ottenuto un incremento medio del 15%; in Cile invece, dove l’identificazione molecolare mediante PCR diretta era inferiore, mediamente al di sotto del 25%, si è avuto un incremento medio nella capacità di identificazione di circa il 60%. E’ comunque interessante notare come questa differenza di capacità di individuazione del patogeno nel “pianto” sia concomitante con una fase epidemica ancora non violenta nelle regioni del Cile in cui l’indagine è stata effettuata.

Emerge una difficoltà comune nel riconoscimento microbiologico in piastra, riscontrata sia in Italia che in Cile. Questo punto indica la necessità della messa a punto di un metodo di isolamento più efficace di quello attualmente disponibile, in attesa di un substrato selettivo soddisfacente, il rispetto delle temperature di incubazione e le diluizioni seriali dei campioni di “pianto” sono risultate importanti per implementare l’identificazione microbiologica. E’ infatti noto che la sola identificazione molecolare è in grado di evidenziare la presenza del DNA del patogeno, ma non di verificarne la vitalità e quindi la potenzialità di diffondere ulteriormente l’infezione. I vantaggi dell’analisi PCR-“nested” risiedono nella sua rapidità e nella sua accuratezza anche in assenza di estrazione del DNA si è infatti riusciti a rilevare concentrazioni di Psa fino a  $10^2$  cellule/ml.

Il saggio molecolare riesce ad aumentare la sensibilità nel rilevamento di Psa, ma per affermare che il patogeno sia presente e vitale all’interno della pianta ospite non si può eludere l’isolamento in piastra. Il vero apporto allo studio diagnostico per l’identificazione di Psa da piante asintomatiche di questa ricerca, è stato riuscire ad individuare una finestra temporale abbastanza precisa basata sulla fisiologia del ciclo biologico della pianta in cui l’analisi risulta attendibile. Proprio la mancata raccolta di “pianto” nei primi prelievi è stata utile ad indicare il gradino precedente alla completa manifestazione del fenomeno, raggiunta infatti con i prelievi successivi. Dove già il fenomeno del “pianto”, per numero di piante analizzate, era al massimo (Veneto), si è notata una riduzione nel volume, segno dell’inizio della fase calante del fenomeno, rottura delle gemme.

In concomitanza all’andamento fisiologico, bisogna anche considerare la “fitness” delle popolazioni batteriche all’interno dell’ospite ed in particolare di Psa, che, parimenti a tutte le altre specie aumenta di concentrazione con l’avanzare del fenomeno del “pianto” e con la ripresa vegetativa dell’ospite; tant’è che il saggio molecolare



identifica un maggior numero di positivi nei rilievi successivi. La difficoltà nell'isolamento microbiologico, in parte superata dall'uso del substrato semiselettivo, è verosimilmente anche legata all'incremento della presenza di popolazioni microbiche endofite che mascherano e rendono difficoltoso l'isolamento del patogeno. Operativamente, è consigliabile effettuare la raccolta dei "piani" negli orari mattutini che antecedono i picchi giornalieri di calore, quando la traspirazione è al massimo, ed è molto importante centrare/non perdere la finestra della fenologia, che può durare 2/3 settimane; a tal proposito possono essere effettuati anche più rilievi successivi sin dall'inizio del fenomeno considerando che normalmente si ottengono raccolte più voluminose verso la fine del fenomeno e che verosimilmente la concentrazione di Psa aumenta all'interno della pianta-ospite con l'avvicinarsi alla ripresa vegetativa.

Casi di piante o campi colpiti dalla batteriosi sono ormai sempre più diffusi, ed i protocolli fitosanitari locali prevedono, dopo l'accertamento della presenza della malattia, l'eradicazione ed il corretto smaltimento di tutto il materiale infetto. Per limitare e prevenire la diffusione di Psa tra piante e tra campi attigui sono state introdotte diverse tipologie di azione volte al contenimento della malattia che si basano sul principio di isolare eventuali focolai, utilizzare strumentazioni sterili, abiti puliti e monouso e vasche di permanganato di potassio o soluzioni di cloro all'entrata/uscita di ogni campo. Queste metodiche di contenimento sono sicuramente efficaci, come i trattamenti rameici nelle diverse formulazioni o l'applicazione di altri composti chimici, ma non sono risolutive; riescono a contenere la malattia, almeno a livello sintomatologico (Quatrucci *et al.*, 2010; Scortichini *et al.*, 2014; Narouei *et al.*, 2014; Balestra *et al.*, 2014).

Identificare Psa in piante asintomatiche in campi non ancora colpiti dalla malattia ha un'importanza strategica nel ruolo preventivo e contenitivo del cancro batterico, impedendo lo sviluppo di nuovi pericolosi focolai. Data l'allarmante situazione epidemiologica entrambi i fronti: monitoraggio e prevenzione, sono indispensabili, il primo per contenere ed il secondo per contrastare la malattia. Il metodo proposto ha dimostrato la sua potenziale efficacia nella prevenzione, proponendosi come un reale mezzo per fronteggiare la diffusione della malattia ma trova difficoltà di impiego pratico per i costi e l'impreparazione del personale che si occupa del problema in campo anche di quello più specificamente dedito alla problematica.



## 6. CONCLUSIONI FINALI

*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), agente causale del cancro batterico dell'actinidia, è oggi riconosciuto a livello mondiale come il patogeno più dannoso per le piante di *Actinidia* spp. I suoi danni sono riscontrabili su tutti gli organi vegetativi e possono portare alla morte le piante in tempi rapidi, con gravi ripercussioni economiche (Serizawa *et al.*, 1989; Takikawa *et al.*, 1989; Green e Saunders, 2012). In alcuni paesi quali Giappone, Cina e Corea vengono utilizzati anche antibiotici per combattere questo batterio e questo fatto ha causato lo sviluppo di popolazioni di Psa antibiotico-resistenti (Nakajima *et al.*, 1995).

Parte dei danni agronomici ed economici, provocati da questa malattia sono da imputare alla scarsità delle conoscenze sul patosistema actinidia - *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. La recente epidemia mondiale ha portato ad una intensificazione delle ricerche ed all'acquisizione di conoscenze da parte della comunità scientifica in tempi brevissimi. D'altronde è ormai ritenuto generalmente che la diffusione epidemica della malattia sia stata determinata in parte dal commercio di materiale di propagazione vegetale non adeguatamente controllato che ne ha permesso una diffusione veloce ed efficiente (Mazzaglia *et al.*, 2010; Renzi *et al.*, 2012).

Obiettivo e scopo della tesi è stato quello di approfondire alcune conoscenze sull'epidemiologia della malattia, cercando di prendere in considerazione in maniera trasversale i diversi stadi di allevamento delle piante di actinidia ed indirizzando poi la ricerca anche sugli aspetti diagnostici nel materiale vegetale asintomatico in propagazione o in campo.

L'utilizzo in questi studi di un ceppo di batterio di riferimento marcato per le prove di inoculo sperimentale è stato di fondamentale importanza per verificare la capacità di questo patogeno di invadere in maniera sistemica la pianta colpita. Inoltre l'utilizzo di quanto disponibile in bibliografia su altri patosistemi in cui erano coinvolti patogeni batterici ha permesso di adattare modelli diagnostici e previsionali alle necessità della sperimentazione in oggetto.

Dagli studi sulla progressione dei cancri in piante adulte, è emerso un alto grado di patoadattamento ed è stato notato come Psa sia in grado di sopravvivere durante l'inverno e colonizzare poi attivamente i tessuti nella stagione vegetativa successiva causando infezioni locali a progressione basipeta, ed infezioni sistemiche in parti di fusto che rimangono asintomatiche (Minardi *et al.*, 2012b). Inoltre Psa non sembra

colonizzare l'apparato radicale, infatti anche se non sono stati effettuati studi specifici prove condotte nel corso degli studi hanno sempre confermato l'assenza del batterio a livello radicale.

Dal confronto dello stato di avanzamento della malattia con le temperature giornaliere e stagionali, è stato possibile definire che il comportamento policiclico della malattia è limitato da precisi "range" di temperatura, risultati che si vanno a sommare a quanto potuto osservare in merito alla ricerca di una finestra temporale ottimale per il prelievo dei "pianti", per l'identificazione di Psa da piante di actinidia asintomatiche.

Le indagini condotte su materiale micropropagato confermano inoltre le ipotesi che imputano ad una non-controllata diffusione di materiale infetto la diffusione della malattia. Tutto il materiale micropropagato o derivato da micropropagati inoculati sperimentalmente si è sempre mostrato totalmente asintomatico ma positivo per la presenza del patogeno. Questo fatto conferma la gravità dell'uso di materiale non controllato sanitariamente per propagazioni massali indicando come una normale via di commercializzazione possa rappresentare una reale fonte di dispersione della malattia.

Il fenomeno del "pianto" preso in considerazione per la diagnosi preventiva, oltre ad essersi dimostrato utile offre anche aspetti versatili non di poco conto ai fini delle gestione in laboratorio del materiale di indagine. Le recenti metodiche proposte basate sull'analisi delle gemme dei nuovi tralci per anticipare ancora l'identificazione di Psa, si è mostrato funzionale e valido, ma sicuramente è accompagnato da un procedimento decisamente più laborioso (G.M. Balestra, comunicazione personale; P. Minardi, dati non pubblicati).

La pratica comunemente impiegata nella diagnostica di Psa in laboratorio fa ricorso all'isolamento del batterio da lesioni fogliari o da essudati presenti in fusto e/o branche. Nel corso degli isolamenti microbiologici di controllo effettuati da essudati batterici biancastri e rossi da piante adulte di actinidia in campo, è emerso come questi differiscano nell'origine; infatti dagli isolamenti microbiologici da essudati biancastri, è stato notato come fosse forte la presenza di un vero e proprio consorzio di più specie batteriche dove però Psa non figurava; dai secondi invece si è ottenuto Psa praticamente in coltura pura.

Durante il corso degli isolamenti microbiologici in piastra, in tutte le prove effettuate, è comunque emersa la necessità di studiare un substrato di crescita selettivo per Psa che possa accelerare la fase di riconoscimento microbiologico in piastra ed escluda o almeno riduca l'eventualità di non-identificare Psa in casi in cui siano

presenti popolazioni microbiche ad alta densità nel campione come si verifica di solito con il progredire della stagione vegetativa (aprile-maggio).

La tecnica di PCR-“nested” messa a punto originariamente per il rilievo del patogeno dai “piani” è poi stata utilizzata routinariamente per l’identificazione di Psa, e si è dimostrata uno strumento utile per tutti gli aspetti di questa ricerca. L’efficacia e l’attendibilità di questo metodo sono sempre stati validati dai risultati coerenti ottenuti con gli altri metodi molecolari o microbiologici anche in diversi ambienti di coltivazione (Italia e Cile) ed in diverse matrici vegetali (campioni da germogli micropropagati, da piante adulte, da essudati e da “piani”).

La sperimentazione ha permesso di ottenere informazioni utilizzabili in campo e che potranno essere trasferite agli utilizzatori finali, agricoltori, per accelerare la rimozione tempestiva delle piante infette dagli impianti di actinidia e ridurre o meglio eliminare la commercializzazione di materiali micropropagati e non infetti da Psa.



## 7. APPENDICI

### Appendice 1

#### Preparazione dei substrati di crescita

##### KB (King *et al.*, 1954)

Preparazione substrato minimo KB per la produzione di pigmento fluorescente per 500 mL di substrato.

Proteasi Peptone n°3 (Difco).....	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,75 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O.....	0,75 g
Glicerina.....	4,05 mL
Bacto-Agar.....	7.5 g
H <sub>2</sub> O Bidistillata.....	500 mL

Sciogliere il tutto a vapore fluente per 15 min circa.

Regolare il pH del substrato liquido a 7,2 e quindi sterilizzare 15min a 1,2 atm (121°C).

Il substrato che si ottiene può presentare lieve torbidità e sul fondo delle beute può notarsi qualche grumo dovuto al proteasi peptone. Il substrato, a solidificazione avvenuta si presenta chiaro e limpido.

##### KBC(Mohan e Schaad, 1987)

Preparazione del substrato semiselettivo KBC, substrato semiselettivo per *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* per 500 mL di substrato.

Substrato KB.....	450 mL (autoclavato)
Acido borico 1,5%.....	1,5 g / 100 mL H <sub>2</sub> O (autoclavato)
Cycloheximide stock solution (Cyss)....	250 mg / 10 mL EtOH
Cephalexin stock solution (Cess).....	100 mg / H <sub>2</sub> O

Raffreddare KB ed acido borico (50°C), in 50 mL di acido borico 1,5% aggiungere per filtrazione sterile (con filtro 0,22 µm) 4 mL di Cyss + 4 mL di Cess. Aggiungere il tutto ai 450 mL di KB, miscelare bene e versare.

##### KBC + Km<sup>50</sup> + Rif<sup>50</sup>:

Substrato selettivo per il ceppo di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Psa8404. (P. Minardi, dati non pubblicati).

Kanamicina soluzione stock .....	500 mg / mL H <sub>2</sub> O
----------------------------------	------------------------------

Rifampicina soluzione stock.... 500 mg / mL CH<sub>3</sub>OH

Aggiungere a 500 mL di KBC 500 µL di ogni soluzione stock, agitare e versare.

Indossare i d.p.i. necessari.

#### **NSA:**

Preparazione del substrato nutritivo NSA (Garret *et al.*, 1966; Schaad *et al.*, 2001) per 500 mL di substrato.

Bacto-Nutrient Broth.....4 g

Saccarosio.....25 g

Bacto-Agar.....7,5 g

Sciogliere a vapore fluente per 15 min. Regolare il pH del substrato liquido a 7,0 e quindi sterilizzare 15min a 1,2 atm (121°C). Il substrato a solidificazione avvenuta si presenta limpido e di una colorazione tendente al giallo.

#### **NSA-SAM (Mohan & Schaad, 1987)**

Quantitativi per 500 mL di substrato:

Substrato NSA.....450 mL (autoclavato)

Acido borico 1,5%..... 1,5 g / 100 mL H<sub>2</sub>O (autoclavato)

Cycloheximide soluzione stock (Cyss).... 250 mg / 10 mL EtOh

Cephalexin soluzione stock (Cess)..... 100 mg / H<sub>2</sub>O

Raffreddare KB e acido borico (50°C), in 50 mL di acido borico 1,5% aggiungere per filtrazione sterile (con filtro 0,22 µm) 4 mL di Cyss + 4 mL di Cess. Aggiungere il tutto ai 450 mL di NSA, miscelare bene e versare.

#### **NSA + Rif<sup>50</sup> :**

Substrato selettivo per il ceppo di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Psa8404. (P. Minardi, dati non pubblicati).

Rifampicina soluzione stock... .500 mg / mL CH<sub>3</sub>OH

Aggiungere a 500 mL di substrato NSA, 500 µL di soluzione stock di rifampicina, agitare e versare. Indossare i d.p.i. necessari.



## Appendice 2

### Preparazione tamponi:

**Tampone TAE** per 1 litro di soluzione 50 X:

Tris 0.04M.....242 mg

NaEDTA 0,5M pH 8.0.....100 mL

Acido acetico glaciale.....57,1 mL

H<sub>2</sub>O.....1 L

**Tampone di lavaggio PBS** per 1 Litro di soluzione 10 X:

NaCl.....8,5 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O.....1,6 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O.....0,137 g

H<sub>2</sub>O.....1 L

Aggiungere Tween 0,1% (Merck). Misurare il pH e calibrare a 7,4.



## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abelleira Argibay A.A., Lopez M.M., Penalver Navarro J., Casal O.A., Mansilla Vazquez J.P., Montoussé A.P. (2011). First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Spain. *Plant Pathology*, 63: 691-699.
- Alfano J.R., Collmer A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 385-414.
- Anconelli S., Mannini P., Rossi F., Facini O. (2009). Come gestire l'irrigazione per risparmiare acqua. *Speciale KIWI CRPV*: 35-37.
- Antoniaci L., Solmi P., Tommasini M.G. (2013). Batteriosi dell'actinidia, una minaccia incombente. *Agricoltura*, 4: 60-61.
- Armentano G. (2011). Batteriosi del kiwi, via libera al rame in vegetazione. *L'informatore Agrario*, 23: 11.
- Ark P.A. (1944). Pollen as a source of walnut bacterial blight infections. *Phytopathology*, 34: 330-334.
- Balestra G.M., Varvaro L. (1997). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of disease on floral buds of *Actinidia deliciosa* (A. Chev) Liang et Ferguson in Italy. *Journal of Phytopathology*, 145: 375-378.
- Balestra G.M., Varvaro L. (1998). Seasonal fluctuations in kiwifruit phyllosphere and ice nucleation activity of *Pseudomonas viridiflava*. *Journal of Plant Pathology*, 80: 151-156.
- Balestra G.M., Renzi M., Mazzaglia A. (2010). First report of bacterial canker of *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Portugal. *New Disease Reports*, 22: 10.
- Balestra G.M., Renzi M., Mazzaglia A. (2011). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit plants in Spain. *New Disease Reports*, 24: 10.
- Balestra G.M., Taratufolo M.C., Vinatzer B.A., Mazzaglia A. (2013). A multiplex PCR assay for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and differentiation of populations with different geographic origin. *Plant Disease*, 97: 472-478.

- Balestra G.M. (2014). Batteriosi del kiwi: previsioni di una sua diffusione su scala mondiale. *Fresh Plaza*, 17/02/2014, articolo 61636.
- Balestra G.M., Gallipoli L., Tagliavento V., Anselmi A., Ercolani A., Renzi M., Mariotti E., Ciarroni S., Mazzaglia A. (2014). Cancro batterico del kiwi: strategie di convivenza. *L'informatore Agrario*, 22: 50-53.
- Bastas K.K., Karakaya A. (2012). First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Turkey. *Plant Disease*, 96: 452.
- Baudry A., Morzières J.P., Poillon P. (1993). *Actinidia deliciosa*, dépérissements, pourritures racinaires et *Phytophthora*. *Phytoma La Defence des Vegetaux*, 446: 44-47.
- Bertaccini A., Paltrinieri S., Lucchese C., Biondi E., Piergiacomi M., Ardizzi S., Galeone A., Contaldo N., Minardi P. (2011). Possibile influenza di fitoplasmi sul cancro batterico del kiwi. *L'Informatore Agrario*, 32: 63-65.
- Biondi E., Galeone A., Kuzmanovic N., Ardizzi S., Lucchese C., Bertaccini A. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* detection in kiwifruit plant tissue and bleeding sap. *Annals of Applied Biology*, 162: 60-70.
- Biondi E., Mucini S., Lucchese C., Ladurner E., Benuzzi M., Minardi P., Mazzucchi U. (2010). Activity of the microbial control agent *Bacillus subtilis* strain QST 713 against bacterial canker of kiwifruit. *Journal of Plant Pathology*, 92 (4): S4.74.
- Block A., Alfano J.R. (2011). Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Current Opinion in Microbiology* 14: 39-46.
- Blouin A.G., Pearson M.N., Chavan R.R., Woo E.N.Y., Lebas B.S.M., Veerakone S., Ratti C., Biccheri R., MacDiarmid R.M., Cohen D. (2013). Viruses of kiwifruit (*Actinidia* species). *Journal of Plant Pathology*, 94: 221-235.
- Bori M.V., Morone C., Vittone G. (2011). Supplemento a *Coldiretti Informa* n. 13 Nota tecnica Regione Piemonte, 23 pp.
- Bravetti M., Polverigiani S., Neri D. (2014). Reti antigrandine fotoselettive per l'actinidia. *Kiwi informa*, 10 (7-9): 18-26.
- Cameron H.R. (1970). *Pseudomonas* content of cherry trees. *Phytopathology*, 60: 1343-1346.
- Cristinzio G., Iannini C. (1996). Segnalazione di *Phytophthora cryptogea* su actinidia nell'Italia meridionale. *Petria*, 6: 177-181.
- Chevrot R., Rosen R., Haudecoeur E., Cirou A., Shelp B.J., Ron E., Faure D. (2006). GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 103 (19): 7460-7464.

- Cooksey D.A.(1993). Copper uptake and resistance in bacteria. *Molecular Microbiology*, 7(1): 1-5
- CSO. (2009). Analisi della base catastale dei soci del CSO al dicembre 2008 e proiezioni degli impianti in piena produzione al dicembre 2011: 69-78.
- CSO. (2014). I consumi di kiwi. Report 2013. [http://www.csoservizi.com/dettagli\\_documento.php?id=2497](http://www.csoservizi.com/dettagli_documento.php?id=2497)
- Cunnac S., Lindeberg M., Collmer A. (2009). *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Current Opinion in Microbiology*, 12 (1): 53-60.
- Danhorn T. Fuqua C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61: 401-422.
- Davison R.M. (1990). The physiology of the kiwifruit vine. *Kiwifruit science and management*. Auckland, Ray Richards ed. pp: 127-154.
- De Boer S.H., Ward L.J., Li X., Chittaranjan S. (1995). Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. *Nucleic Acids Research*, 23: 2567-2568.
- Dulla GF1, Krasileva KV e Lindow SE. (2010). Interference of *quorum sensing* in *Pseudomonas syringae* by bacterial epiphytes that limit iron availability. *Environmental Microbiology*, 12(6): 1762-74.
- EPPO (2010). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* bacterial canker of kiwifruit. *European Plant Protection Organisation Reporting Service*, 10: 188.
- EPPO (2011a). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Chile, *European Plant Protection Organisation Reporting Service*, 3: 55.
- EPPO (2011b). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Switzerland. *European Plant Protection Organisation Reporting Service*, 8: 168.
- EPPO (2011c). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Australia, *European Plant Protection Organisation Reporting Service*, 6: 130.
- EPPO (2012). Final pest risk analysis for *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. EPPO, Paris. 12-18034 - EPPO.int.
- EPPO (2013). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Germany, *European Plant Protection Organisation Reporting Service*, 9: 185.
- EPPO (2014). PM 7/120 (1). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *European Plant Protection Organisation Bulletin*, 44 (3): 360-375.
- Erwin D.C., Ribeiro O.K. (1996). *Phytophthora* Diseases Worldwide. *The American Phytopathological Society*, 562 pp.

- Everett K.R., Taylor R.K., Romberg M.K., Rees-George J., Fullerton R.A. (2011). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes*, 6 (1): 67-71.
- Everett K.R., Cohen D., Pushparajah I.P.S., Vergara M.J., Curtis C.L., Larsen N.J., Jia Y. (2012). Heat treatments to kill *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on contaminated pollen. *New Zealand Plant Protection*, 65: 8-18.
- Fabbri A., Lisetti M., Benelli C. (1991). Studies on flower induction in kiwi. *Acta Horticulturae*, 297: 217-222.
- Fang Y., Zhu X., Wang Y. (1990). Preliminary studies on kiwifruit diseases in Hunan Province. *Sichuan Fruit Science and Technology*, 18: 28-29.
- Ferguson A.R. (1984). Kiwifruit: a botanical review. *Horticultural Reviews*. 6: 1-64.
- Ferguson A.R. (2004). 1904-the year that kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) came to New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 32: 3-27.
- Ferrante P., Scortichini M. (2009). Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. *Journal of Phytopathology*, 157: 768-70.
- Ferrante P., Scortichini M. (2010). Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathology*, 59: 954-962.
- Ferrante P., Scortichini M. (2013). Frost promotes the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* plants. *Plant Pathology*, 63: 12-9.
- Ferrante P., Scortichini M. (2015). Redefining the global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* based on pathogenic, molecular and phenotypic characteristics. *Plant Pathology*, 64: 51-62.
- Fratarcangeli L., Rossetti A., Mazzaglia A., Balestra G.M. (2010). Il ruolo del rame nella lotta al cancro batterico del Kiwi. *L'Informatore Agrario*, 8: 52-56.
- Gallelli A., L'Aurora A., Loreti S. (2011). Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols. *Journal of Plant Pathology*, 93: 425-435.
- Garcin A, El-Maataoui M, Tichadou S, Prunet J.P, Ginibre T, Penet C. (2001). Walnut blight, new knowledge for an old disease: summary of research (1995-2000). *Infos-Ctifl*, 171: 27-30.

- Gardan L., Shafik H., Belouin S., Broch R., Grimont F., Grimont P.A.D. (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal Systematic. Bacteriology*, 49: 469-478.
- Garret C.M.E, Panagopoulos C.G., Crosse J.E. (1966). Comparison of plant pathogenic pseudomonads from fruit trees. *Journal of Applied Bacteriology*, 29(2): 342-356.
- Gazzetta n. 69 del 25 marzo 2011 Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali DECRETO 7 febbraio 2011 Misure di emergenza per la prevenzione, il controllo o l'eradicazione del cancro batterico dell'actinidia causato da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.
- Grant A.J., Ryugo K. (1982). Influence of developing shoots on flowering potential of dormant buds of *Actinidia chinensis*, *HortScience* 17: 977-978.
- Grant S.R., Fisher E.J., Chang J.H., Mole B.M., Dangl J.L. (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60: 425-449.
- Green G., Saunders C. (2012). The Costs of Psa-V to the New Zealand Kiwifruit Industry and the Wider Community. *Report to Kiwifruit Vine Health*, pag. 75.
- Han H.S, Nam H.J., Koh Y.J., Hur J.S., Jung J.S. (2003). Molecular bases of high-level streptomycin resistance in *Pseudomonas marginalis* and *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 16-21.
- Hartmann A., Schikora A. (2012). Quorum sensing of bacteria and trans-kingdom interactions of *N-acyl* homoserine lactones with eukaryotes. *Journal of Chemical Ecology*, 38 (6): 704-713.
- Hartmann A., Rothballer M., Hense B.A., Schröder P. (2014). Bacterial *quorum sensing* compounds are important modulators of microbe-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5: 131.
- Hirano S.S., Uppur C.D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3): 624-653.
- Horst K. (2008) Plant diseases and their pathogens. In *Westcott's Plant Disease Handbook 7<sup>th</sup> edition* 482. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hsieh T.Y., Ku S.M., Chien C.T., Liou Y.T. (2011). Classifier modeling and numerical taxonomy of *Actinidia* (*Actinidiaceae*) in Taiwan. *Botanical Studies*, 52: 337-357.

- King E.O., Raney M.K., Ward D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301-307.
- Koh Y.J., Cha B.J., Chung H.J., Lee D.H. (1994). Outbreak and spread of bacterial canker of kiwifruit. *Korean Journal of Plant Pathology*, 10: 68-72.
- Koh J.K., Nou I.S. (2002). DNA markers for the identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Molecules and Cells*, 13: 309-314.
- Kurbetli I., Sirel O. (2013). Occurrence of *Phytophthora* root and stem rot of kiwifruit in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 161: 887-889.
- Latorre B.A., Alvarez C., Ribeiro O.K. (1991). *Phytophthora* root rot of kiwifruit in Chile. *Plant Disease*, 75: 949-952.
- Lee Y.H., Jee H.J., Cha K.H., Ko S.J., Park K.B. (2001). Occurrence of *Phytophthora* root rot on kiwifruit in Korea. *Journal of Plant Pathology*, 17: 154-158.
- Lee J.H., Kim J.H., Kim G.H., Jung J.S., Hur J.S., Koh Y.J. (2005). Comparative analysis of Korean and Japanese strains of *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit. *Journal of Plant Pathology*, 21: 119-126.
- Li J.Q., Li X.W., Soejarto D.D. (2007). *Actinidiaceae*. *Flora of China*, 12: 334-355.
- Lindley J. (1836). An introduction to the natural system of botany. II Ed. 439 pp.
- Lindow S.E. (1995). Control of epiphytic ice nucleation-active bacteria for management of plant frost injury. *Biological ice nucleation and its applications*, pp. 239-256, in: Lee R.E., Warren G.J. e Gusta L.V. (Ed.), *APS Press*, St. Paul, Minnesota.
- Loreti S., Pucci N., Gallelli A., Minardi P., Ardizzi S., Balestra G.M., Mazzaglia A., Taratufolo M.C. (2014). The Italian inter-laboratory study on the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytopathologia Mediterranea*, 53 (1): 159-167.
- Ma W., Dong F.F.T, Stavrinides J., Guttman D.S. (2006) Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. *PLOS Genetics*, 2 (12): 2131-2142.
- Marcelletti S., Ferrante P., Petriccione M., Firrao G., Scortichini M. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* draft genomes comparison reveal strain-specific features involved in adaptation and virulence to *Actinidia* species. *PLoS ONE*, 6 (11): e27297.
- Marzachi C., Alma A., D'Aquilo M., Minuto G., Boccardo G. (1999). Detection and identification of phytoplasma infecting cultivated and wild plants in Liguria (Italian Riviera). *Journal of Plant Pathology*, 81: 127-136.



- Mazzaglia A., Renzi M., Taratufolo M.C., Gallipoli L., Bernardino R., Ricci L., Quattrucci A., Rossetti A., Balestra M.G. (2010). Il cancro batterico dell'actinidia: il punto della situazione in Italia. *Frutticoltura*, 72(9): 66-76.
- Mazzucchi U., Mazzucchi A. (2013a). Moria del kiwi nel veronese: come riconoscere attacchi di fitoftore alle radici. *FreshPlaza*, 05/12/2013: 59809.
- Mazzucchi U., Mazzucchi A. (2013b). Nota di aggiornamento sulla moria del kiwi in provincia di Verona. *FreshPlaza*, 21/11/2013: 59354.
- Mazzucchi U., Tacconi G., Tosi L., Mejia J.F., Favaron F., Giacomini A., Bertaiola F., Paltrinieri S., Bertaccini A. (2014). A kiwifruit dieback in Verona province. In: *XX Congresso Nazionale SIPaV* "Environmentally loyal plant protection: from nano to field-scale". Pisa, 22-24 settembre: 73.
- McCann H.C., Guttman D.S. (2008). Evolution of type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytologist*, 177 (1): 33-47.
- Minardi P., Mazzucchi U. (1996). Natura e ruolo delle arpine nelle interazioni piante-batteri fitopatogeni. *Petria*, 6 (3): 241-242.
- Minardi P. (2010) Relazione finale del responsabile scientifico sull'attività 2010 dell'Unità Operativa 4, Progetto di Ricerca sul "Cancro batterico dell'actinidia (*P. syringae* pv. *actinidiae*): messa a punto di strategie di difesa" finanziato dalla Regione Emilia Romagna (2009-11).
- Minardi P., Lucchese C., Ardizzi S., Mazzucchi U. (2011). Evidence against the presence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in fruits of *Actinidia* orchards affected by bacterial canker in Emilia-Romagna region. *Journal of Plant Pathology*, 93 (4, Suppl.): S4-43.
- Minardi P., Ardizzi S., Lucchese C., Mazzucchi U. (2012a). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: colonizzazione della pianta. *Kiwi Informa*, (1-3) : 21-25.
- Minardi P., Ardizzi S., Lucchese C., Mazzucchi U. (2012b). Two-year endophytic colonization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in adult plants of *Actinidia chinensis* cv. Hort16A. *Journal of Plant Pathology*, 94 (4, Suppl.): S4.49.
- Minardi P., Ardizzi S., Lucchese C., Bertaccini A. (2012c). Micropropagation of kiwifruit: one-year endophytic colonization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in shoots of *Actinidia deliciosa* cv. Hayward. *Journal of Plant Pathology*, 94 (4, Suppl.): S4.70.
- Minardi P., Ardizzi S., Lucchese C. (2013). Pluriannual latency of a *gfp*-marked *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in *Actinidia chinensis* adult plants. *Journal of Plant Pathology*, 95 (4, Suppl.): S4-52.

- Minardi P., Ardizzi S., Bertaccini A. (2014a). Spread of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit orchards: epidemiological role of the buds”. In: *XX Congresso Nazionale SIPaV* “Environmentally loyal plant protection: from nano to field-scale”. Pisa, 22-24 settembre: 73.
- Minardi P., Ardizzi S., Lucchese C., Bertaccini A. (2014b). Host-pathogen interaction in *Actinidia*-bacterial canker pathosystem: investigation on the latency period in asymptomatic plants. In: *XX Congresso Nazionale SIPaV* “Environmentally loyal plant protection: from nano- to field-scale”. Pisa, 22-24 settembre: 36.
- Ministero della Salute. Decreto dirigenziale 27 Novembre 2014. [http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=1110&area=fitosanitari&menu=autorizzazioni](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=1110&area=fitosanitari&menu=autorizzazioni).
- Ministry of Agriculture, Forestry New Zealand (2011). Psa-pathway tracing report. <http://www.biosecurity.govt.nz/files/pests-and-diseases/psa-tracing-report.pdf>.
- Mohan S.K., Schaad N.W. (1987). An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathology*, 77 (10): 1390-1395.
- Morris C.E., Monier J.M. (2003). The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 429-453.
- Mucini S., Biondi E., Lucchese C., Mazzucchi U., Minardi P. (2011). Bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia* spp.): preliminary bacteriological studies in asymptomatic plant materials in Northeastern Italy. *Acta Horticulturae*, 913: 509-516.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Musa A.R., Minardi P., Mazzucchi U. (2001). Identification and expression of the *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* *hrpz<sub>psa</sub>* gene which encodes an harpin elicitor. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 79 (1): 61-71.
- Nakajima M., Yamashita S., Takikawa Y., Tsuyumu S., Hibi T., Goto M. (1995). Similarity of streptomycin resistance gene(s) in *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* with strA and strB of plasmid RSF1010. *Annals of Phytopathological society of Japan*, 61: 489-492.
- Nakajima M., Goto M, Hibi T. (2002). Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*. *Journal of General Plant Pathology*, 68: 68-74

- Narouei Khandan H.A., Worner S.P., Jones E.E., Villjanen-Rollinson S.L.H., Gallipoli L, Mazzaglia A., Balestra G.M. (2014). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa): metodi previsionali della sua potenziale distribuzione. *Frutticoltura*, 1/2: 22-29.
- Neilands J.B. (1995). Siderophores-structure and functions of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 26723-26726.
- Opgenorth D.C., Lai M., Sorrell M., White J.B. (1983). Pseudomonas canker of kiwifruit. *Plant Disease*, 67: 1283-1284.
- Pallen M.J., Wren B.W. (2007). Bacterial pathogenomics. *Nature*, 449: 835-842.
- Palma B.A., Jackson D.I. (1981). Effect of temperature on flower initiation in grapes. *Botanical Gazette*, 142: 490-493.
- Parsek M.R., Greenberg E.P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between *quorum sensing* and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13 (1): 27-33.
- Pietropoli N. (2004). Actinidia. Impollinazione ed accrescimento del frutto. *Edizione Fiorini*, 164 pp.
- Polito V.S., Grant J.A. (1984). Initiation and development of pistillate flowers in *Actinidia chinensis*, *Scientia Horticulturae*, 22: 365-371.
- Quattrucci A., Renzi M., Rossetti A., Ricci L., Taratufolo M.C., Mazzaglia A., Balestra G.M. (2010). Cancro batterico del kiwi verde: nuove strategie di controllo. *L'informatore Agrario*, 16: 53-58.
- Quoirin M., Lepoivre P. (1977). Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae*, 78: 437-442.
- Rees-George J., Vanneste J.L., Cornish D.A., Pushparajah I.P.S., Yu J., Templeton M.D., Everett K.R. (2010). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S–23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathology*, 59 (3): 453-464.
- Regione Emilia Romagna - Disciplinari di produzione integrata 2014. Norme tecniche di coltura – Actinidia. [http://agricoltura.regione.emilia-romagna.it/produzioni-agroalimentari/doc/disciplinari/produzione-integrata/Collezione-dpi/dpi\\_2014/norme/NDC\\_2014\\_Actinidia.pdf/at\\_download/file/NDC\\_2014\\_Actinidia.pdf](http://agricoltura.regione.emilia-romagna.it/produzioni-agroalimentari/doc/disciplinari/produzione-integrata/Collezione-dpi/dpi_2014/norme/NDC_2014_Actinidia.pdf/at_download/file/NDC_2014_Actinidia.pdf).
- Reinhold-Hurek B., Hurek T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14 (4): 435-443.

- Renzi M., Copini P., Taddei A.R., Rossetti A., Gallipoli L., Mazzaglia A., Balestra G.M. (2012). Bacterial canker on kiwifruit in Italy: Anatomical changes in the wood and in the primary infection sites. *Phytopathology*, 102: 827-840.
- Revilla M.A., Rey M.A., Gonzalez-Rio F., Gonzalez M.V., Diaz-Sala C., Rodriguez R. (1992). Micropropagation of Kiwi (*Actinidia* spp.). *High-Tech and Micropropagation II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 18: 399-423.
- Rohmer L., David S. Guttman D.S., Dangl J.L. (2004). Diverse evolutionary mechanisms shape the Type III effector virulence factor repertoire. *Plant pathogen Pseudomonas syringae. Genetics*, 167 (3): 1341-1360.
- Rossetti A., Balestra G.M. (2008). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on kiwifruit plants: Epidemiological traits and its control. *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens, *Epidemiology and Genomics*: 65-68.
- Rossetti A., Fratarcangeli L., Mazzaglia A., Quattrucci A., Renzi M., Ricci L., Gallipoli L., Balestra G.M. (2009). Caratteristiche e diffusione dei batteri fitopatogeni su actinidia. *Italus Hortus*, 16 (5): 136-138.
- SAG. (2011). First report of bacterial canker of kiwifruit in Chile. Government of Chile. [http://www.cooperativa.cl/sag-prepara-plan-decontingencia-tras-deteccion-de-enfermedad-del-kiwi-en-chile/prontus\\_notas/2011-03-22/093651.html](http://www.cooperativa.cl/sag-prepara-plan-decontingencia-tras-deteccion-de-enfermedad-del-kiwi-en-chile/prontus_notas/2011-03-22/093651.html).
- Schaad N., Jones J.B., Chun W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. *APS Press, St. Paul, Minnesota, USA*.
- Scortichini M. (1994). Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidia* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology*, 43: 1035-1038.
- Scortichini M., Marcelletti S., Ferrante P., Petriccione M., Firrao G. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging multi-faceted, pandemic pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 13 (7): 631-40.
- Scortichini M., Marocchi F., Mastroleo M. (2014). Cancro batterico del kiwi: è possibile la convivenza. *L'informatore Agrario*, 17: 42-44.
- Serizawa S., Ichikawa T., Takikawa Y., Tsuyumu S., Goto M.(1989). Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan: description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 55: 427-436.
- Serizawa S., Ichikawa T. (1993a). Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. The seasonal changes of bacterial population in lesions and of its exudation from lesions. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 59: 469-476.

- Serizawa S., Ichikawa T. (1993b). Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. The most suitable times and environments for infection on new canes. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 59: 460-468.
- Serizawa S., Ichikawa T. (1993c). Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. Infection and bacterial movement in tissue of new canes. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 59: 452-459.
- Silby M.W., Winstanley C., Godfrey S.A., Levy S.B., Jackson R.W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4): 652-680.
- Snelgar W.P., Manson P.J. (1992). Determination of the time of floral evocation in kiwifruit vines. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 20 (4): 439-447.
- Soloz M., Abicht H., Mermod M., Mancini S. (2010). Response of Gram-positive bacteria to copper stress. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15: 3-14.
- Stavrinos J., McCann H.C., Guttman D.S. (2008). Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors. *Cellular Microbiology*, 10 (2): 285-292.
- Taconi G., Mejia J.F., Tosi L., Mazzucchi U., Favaron F., Giacomini A., Bertaiola F., Paltrinieri S., Perez Fuentealba S., Bertaccini A. (2014). Vine decline in kiwifruit: a phytosanitary emergency in the province of Verona (Northern Italy) climate change and effect on waterlogging and *Phytophthora* in North Italy. The 8th International symposium on kiwifruit & Chengdu kiwifruit festival, CHengdu (China), 18-22, September: 87.
- Taheri M., Mirabolfathy M., Rahnama, K. (2012). *Phytophthora* root and crown rot disease agents of some important crops in Gorgan region. Iran. *Journal of Plant Pathology*, 48: 154-174.
- Takikawa Y., Serizawa S., Ichikawa T., Tsuyumu S., Goto M. (1989). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: The causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 55: 437-444.
- Testolin R., Crivello V. (1987). Il kiwi e il suo mondo. (Kiwifruit and its world). IRIPA Quadrifoglio. Mestre-VE, Italy.
- Testolin R., Ferguson A.R. (2009). Kiwifruit (*Actinidia* spp.) production and marketing in Italy. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37: 1-32.
- Tomasone R., Pagano M., Ferrante P., Scortichini M. (2014). Cancro batterico del kiwi: meno inoculo con il pirodiserbo. *L'Informatore Agrario*, 44: 48-51.

- Tontou R., Giovanardi D., Stefani E. (2014). Pollen as a possible pathway for the dissemination of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and bacterial canker of kiwifruit. *Phytopathologia Mediterranea*, 53: 333-9.
- Vanneste J.L., Poliakoff F., Audusseau C., Cornish D.A., Paillard S. (2011a). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in France. *Plant Disease*, 95: 131.
- Vanneste J.L., Giovanardi D., Yu J., Cornish D.A., Kay C., Spinelli F., Stefani E. (2011b). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit pollen samples. *New Zealand Plant Protection*, 64: 246-251.
- Vinatzer B.A., Mazzaglia A. (2013). A multiplex PCR assay for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and differentiation of populations with different geographic origin. *Plant Disease*, 97: 472-8.
- von Bodman S.B., Bauer W.D., Coplin D.L. (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 41:455-82.
- Wang C., Yan, C., Fuqua C., Zhang L-H. (2014). Identification and characterization of a second *quorum-sensing* system in *Agrobacterium tumefaciens* A6. *Journal of Bacteriology*, 196 (7): 1403-1411.
- Young J.M. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. *Journal of Plant Pathology*, 94 (1): S1.5-S1.10.
- Zaviezo T., Latore B.A., Torres R. (1993). Effectiveness of three phenylamide fungicides against *Phytophthora cryptogea* isolated from kiwi and their mobility in soil. *Plant Disease*, 77: 1239-1243.
- Zhu X.X., Fang Y.Z., Liao X.G. (1993). Study on the pathogen of bacterial canker of kiwifruit. *Agricultural Science and Technology*, 6: 31-33.