

# Caratterizzazione molecolare di isolati di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* presenti su actinidia coltivato in Piemonte

Simona Prencipe\*,\*\* - Davide Spadaro\*,\*\* - Maria Lodovica Gullino\*,\*\* - Angelo Garibaldi\*

\*Centro di Competenza per l'Innovazione in Campo Agroambientale AGROINNOVA - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

\*\*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari DISAFA - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) è l'agente causale della batteriosi del kiwi, una malattia che dal 2008 sta causando ingenti perdite economiche alla produzione di tale pianta, colpendo le coltivazioni di *Actinidia chinensis* e *A. deliciosa* di paesi europei ed extra-europei. La prima segnalazione di questa malattia risale al 1989 in Giappone, a questa si sono succedute segnalazioni in molti altri paesi tra cui: Cina (1992), Corea del Sud (1994), Italia (2008), Francia (2010), Portogallo (2010), Nuova Zelanda (2010), Spagna (2011) e Cile (2011) (Scortichini *et al.*, 2012). Si tratta di una malattia in continua espansione, le segnalazioni di nuovi focolai sono in aumento. Psa è un batterio gram negativo, aerobio obbligato con fase endofitica latente. La sua elevata virulenza, le gelate invernali, unitamente a pratiche colturali errate e la suscettibilità del germoplasma di *Actinidia* spp. attualmente coltivato hanno contribuito alla sua rapida diffusione.

I sintomi della presenza del batterio si manifestano come avvizzimento di gemme, foglie e germogli, cancri lungo il tronco e i tralci da cui può fuoriuscire essudato batterico bianco di consistenza mucillaginosa e di color rosso-brunastro. In primavera, sulle foglie si sviluppano macchie necrotiche tra le nervature di colore bruno di forma irregolare (Balestra *et al.*, 2009).

I ceppi di Psa ad oggi conosciuti sono suddivisi in 4 subpatovar chiamate biovar. L'attuale epidemia italiana non ha avuto origine da un adattamento del ceppo già presente nel nostro paese, ma è stata causata dall'introduzione dall'esterno di un ceppo di Psa molto più virulento e aggressivo, Psa-V appartenente alla biovar 3, unico responsabile dei gravi danni arrecati in questi ultimi anni al settore del kiwi (Chapman *et al.*, 2012). Il diverso significato biologico delle popolazioni batteriche di Psa su kiwi evidenzia quindi la necessità di sviluppare metodiche in grado di rilevare il ceppo Psa-V e studiarne la sua variabilità ed evoluzione all'interno delle diverse aree di comparsa epidemica.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la variabilità genetica e biologica all'interno della popolazione piemontese del batterio. A tal fine, sono state utilizzate tecniche molecolari (Fig.41; pag. 58) quali: i) Multi Locus Sequence Typing (MLST) tramite sequenziamento di tre geni conservati (*pgi*, *cts*, *gapA*) e di geni di virulenza appartenenti al TTSS, le cui varianti

delle proteine possono agire come determinanti di avirulenza o virulenza (effettori specifici di Psa); ii) PCR di sequenze ripetute (REP-PCR) (primer GTG<sub>5</sub> ed ERIC), unitamente allo sviluppo di saggi per la valutazione della virulenza *in vivo* dei ceppi isolati.

L'isolamento del patogeno è avvenuto partendo da materiale infetto prelevato sul territorio piemontese negli anni 2010 e 2014 ed identificato tramite le coppie di primer specifici PsaF1/R2 e PsaF3/R4. Risultati preliminari tramite REP-PCR, per entrambi i primer utilizzati, mostrano profili di fingerprinting che suddividono in due cluster distinti i ceppi isolati nel 2010 da quelli del 2014, ed evidenziano una maggiore variabilità intraspecifica per gli isolati del 2014. Dall'analisi MLST risulta di particolare interesse il gene *HrpKI* legato alla patogenicità e, in particolare, al sistema di secrezione di tipo III legato al rilascio di effettori batterici.

## Ringraziamenti

Lavoro svolto con il contributo del progetto "PRO.ACT.IN. - Tecnologie di PROduzione e di lavorazione dell'ACTinidia Innovative nel contesto dell'emergenza causata da *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae*" (PSR FEASR 2007/2013, Fondo Europeo per lo Sviluppo Rurale, Misura 124, Azione 1) finanziato dalla Regione Piemonte.

## Lavori citati

BALESTRA G. M., MAZZAGLIA A., QUATTRUCCI A., RENZI M., ROSSETTI A. (2009) - Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australasian Plant Pathology* 4, 34-36.

CHAPMAN J. R., TAYLOR R. K., WEIR B. S., ROMBERG M. K., VANNESTE J. L., LUCK J., ALEXSANDER B. J. (2012) - Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytopathology* 102, 1034-1044.

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, 631-640.