

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

Terza 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 ormai a livello regionale. L'actinidicoltura piemontese è stata gravemente colpita dalla “moria del kiwi” e ad oggi si contano produttivi ancora circa 1500 ettari dei 3300 censiti a fine 2022.

Il terzo anno di attività del **sottoprogetto 1 - Attività di monitoraggio territoriale** è continuato tramite campionamenti fogliari e di suolo negli actinidi selezionati il primo anno come caso studio e nello specifico 10 actinidi 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 sul frazionamento della sostanza organica. 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 actinidi sani e colpiti ha consentito di osservare alcune differenze, quali:

- Analisi frazionamento sostanza organica: da questo tipo di confronto non sono state rilevate differenze significative tra le due diverse situazioni fitosanitarie. Pertanto, si esclude un'incidenza diretta del ruolo del tipo di sostanza organica sullo sviluppo della sindrome.
- Analisi fogliare: per il secondo anno consecutivo 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. L'annata straordinariamente secca e calda è stata confermata anche dal monitoraggio dai parametri ambientali e umidità del suolo, specie nel mese di luglio laddove anche le irrigazioni realizzate non sono state sufficienti a mantenere il potenziale idrico del suolo alla capacità di campo (33 cbar).

Linee di ricerca

Attività 1.2- Allestimento e gestione di due actinidi sperimentali

Nel corso del terzo 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 (rete nera, rete fotoselettiva giallo-nera e telo plastico) e sovra irrigazione (irrigazione climatizzante) sono state valutate nel campo sperimentale allestito presso la Fondazione Agrion mentre i portinnesti nel campo sperimentale di Saluzzo.



Figura 1 Tipologie di schermature ombreggianti. Da sinistra a destra: rete con trama e ordito giallo nero (Iridium), rete nera (Boscato) e telo plastico anti-pioggia (Valente pali)

Anche dai dati registrati nel 2022 mediante i sensori PAR è emerso la possibilità di ridurre gli stress foto-ossidativi delle foglie con l'impiego di schermature ombreggianti ed in particolare del telo plastico che ha consentito, rispetto alle altre tesi, un maggior sviluppo delle piante (sezione del tronco) e nel 2022 si è già riusciti a raccogliere la prima produzione.

Dalla 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 (riduzione di oltre il 50% delle ore con temperatura fogliare > di 30 °C), ha favorito la crescita delle piante interessate.

Riguardo i portinnesti, la valutazione per la stagione 2022 è stata realizzata presso il centro sperimentale di Manta effettuando rilievi durante la stagione vegetativa sull'accrescimento del tronco e sulla % di mortalità. Non è stata rilevata mortalità tra il confronto mentre il diametro del tronco dei p.i. Z1 e Bounty 71 si è accresciuto maggiormente rispetto al testimone Hayward e questi due materiali andranno quindi seguiti con attenzione nel corso delle prossime stagioni.

Temperatura e umidità del suolo: actinidiato sano-barale vs actinidiato malato-Vassallo

Anche nel 2022 è continuato il confronto in 2 actinidieti localizzati nel Comune di Manta, uno sano e l'altro colpito, per il monitoraggio dell'umidità e temperatura del suolo a due diverse profondità (20 – 40 cm).

Come già rilevato nella stagione 2020 e 2021, per entrambe le profondità, sono stati rilevati valori più bassi di temperatura del suolo nell'actinidiato sano che hanno quindi limitato lo stress termico radicale delle piante. Mentre per il terzo anno consecutivo è stato verificato un'umidità più elevata nell'actinidiato colpito rispetto quello sano che va a favorire lo sviluppo dei sintomi da moria.

È continuata altresì la valutazione dell'accrescimento del diametro del tronco mediante dendrometri elettronici e dell'accrescimento dei frutti con fruttometri che ha confermato una crescita minore dei frutti nell'actinidiato colpito rispetto al sano ed anche per le variazioni sull'accrescimento del diametro del tronco ha mostrato i risultati sono i medesimi, ovvero i valori maggiori sono stati rilevati nell'actinidiato sano.

Sottoprogetto 2- Analisi fisiologiche, morfologiche ed anatomiche

Nel corso del terzo anno di progetto è proseguito il monitoraggio dei 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. Inoltre sono stati effettuati rilevamenti fisiologici, morfologici ed anatomici su piante dell'actinidieta sperimentale realizzato presso AGRION con particolare attenzione all'irrigazione climatizzante ed alla copertura con reti giallo-nere.

Attività 2.1- Analisi di parametri fisiologici

Sono stati monitorati in continuo il flusso della linfa, la temperatura fogliare e l'accrescimento del diametro del tronco, che ha consentito di valutare anche lo stato idrico della pianta tramite misurazione della variazione giornaliera di diametro del tronco. Nel corso della stagione vegetativa sono stati analizzati fotosintesi, traspirazione, conduttanza stomatica, CO₂ sottostomatica e potenziale idrico fogliare.

Nel caso del confronto fra actinidieti sano e colpito si è osservato un progressivo deterioramento della conduttanza idraulica delle piante nell'appezzamento colpito, in cui si è confermato uno stato di stress idrico ascrivibile ad una minor efficienza del sistema di trasporto xilematico della linfa e ad una maggior sensibilità alla cavitazione. Nel caso dell'actinidieta sperimentale si è osservato che in nessuna tesi erano presenti piante con caratteristiche di stress; tuttavia la conduttanza idraulica era migliore nelle tesi di conduzione climatizzante, in particolare nella tesi con irrigazione sovrachioma abbinata all'ombreggiamento.

Attività 2.2- Caratterizzazione morfologica ed anatomica dell'apparato radicale

Campioni di radici sono stati prelevati in giugno ed in ottobre ed utilizzati per analisi in microscopia ottica ed elettronica.

Nel caso del confronto fra actinidieti sano e colpito la quantificazione del numero e del diametro dei vasi xilematici ha evidenziato una maggior vulnerabilità alla cavitazione nelle piante dell'appezzamento colpito. Nel caso dell'actinidieta sperimentale i vasi xilematici avevano un diametro maggiore nella conduzione climatizzante rispetto al testimone, ed il contenuto in amido delle radici era maggiore, soprattutto nel campionamento di giugno, ad indicare che il bilancio del carbonio è stato migliore, in particolare nella tesi di irrigazione sovrachioma, soprattutto durante la fase di crescita vegetativa. Anche i tessuti floematici radicali erano in buone condizioni e mostravano una elevata concentrazione di amido. Ciò indica una buona capacità di crescita sia della parte aerea che delle radici e di protezione dai fenomeni di cavitazione quando la richiesta traspirativa dalle foglie è eccessiva. Tali dati confermano l'effetto positivo della conduzione climatizzante rilevato con i dati fisiologici.

Attività 2.3- Elaborazione dei dati fisiologici ed ambientali

I dati rilevati nel terzo anno hanno confermato la vulnerabilità del kiwi allo stress indotto dal cambiamento climatico con particolare riferimento al danno subito dal trasporto xilematico. Nel terzo anno è stata posta attenzione anche ad altri fattori non già esaminati negli anni precedenti, ed in particolare alle differenze fra appezzamento sano e colpito. Siccome le principali differenze riguardavano la coltura precedente (pesco

nell'appezzamento colpito, prato in quello sano) ed il materiale di propagazione (micropropagazione nell'appezzamento colpito, talea in quello sano) si è dedotto che un ruolo primario nell'insorgenza della moria è giocato dalla perdita di biodiversità microbica sia del suolo che della pianta al momento dell'impianto. Da questo può dipendere la maggior sensibilità ad attacchi di microrganismi patogeni o opportunisti; ciò associato alla debolezza della pianta indotta dall'incapacità di rispondere al cambiamento climatico può essere determinante per l'insorgenza della moria.

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

Durante il biennio 2022-2023, il gruppo di lavoro DISAFA si è focalizzato principalmente sull'approfondimento dell'interazione tra fattori abiotici e biotici all'interno delle comunità. In particolare, sono state esaminate le relazioni tra la comunità della rizosfera, le caratteristiche del suolo e i generi che compongono tale comunità (Attività 3.3). Inoltre, la patogenicità degli isolati è stata confermata attraverso la riproduzione dei sintomi in condizioni controllate (Attività 3.1). Dalle prove condotte, verranno effettuate analisi di espressione genica al fine di comprendere la risposta della pianta a stress multifattoriali. Successivamente, l'attenzione si è concentrata principalmente sull'attività 3.2, completando la validazione di un saggio diagnostico molecolare per la specie di oomiceti isolata principalmente da actinidi piemontesi colpiti da moria: *Phytophthium vexans*.

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

Nell'anno 2022 non sono stati effettuati nuovi isolamenti da campi colpiti da moria ma sono stati riprodotti i sintomi della moria in serra su piante di *Actinidia deliciosa* cv. Hayward in vasi da 7 Lt utilizzando il ceppo PP1 di *Phytophthium vexans*. Le tesi considerate sono le seguenti:

Tesi	Trattamento	Numero di piante
NS	Testimone sano	12
F	Testimone sano sommerso	12
I	Tesi inoculata	12
IF	Tesi inoculata sommersa	12

Le radici sono state campionate per le successive analisi di espressione genica rispettivamente a:

- T-0,
- Dopo 24h dall'inoculazione,
- Dopo 48h dall'inoculazione,
- Dopo 72h dall'inoculazione,
- Dopo 7 giorni dall'inoculazione.

I sintomi sono stati monitorati con rilievi settimanali seguendo la scala presente nella pubblicazione di riferimento Prencipe et al., (2020) ed elaborati eseguendo il test statistico Anova seguito dal test Duncan Post Hoc per evidenziare le differenze statisticamente significative tra le tesi considerate.

Attività 3.2. Sviluppo di un saggio diagnostico molecolare (saggio PCR in tempo reale)

Sono state disegnate diverse coppie di primer per un saggio PCR in tempo reale mirato al rilevamento della specie *P. vexans*. Dopo una fase di validazione in silico per valutare la specificità e la formazione di strutture

secondarie, è stata selezionata una coppia di primer (FOR2 e REV4RCA). Questa coppia è stata disegnata su una regione mitocondriale per l'identificazione di *P. vexans* tramite un saggio molecolare qPCR Real Time con chimica SYBR Green. La validazione in vivo del saggio molecolare è stata condotta seguendo gli standard EPPO PM7/98 per specificità, sensibilità, selettività, ripetibilità e riproducibilità. La specificità del saggio è stata valutata utilizzando 25 ceppi di *P. vexans* appartenenti a tutti i gruppi filogenetici della specie. Le specie non target, considerate per valutare la specificità, includono:

- specie filogeneticamente vicine a *P. vexans*;
- generi comunemente presenti nelle comunità del suolo;
- generi riportati come patogeni nelle radici di *Actinidia* e/o precedentemente identificati come componenti della comunità associata alla moria del kiwi.

La coppia di primer selezionata dimostra un'elevata sensibilità nell'identificare ceppi di *P. vexans*, raggiungendo livelli nell'ordine dei fg. L'efficienza media della reazione, calcolata a partire dalla pendenza della retta di regressione, è elevata, confermando la validità del protocollo e la sua idoneità per le analisi di quantificazione del patogeno. Inoltre, il saggio è in grado di quantificare il patogeno target da diverse matrici tra cui suolo, rizosfera e radici naturalmente infette.

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

Durante il 2022, sono stati analizzati i network di co-inclusione e co-esclusione nella comunità della rizosfera per studiare le associazioni presenti, utilizzando i dati di metabarcoding raccolti nell'anno precedente. Questa analisi ha rivelato associazioni negative del genere *Phytophthium* con generi di funghi micorrizici e con specie che promuovono lo sviluppo radicale. I network di associazione tra generi basati sull'abbondanza di funghi, batteri e oomiceti sono stati realizzati con CoNet, evidenziando che i batteri rappresentano il regno più abbondante, seguiti dai funghi. Ulteriori taxa mostrano una presenza meno marcata, con Stramenopila che risulta più abbondante nella rizosfera rispetto a suolo e radice. Il confronto tra connessioni in piante sane e colpite ha evidenziato una diminuzione delle connessioni di co-presenza nei campioni colpiti sia in rizosfera che in suolo, ma non nella radice. Le metriche del network indicano un numero elevato di connessioni tra i componenti per i campioni sani rispetto a quelli colpiti, sia in rizosfera che in suolo. Le associazioni statisticamente significative con *Phytophthium* sono presenti nel suolo e nella rizosfera, ma non nella radice. In particolare, *Phytophthium* ASV1 presenta correlazioni negative con diverse ASV appartenenti a *Pochonia chlamydosporia* e *Glomeromycota* nella rizosfera, mentre *Phytophthium* ASV2 e ASV3 presentano correlazioni negative con diversi generi e organismi, sia nella rizosfera che nel suolo. Queste interazioni tra comunità biotiche della rizosfera e parametri chimico-fisici del suolo sottolineano l'importanza di includere parametri come l'umidità del suolo nelle analisi di correlazione future. I parametri considerati non mostrano interazioni dirette con *Phytophthium*, ma presentano interazioni di grado superiore con altri generi che a loro volta interagiscono con *Phytophthium* nella rizosfera. Test statistici mirati hanno caratterizzato l'assemblaggio delle comunità, rivelando come le comunità fungine siano principalmente guidate da fenomeni stocastici, mentre le comunità batteriche mostrano fenomeni stocastici più marcati nei campioni colpiti. Nel caso degli oomiceti, le comunità sembrano essere guidate da processi deterministici nei campioni colpiti, indicando la presenza di un fenomeno di disbiosi dovuto allo stress.