



Programma di monitoraggio fitosanitario, resistenza varietale e caratterizzazione dei principali patogeni coinvolti nella moria del melograno in Veneto.

Premessa

Il melograno (*Punica granatum* L.) è un arbusto originario della regione che si estende dall'Iran fino all'India settentrionale (Mars, 2000 - Options Méditerranéennes, Série A 42: 55–62). Fin dall'antichità, il melograno è stato coltivato in tutto il bacino del Mediterraneo, inclusa l'Italia, per i suoi frutti eduli e per finalità ornamentali (Adiletta et al., 2018 - European Food Research Technology 244(8):1427–1438). Nel corso degli ultimi anni la coltivazione del melograno ha ricevuto un crescente interesse anche grazie alla diffusione di alcune varietà molto interessanti dal punto di vista agronomico quali Wonderful e Acco (Akko); attualmente in Italia gli impianti di melograno si estendono per oltre 1200 Ha (Fonte ISTAT).

In Italia la coltivazione del melograno è concentrata principalmente nelle regioni centro-meridionali, tuttavia anche in alcune regioni del Nord, tra cui il Veneto, sono fiorite importanti realtà produttive, incentivate dalle ottime proprietà nutrizionali del frutto e da un contesto di offerta ancora limitata. Unitamente all'espansione delle superfici coltivate, in tutte le regioni italiane sono aumentate le segnalazioni di nuove malattie dal forte impatto sia sulla vitalità che sulla produttività delle piante (Riccioni et al., 2017 - Journal Plant Pathology 99(1): 294, Linaldeddu et al., 2020 - Italian Journal of Mycology 49: 92-100).

Pertanto, visto il crescente interesse economico di questa coltura in Veneto, l'allarmante diffusione di malattie nuove e ad eziologia sconosciuta e il forte impatto di queste malattie sulle produzioni, assume rilevanza sotto il profilo sia scientifico sia applicativo approfondire le conoscenze scientifiche su questi patosistemi emergenti ed in particolare: I) sulle principali specie fungine coinvolte nei fenomeni di moria, II) sulla resistenza varietale alle avversità di natura parassitaria, III) e sull'efficacia *in vitro* di differenti fungicidi nei confronti delle principali specie fitopatogene.

Piano delle attività

Monitoraggio fitosanitario e analisi diagnostiche

Di seguito si riporta in forma schematica il programma delle attività di monitoraggio fitosanitario e di diagnostica molecolare indirizzate a chiarire l'eziologia delle malattie emergenti del melograno in Veneto. In particolare, le attività saranno indirizzate alla mappatura degli impianti di melograno con sintomi di moria e ad identificare su base morfologica e molecolare le principali specie fungine associate alle malattie della chioma e radicali.

Le attività di campo e di laboratorio saranno svolte nell'arco di 6 mesi a partire dalla data di stipula della convenzione.

Attività di campo:

- verrà effettuato un monitoraggio fitosanitario degli impianti presenti sul territorio regionale con individuazione e mappatura tramite tecnologia GPS/GIS dei focolai infettivi;
- in ciascun sito verrà selezionata un'area di studio per il prelievo di campioni da piante sintomatiche. In particolare, dopo aver rilevato lo stato sanitario delle piante, ponendo particolare attenzione alla presenza e natura dei sintomi nella chioma (ingiallimenti, microfillia e rarefazione), nei rami e nelle branche (disseccamenti, essudati, cancri, necrosi e rami epicormici) e al colletto (essudati e necrosi), verranno prelevati in ciascun sito campioni sintomatici da analizzare in laboratorio.



ca01ae1f



Attività di laboratorio:

- I campioni (n. 60) prelevati verranno utilizzati per gli isolamenti fungini entro 48 ore dalla loro raccolta. Dopo un attento esame allo stereomicroscopio volto ad accertare l'eventuale presenza e natura di strutture riproduttive fungine, i campioni di rami e branche verranno disinfettati in superficie con etanolo al 70% per 30 sec. Da ogni campione, verranno prelevati frammenti di circa 3-4 mm² di tessuto corticale e legnoso che saranno posti in piastre Petri contenenti un substrato a base di patata-destrosio-agar (PDA, Oxoid) per la crescita e l'isolamento dei funghi. I campioni prelevati dalla rizosfera (circa 200 g di suolo e radici) verranno analizzati con la tecnica del Baiting. In dettaglio, il suolo verrà posizionato all'interno di vaschette di plastica contenenti 500 ml di acqua distillata e frammenti di foglie fresche di *Rhododendron* sp. utilizzati come trappola. Dopo 5 e 7 giorni le foglie con maculature o aree necrotiche verranno lavate in acqua sterile, asciugate su carta da filtro sterile e successivamente trasferite su piastre Petri contenenti un terreno specifico per oomiceti (SMA).

Tutti i microrganismi così ottenuti verranno identificati sulla base dei principali caratteri morfo-colturali quali la crescita e la colorazione della colonia, la struttura del micelio, la produzione di pigmenti diffusibili a differenti temperature, la forma e la dimensioni di conidi e sporangi, in accordo con le recenti descrizioni morfologiche riportate in letteratura.

- L'identità di tutti i microrganismi ottenuti nel corso delle ricerche verrà confermata attraverso metodiche molecolari. In particolare, si procederà con l'amplificazione da DNA genomico, il sequenziamento e l'analisi delle sequenze dell'intera regione degli spaziatori interni trascritti (ITS1 e ITS2) e del gene 5.8S del rDNA. Le sequenze nucleotidiche ottenute verranno inizialmente confrontate con quelle disponibili nella banca dati internazionale Genbank utilizzando la funzione BLAST e quindi utilizzate nelle analisi filogenetiche unitamente alle sequenze dell'olotipo di ciascuna delle specie che nell'analisi BLAST avranno ottenuto i valori più elevati di similarità.

Valutazione dell'attività antifungina in vitro di differenti grofarmaci nei confronti dei principali patogeni del melograno.

Inibizione crescita su terreni agarizzati:

- L'attività antifungina di 5 agrofarmaci con diverso meccanismo d'azione nei confronti delle principali specie fitopatogene precedentemente identificate verrà valutata mediante saggi di crescita in vitro. Le prove verranno svolte in piastre Petri (90 mm) contenenti un substrato universale a base di patata-destrosio-agar (PDA) addizionato con l'agrofarmaco da testare. Nei saggi verranno utilizzati come inoculi dischetti di agar-micelio di 5 mm di diametro, ottenuti da isolati di ciascuna specie in attiva crescita (4-5 giorni di incubazione al buio a 20 °C). Tutte le possibili combinazioni agrofarmaco-patogeno saranno testate con cinque repliche. Inoltre verranno saggiate combinazioni di più agrofarmaci contemporaneamente nel tentativo di verificare un eventuale effetto neutro o additivo. Il testimone negativo sarà allestito allevando i patogeni in piastre Petri contenenti il solo terreno di coltura (PDA). Per ciascun agrofarmaco verrà calcolata la minima concentrazione inibente (IMC), valore che identifica la minima concentrazione in grado di arrestare la crescita di un microorganismo. Allo stesso tempo saranno calcolati, attraverso la Probit Regression Dose-Response Analysis, i valori relativi alle dosi efficaci 50 (DE50) e 90 (DE90) che indicano, rispettivamente, la dose in grado di ridurre del 50 e del 90% lo sviluppo miceliare delle specie fitopatogene oggetto di studio.

Inibizione germinazione conidi:

- Il saggio sarà allestito in piastre per colture cellulari da 24 pozzetti, contenenti ciascuno 500 µl di una sospensione conidica (1 x 10⁴ conidi/ml) diluita in acqua distillata sterile dei funghi fitopatogeni precedentemente identificati *Coniella* granati. Ai pozzetti verrà addizionata una sospensione dell'agrofarmaco da saggiare utilizzando 4 differenti concentrazioni. Le tesi di controllo negativo saranno allestite con acqua distillata sterile. Il saggio verrà svolto effettuando cinque repliche per ciascun



ca01ae1f



agrofarmaco. La capacità dei differenti agrofarmaci di inibire la germinazione dei conidi verrà valutata dopo 12, 24, 36 e 48 ore di incubazione a 25 °C tramite osservazioni al microscopio.

Attività in coltura duale con agenti di biocontrollo:

- Verrà valutata l'efficacia di microorganismi antagonisti (biocontrol agents, BCA) afferenti al genere *Trichoderma* di inibire o bloccare la crescita miceliale e/o parassitizzare le ife delle specie fungine fitopatogene di interesse. Il tipo di interazione antagonistica verrà valutato attraverso saggi in coltura duale su PDA, utilizzando la scala di interazioni antagonistiche proposta da Badalyan (2002 - *Phytopathologia Mediterranea* 41(3): 220– 25).

Valutazione del grado di virulenza delle differenti specie fungine isolate su melograno e dell'eventuale resistenza varietale nei confronti dei principali patogeni.

Saggi di patogenicità:

- Al fine di chiarire il ruolo svolto dai microorganismi isolati durante il primo semestre di attività nell'eziologia delle malattie del melograno, verrà saggiata la patogenicità di tutte le specie attraverso saggi di inoculo artificiale. Nello specifico, per le specie di *Phytophthora* la patogenicità verrà saggiata attraverso la metodica del suolo infetto (Vettraino e coll. 2001 - *Plant Pathology* 50:90-96). A tal fine, piantine di melograno asintomatiche di un anno verranno trasferite in vasi di plastica da 1 L contenenti del suolo inoculato con i propaguli di *Phytophthora* spp. L'inoculo di *Phytophthora* verrà preparato come riportato da Linaldeddu e coll. (2014 - *Forest Pathology* 44:191-200). La patogenicità delle specie fungine verrà saggiata inoculando per ferita il fusto di piante di melograno di un anno. In particolare, verrà praticata con un bisturi sterile un'incisione longitudinale di circa 0,5 cm sulla quale si posizionerà un dischetto di micelio in attiva crescita di 5 mm, prelevato dal margine di colonie fungine di 5 giorni di età allevate su terreno PDA. Per evitare la rapida disidratazione del micelio, il punto d'inoculo verrà avvolto per una settimana con cotone sterile inumidito e protetto con parafilm "M". La natura e gravità dei sintomi causati da ciascun patogeno verrà valutata dopo due mesi.

Resistenza varietale:

- il grado di suscettibilità/resistenza delle principali varietà di melograno attualmente in commercio nei confronti di *Phytophthora palmivora* e di *Coniella granati*, principali agenti causali rispettivamente del marciume radicale e del cancro del melograno, verrà valutato su semenzali di 1 anno. Nel bacino del mediterraneo sono diffuse oltre 100 varietà di melograno che differiscono per dimensione e colore dei frutti, durezza e morbidezza del seme, spessore della buccia, maggiore o minore resa e contenuto in succo, acidità, dolcezza e conservabilità dei frutti. In base al gusto, i frutti vengono classificati in dolci, agrodolci e acidi. Nell'ambito di questa ampia variabilità varietale verranno saggiate per la resistenza ai due patogeni tre varietà dolci (Valenciana, Mollar e Dente di Cavallo), tre agrodolci (Acco, Wonderful e Soft Seed®1) ed una ornamentale (Grossa di Faenza). Il saggio verrà effettuato in ambiente controllato utilizzando la tecnica di inoculazione descritta in Linaldeddu e coll. (2020 - *Italian Journal of Mycology* 49: 92-100).

Risultati attesi:

I risultati delle attività di ricerca contribuiranno a:

- 1) definire l'eziologia dei vari quadri sintomatologici che interessano il melograno in Veneto;
- 2) mappare la distribuzione spaziale dei focolai infettivi;
- 3) caratterizzare sotto il profilo molecolare i principali patogeni;
- 4) sviluppare nuovi protocolli per la diagnosi precoce di microrganismi nocivi.
- 5) verificare l'efficacia di differenti agrofarmaci al fine di sviluppare un piano di difesa razionale in grado di contrastare l'ulteriore diffusione delle malattie attualmente presenti nel territorio regionale;



ca01ae1f



- 6) sviluppare protocolli innovativi di difesa basati sull'impiego di microrganismi antagonisti;
- 7) individuare fonti di resistenza nel germoplasma varietale del melograno.

Divulgazione

A conclusione del periodo di ricerca si terrà un incontro con le parti interessate al fine di illustrare i principali risultati ottenuti nel corso delle indagini. I risultati del periodo di ricerche saranno compendati in una relazione finale.



ca01ae1f

