

“La moria del kiwi – Approfondimento sull’eziologia e strumenti di prevenzione e difesa” – KIRIS

Seconda annualità

Il progetto KIRIS è stato proposto con l'intenzione di individuare le cause che portano alla comparsa del fenomeno della “moria del kiwi” e definire le misure necessarie a contrastarne la diffusione. I risultati ottenuti dall'indagine del progetto KIMOR (2017-2019) hanno ulteriormente confermato come la moria del kiwi sia diffusa in gran parte del Piemonte e poche limitate aree siano ancora indenni. Infatti l'actinidicoltura piemontese, da cinque anni a questa parte, è gravemente compromessa dalla “moria del kiwi” la quale sta determinando il progressivo declino della coltura.

Il secondo anno di attività del **sottoprogetto 1- Attività di monitoraggio territoriale** è continuato tramite campionamenti fogliari e di suolo negli actinidiati selezionati il primo anno come caso studio e nello specifico 10 actinidiati sani ovvero che non mostravano sintomi di moria e 10 malati, in cui i sintomi della moria erano evidenti. I campionamenti eseguiti in 3 diverse tempistiche, giugno, luglio e settembre, sono stati successivamente conferiti ai laboratori del Settore Fitosanitario per le determinazioni analitiche.

L'analisi fogliare ha preso in considerazione sia macro sia microelementi mentre riguardo il suolo è stata eseguita un'indagine specifica sulla soluzione circolante (analisi dell'estratto acquoso). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di meglio comprendere la disponibilità dei nutrienti nel suolo nel corso della stagione vegetativa e la capacità della pianta di assorbirli. Il confronto tra actinidiati sani e colpiti ha consentito di osservare alcune differenze, quali:

- Analisi estratto acquoso del suolo: valori minori di NO_3^- , Mg^{++} e K^+ rilevati negli actinidiati sani sono presumibilmente da attribuire ad un maggiore utilizzo dei composti da parte delle piante e che questo avvenga in misura minore nelle piante colpite da moria, giustificando i valori medi più alti.
- Analisi fogliare: il contenuto di Ca^{2+} è stato rilevato più basso nelle piante malate e più alto in quelle sane. Questo potrebbe essere attribuito alla riduzione dell'attività di trasporto xilematico in quelle malate e quindi in una minore traslocazione dell'elemento.

Monitoraggio meteorologico e dello stato idrico del terreno

Il monitoraggio meteorologico è continuato anche nel secondo anno di progetto grazie alla capannina meteo della società METOS installata nel 2020 nel campo sperimentale portinnesti di Saluzzo (CN). Attraverso i tensiometri Watermark collegati alla capannina, posizionati su una fila baulata a 4 diverse profondità: 10cm, 20cm, 30cm, 40cm, è stato rilevato il monitoraggio del potenziale idrico del suolo. che ha permesso di programmare le irrigazioni in modo oculato e senza eccessi.

Nel secondo anno di progetto è stato altresì realizzato uno studio per meglio comprendere l'incidenza dello stress da deficit di pressione di vapore (VPD) sulla coltura del kiwi. Questo parametro atmosferico misura il potere disidratante dell'aria nel periodo estivo. Le recenti variazioni climatiche hanno determinato non solo un aumento delle temperature ma un altrettanto incremento del VPD che talvolta raggiunge valori così elevati da compromettere il sistema xilematico delle piante. Confrontando l'aumento del VPD con la produzione media a ettaro (q/ha) rilevata in 4 aziende dal 2013 al 2020 è stato possibile osservare un calo produttivo per ettaro che segue le annate in cui si è avuto un aumento più significativo del VPD, tuttavia, con almeno due anni di

ritardo. Sembra perciò più ragionevole considerare il calo di produzione un effetto indiretto dovuto al progressivo aumento delle piante colpite piuttosto che un effetto diretto dovuto all'incremento di questo parametro.

Linee di ricerca

Attività 1.2- Allestimento e gestione di due actinidi sperimentali

Nel corso del secondo anno di sperimentazione sono continuati i lavori per la valutazione di pratiche agronomiche alternative (irrigazione sovrachioma e reti ombreggianti) e nuovi portinnesti (Bounty 71 e Z1) utili a limitare l'insorgere della moria del kiwi.

Reti multifunzionali e sovrairrigazione (irrigazione climatizzante) sono state valutate nel campo sperimentale allestito presso la Fondazione Agrion mentre i portinnesti nel campo sperimentale di Saluzzo.

A Manta, sono stati impiegati sensori che rilevano il PAR (Photosynthetically Active Radiation) al fine di capire le differenze di ombreggio determinato dai diversi tipi di copertura in sperimentazione: rete nera. Rete fotoselettiva giallo-nera e telo plastico.

Dai dati registrati mediante i sensori PAR è emerso la possibilità di ridurre gli stress foto-ossidativi delle foglie con l'impiego di schermature ombreggianti. Nel caso del telo plastico i valori di ombreggiamento sono risultati più rilevanti, tuttavia, dal punto di vista pratico il suo impiego comporta costi iniziali d'investimento più elevati e va anche considerata una gestione più complessa rispetto alla rete antigrandine.

Anche nella prova irrigazione climatizzante sono stati ottenuti risultati incoraggianti: il mantenimento di un microclima più idoneo alla coltura del kiwi, in particolare in corrispondenza delle più significative ondate di calore, ha favorito la crescita delle piante interessate.

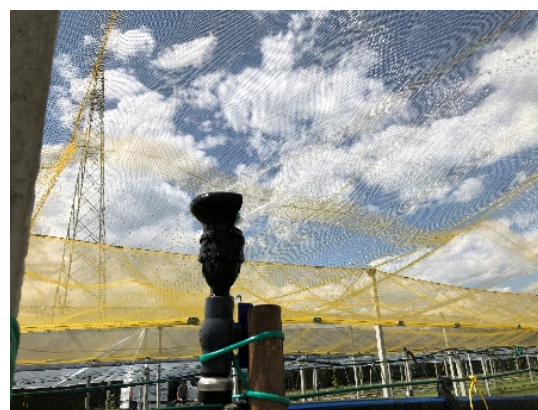


Figura 1 Impianto irrigazione sovrachioma presso il centro Agrion

Riguardo i portinnesti, la valutazione è stata realizzata effettuando rilievi durante la stagione vegetativa sull'accrescimento del tronco e sulla % di mortalità. Il p.i. Bounty 71 ha mostrato nel punto di innesto un attecchimento limitato perciò le piante verranno reimpiantate nella primavera 2022, complice anche l'effetto negativo dell'intensa gelata nera del 7-8 aprile 2021.

Valutazione impiego di prodotti al suolo

L'attività in questione è continuata nel secondo anno di progetto nel campo sperimentale di Saluzzo laddove nel 2020 erano state messe a dimora le nuove piante e trattate con prodotti a base di zeoliti e humus.

I rilievi eseguiti hanno riguardato i seguenti parametri:

- **rilievi biometrici:** durante la stagione vegetativa è stato rilevato con cadenza mensile il diametro del tronco (mm) al fine di determinare l'incremento percentuale di accrescimento
- **mortalità delle piante:** al fine di determinare l'incidenza della sindrome multifattoriale denominata "moria del kiwi"

Come già osservato nel precedente progetto KIMOR, la distribuzione della zeolite + humus all'impianto è in grado di favorire la crescita delle piante nel corso dei primi anni e determinare una percentuale minore di piante colpite da moria, tuttavia, non è sufficiente a superare lo sviluppo della sindrome.

In 2 actinidi localizzati nel Comune di Manta, uno sano e l'altro colpito, sono inoltre stati installati sensori per il monitoraggio dell'umidità e temperatura del suolo a due diverse profondità (20 – 40 cm). Inoltre è stata eseguita una valutazione dell'accrescimento del diametro del tronco mediante dendrometri elettronici e dell'accrescimento dei frutti con fruttometri. Questa attività è stata realizzata con il fine di capire le differenze nelle due diverse situazioni di moria e individuare i momenti più critici nel corso della stagione vegetativa.

È stato osservato nell'actinidi colpito da moria un accrescimento minore dei frutti rispetto al sano ed anche per le variazioni sull'accrescimento del diametro del tronco i risultati sono i medesimi, ovvero i valori maggiori sono stati rilevati nell'actinidi sano.

Il primo anno di sperimentazione ha condotto all'individuazione dei casi studio da approfondire nel corso del 2021-2022 per cui si attende tale termine per poter discutere dei risultati ottenuti dalle attività.

Sottoprogetto 2- Analisi fisiologiche, morfologiche ed anatomiche

Sulla base della caratterizzazione delle aziende monitorate nel Sottoprogetto 1 sono stati scelti due appezzamenti, localizzati nel comune di Manta, di cui uno sano e uno colpito da moria, che pur essendo pressoché contigui e molto simili per età delle piante, aspetti pedoclimatici e conduzione agronomica, erano marcatamente differenti per la manifestazione dei sintomi di moria. Cinque piante per ciascun appezzamento sono state monitorate per i principali parametri morfologici, fisiologici ed ambientali.

Attività 2.1- Analisi di parametri fisiologici

Sono stati monitorati in continuo il flusso della linfa e la temperatura fogliare, e nel corso della stagione vegetativa sono stati analizzati fotosintesi, traspirazione, conduttanza stomatica, CO₂ sottostomatica e potenziale idrico fogliare. La minor traspirazione, la più elevata temperatura fogliare, il più basso potenziale idrico fogliare ed il minor flusso linfatico rilevati nelle piante dell'appezzamento colpito indicano uno stato di stress idrico, a parità di disponibilità di acqua fornita per irrigazione, ascrivibile ad una minor efficienza del sistema di trasporto xilematico della linfa e ad una maggior sensibilità alla cavitazione.

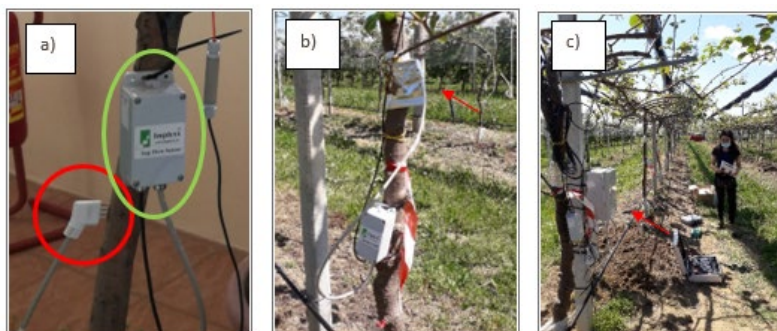


Figura 2 Sistema per il monitoraggio in campo del flusso linfatico. Componenti del sistema di rilevamento: heat pulse velocity sap flow sensors (in rosso) e Implexx hub (in verde) (a), in campo negli appezzamenti monitorati con schermatura in alluminio del sensore (b) e datalogger (c).

Attività 2.2- Caratterizzazione morfologica ed anatomica dell'apparato radicale

L'analisi morfologica ed istochimica di campioni di radici ha consentito di evidenziare un contenuto in amido decisamente basso nelle radici dell'appezzamento colpito. Questo parametro è correlato a stati di stress da eccessi termici e determina l'inefficienza del turnover delle radici attive e l'impossibilità di sviluppare un apparato radicale efficiente. La scarsa quantità di amido accumulato nei tessuti legnosi è anche dovuta al consumo indotto dalla necessità di protezione dai fenomeni di cavitazione quando la richiesta traspirativa dalle foglie è eccessiva.

Attività 2.3- Elaborazione dei dati fisiologici ed ambientali

Fra i parametri ambientali è stata posta particolare attenzione sul deficit di pressione di vapore (VPD), in quanto causa di stress idrico per la pianta e di risposte adattative sia fisiologiche che anatomiche a carico del sistema di trasporto xilematico della linfa. È stata rilevata l'assenza di risposta della conduttanza stomatica all'incremento del VPD sia nelle piante sane che in quelle colpite da moria: ciò significa che la pianta del kiwi è particolarmente esposta alla disidratazione in caso di eccesso termico e di elevato VPD. I risultati ottenuti dall'analisi della correlazione fra conduttanza stomatica, fotosintesi, traspirazione e flusso xilematico della linfa supportano l'ipotesi di un danno indotto a livello xilematico da temperatura e VPD elevati.

Sottoprogetto 3 – Analisi fitopatologiche realizzate dal DISAFA (Università degli Studi di Torino)

Attività 3.1. Isolamento e caratterizzazione biologica e molecolare di potenziali agenti patogeni, con particolare attenzione a isolati di *Phytophthora* spp

Lo scopo dell'attività di DISAFA è stato quello di identificare il ruolo della componente biotica, in particolare il ruolo dei microrganismi oomiceti coinvolta nella moria del kiwi, isolando potenziali patogeni fungini, dalle radici provenienti da actinidi piemontesi che mostravano sintomi di moria.

La patogenicità degli isolati è stata verificata in vivo con lo scopo di osservare i sintomi in diverse condizioni di temperatura e ombreggiamento su piante di *Actinidia deliciosa*.

Le prove sono state eseguite in due epoche distinte dell'estate, la prima il 24 giugno 2021 mentre la seconda l'8 luglio 2021.

Le prove hanno visto il susseguirsi delle seguenti fasi:

1. Isolamenti e identificazione da impianti del progetto
2. Estrazione del DNA
3. Amplificazione e sequenziamento della regione ITS (Internal Transcribed Spacer)
4. Saggio di patogenicità degli isolati di *Phytophthora* spp. su *Actinidia*
5. Allestimento delle prove in vivo

- Il primo saggio è stato effettuato il 24 giugno 2021 su piante in vaso di A. deliciosa 'Green Angel' e lo si è effettuato volutamente ad inizio estate per osservare la patogenicità in relazione all'effetto dell'ombreggiamento in un'epoca con temperature che non hanno ancora raggiunto il valore massimo estivo;
- Il secondo saggio è iniziato l'8 luglio 2021 su piante in vaso di A. deliciosa 'Green Angel', 'Hayward' e innestate Z1.

Le piante 'Green Angel' in entrambe le prove sono state inoculate e dopo due giorni ed è stata effettuata una sommersione da 48 ore.

Le piante 'Hayward' e innestate Z1 sono state inoculate e dopo due giorni è stata effettuata una prima sommersione da 48 ore, trascorsi 8 giorni è stata effettuata una seconda sommersione da 30 ore e trascorsi 10 giorni è stata effettuata una terza sommersione da 66 ore.

Le piante sono state monitorate giornalmente e alla comparsa dei sintomi sono stati svolti dei rilievi fitopatologici in cui sono stati raccolti dati sull'indice di malattia.

Inoltre, si è effettuato un secondo rilievo fitopatologico dove si sono raccolti i dati sulla gravità di come si manifesta la sindrome.

Risultati della prima prova

Le piante inoculate con *P. vexans* e coperte con il telo ombreggiante non sono risultate statisticamente differenti rispetto al testimone non inoculato. Le piante inoculate con *P. helicoides* e coperte con il telo ombreggiante sono invece risultate statisticamente differenti rispetto al testimone non inoculato ma non rispetto alle piante inoculate con *P. vexans*.

A fronte dei rilievi effettuati dopo 8, 11, 15 e 18 giorni dall'inoculazione si può ribadire che la gravità delle piante inoculate sia con *P. vexans* sia con *P. helicoides* senza il telo ombreggiante sono risultate statisticamente differenti rispetto al testimone non inoculato. Le piante inoculate e coperte con il telo ombreggiante non sono risultate statisticamente differenti rispetto al testimone non inoculato per i rilievi dopo 8 e 11 giorni. La differenza significativa della suddetta tesi è risultata per i rilievi dopo 15 e 18 giorni.

Le piante inoculate con *P. helicoides* e coperte con il telo ombreggiante sono risultate statisticamente differenti rispetto al testimone non inoculato.

Inoltre, nella tesi senza ombreggiamento, le piante inoculate con *P. vexans* e *P. helicoides* non hanno mostrato differenze significative se confrontate tra loro. In questo caso, la percentuale di foglie colpite ha una crescita non lineare ma esponenziale in entrambe le tesi ma si può osservare che nell'ultimo rilievo comunque in entrambe le tesi la percentuale di foglie colpite era massima (100%).

Nella tesi ombreggiata si è invece osservata una differenza significativa ad ogni rilievo tra le tesi inoculate, riuscendo a pensare che l'effetto dell'ombreggiamento incide in modo positivo diminuendo l'indice ma soprattutto l'incidenza della malattia.

I risultati relativi alle misurazioni del pH del suolo con e senza telo ombreggiante non hanno evidenziato differenze tra le diverse tesi e l'andamento si è rilevato costante per tutte le tesi considerate.

In merito alla temperatura del terreno, non si sono osservate differenze tra le varie tesi valutate

Risultati della seconda prova

Gli indici di malattia delle piante appartenenti alla cultivar 'Green Angel' inoculate con *P. helicoides* sono risultate statisticamente differenti rispetto al testimone non inoculato senza il telo ombreggiante, le piante inoculate con *P. vexans* invece presentano valori statisticamente significativi rispetto alla condizione di controllo soltanto 21 giorni dopo l'inoculazione. Gli indici di malattia non sono risultati statisticamente significativi tra i due inoculi utilizzati per il saggio senza telo. Nel saggio con il telo ombreggiante non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le tesi valutate.

Analizzando l'indice di gravità, espresso come % delle foglie colpite, le piante inoculate sono risultate significativamente differenti rispetto al testimone non inoculato sia con il telo ombreggiante che senza.

Le piante appartenenti alla cultivar 'Hayward' inoculate con *P. vexans* e con *P. helicoides* senza il telo ombreggiante sono risultate statisticamente differenti, in termini di valutazione dell'indice di malattia, rispetto al testimone non inoculato in tutti i rilievi effettuati. Nella condizione senza telo ombreggiante le differenze tra piante inoculate con i due patogeni non sono risultate statisticamente significative.

Le piante appartenenti alla cultivar 'Hayward' inoculate con *P. vexans* coperte con il telo ombreggiante non sono risultate statisticamente differenti rispetto al testimone non inoculato. Le piante inoculate con *P. helicoides* coperte con il telo ombreggiante sono risultate statisticamente differenti rispetto al testimone non inoculato. Situazione confermata anche nel rilievo dell'incidenza della malattia: le piante inoculate di *P. vexans* coperte con il telo ombreggiante non hanno mostrato sintomi mentre quelle senza copertura la gravità è simile nelle tesi inoculate da *P. vexans* e *P. helicoides*.

Le piante innestate Z1 invece non hanno mostrato sintomi riconducibili alla moria fino al termine della prova.

Nel secondo saggio, come nel primo, i rilievi relativi alla misurazione del pH e della temperatura non hanno mostrato differenze significative tra le varie tesi.

Da sottolineare è la maggior tolleranza alla sommersione da parte del portainnesto Z1 rispetto all'Hayward: quelle di Z1 si mostrano più grosse e robuste rispetto a quelle dell'Hayward che risultano invece sottili e esili.

Isolamenti da impianti del progetto

Durante i rilievi in campo nei vari impianti del progetto Kiris sono stati raccolti dati inerenti alla gestione e ai fattori possibilmente coinvolti nello sviluppo della malattia.

I risultati degli isolamenti effettuati da impianti con sintomatologia avanzata, confermano una presenza predominante di *P. vexans* nella maggior parte degli isolamenti identificati a livello molecolare.

Dagli impianti sani ed identificati solo a livello morfologico, sono stati ottenuti isolati prevalentemente appartenenti a diverse specie di *Trichoderma*.

Tra i vari impianti monitorati, si è potuto osservare che l'incidenza della malattia è maggiore in impianti senza rete antigrandine. Impianti con rete antigrandine nera tendenzialmente si presentavano con un quadro fitosanitario migliore, anche per quanto riguarda lo sviluppo della batteriosi.

Attività 3.2. Sviluppo di un saggio diagnostico molecolare

Dalle analisi svolte emerge l'importanza del dato riguardante la presenza di *Phytophthora*, da radici colpite da moria sono stati condotti isolamenti dal 2016 al 2022 e la maggior parte degli isolati ottenuti sono stati

identificati molecularmente come appartenenti alla specie *P. vexans*. Lo sviluppo di un saggio diagnostico molecolare è attualmente in corso. La specie target selezionata per il disegno dei primer è *P. vexans* in quanto è la specie maggiormente isolata. Lo sviluppo del protocollo real time qPCR e la verifica di sensibilità, specificità e ripetibilità sono attualmente in corso.

Attività 3.3. Studio del microbioma di radici sane e malate di suoli sani e contaminati

L'attività svolta nel mese di Settembre 2021 ha previsto il campionamento svolto in 4 comuni della provincia di Cuneo, considerando per ogni località un campo sano ed uno colpito da moria. Per ogni sito campionato sono stati prelevati campioni in cinque replicati biologici che sono stati successivamente trattati in modo indipendente.

Ne è conseguita la caratterizzazione del microbioma di suolo, rizosfera e radici tramite metabarcoding utilizzando primer specifici per batteri, funghi ed oomiceti. I campioni analizzati sono stati in totale 360.

Le comunità batteriche presenti nelle tre matrici analizzate hanno mostrato un'ampia diversità di generi senza una prevalenza netta di un genere. Nei suoli e nella rizosfera *Bacillus* è il genere più abbondante sia in campi sani sia colpiti. Nelle radici dei campi sani il genere più abbondante è *Acidovorax*, mentre *Niastella* e *Allorhizobium* sono i generi risultati più presenti nei campi colpiti.

Come per le comunità batteriche anche quelle fungine sono caratterizzate da un'ampia diversità di generi. Nel suolo *Gibellulopsis* è il genere più abbondante sia in campi sani sia colpiti, seguito da *Mortierella* spp. Nella rizosfera *Fusarium* spp. è il genere più abbondante indipendentemente dallo stato di salute del campo. Nelle radici *Dactylonectria* è più abbondante nei campi malati ma è presente anche nei sani con abbondanza relativa minore.

La diversità dei funghi è risultata correlata al luogo di campionamento e allo stato di salute dell'actinidiato ma non correlata alla matrice analizzata.

Diversamente dalle comunità fungine e batteriche la popolazione degli oomiceti è caratterizzata da una minore ricchezza in termini di generi presenti, le differenze sono infatti in termini di abbondanza e non di diversità. I risultati dell'analisi di metabarcoding rivelano quanto osservato nei precedenti anni attraverso gli isolamenti. *Phytophthora* risulta presente sia nei campi sani che colpiti, ma in quantità differenti. Inoltre, la presenza di *Phytophthora* correla in modo statisticamente significativo con la presenza di moria.

Infine, le caratteristiche chimico-fisiche dei suoli analizzati non hanno mostrato nessuna correlazione con la presenza di moria, indicando che la struttura del suolo e la sua composizione non hanno un ruolo diretto nello sviluppo della malattia.