

RICERCA

Attacchi di *Verticillium nonalfalfae* su *Pelargonium grandiflorum* in Italia

Domenico Bertetti* - Pietro Pensa* - Sara Franco Ortega* -
Maria Lodovica Gullino*,** - Angelo Garibaldi*

* Centro di Competenza per l'Innovazione in campo agro-ambientale AGROINNOVA - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO).

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

Riassunto

Nel corso della primavera 2015, su piante di *Pelargonium grandiflorum* "Fabiola" coltivate in un'azienda agricola situata in Albenga (SV), venivano riscontrati i sintomi descritti in questa nota. La malattia era causata da un fungo identificato come *Verticillium nonalfalfae* tramite le analisi molecolari condotte utilizzando primers specifici per *Verticillium*, effettuate su un isolato monoconidico ottenuto dai tessuti vascolari infetti. Le caratteristiche morfologiche osservate *in vitro* sul medesimo isolato concordano con quanto descritto per questo microrganismo. E' questa la prima volta che *V. nonalfalfae* viene segnalato su *P. grandiflorum* nel nostro Paese, così come nel resto del mondo.

Parole chiave: piante ornamentali; tracheomicosi; verticilliosi.

Summary

First report of *Verticillium nonalfalfae* on *Pelargonium grandiflorum* grown in Italy

During the spring 2015, on plants of large flowered pelargonium (*Pelargonium grandiflorum*) "Fabiola" grown in a commercial farm located in Albenga (Savona province, northern Italy) appeared the symptoms described in this report. The fungal causal agent of the disease was isolated from affected vascular stem tissues. The pathogen was identified as *Verticillium nonalfalfae* by the molecular analyses carried out on a single-spore isolate, using specific primers developed for *Verticillium*. Morphological features observed *in vitro* on the same isolate were in accordance with the description of this microorganism. This is the first report of *V. nonalfalfae* on *P. grandiflorum* in Italy, as well as in the world.

Key words: ornamental plants; tracheomycosis; *Verticillium wilt*.

Introduzione

Il genere *Pelargonium*, famiglia Geraniaceae, comprende numerose specie e varietà, molte delle quali coltivate e commercializzate come vaso fiorito: una di queste è *Pelargonium grandiflorum* Willd. In questa nota vengono riportate le alterazioni osservate sulla cv Fabiola di questa specie e mai descritte prima d'ora su questa specie.



Figura 1 - Sintomi causati da *Verticillium nonalfalfae* su *Pelargonium grandiflorum* "Fabiola" allevato in vaso.

Figure 1 - Symptoms caused by *Verticillium nonalfalfae* on potted plant of *Pelargonium grandiflorum* "Fabiola".

Sintomi riscontrati ed identificazione del parassita

Nel corso della primavera 2015, 100 piante di *P. grandiflorum* cv Fabiola erano coltivate in un'azienda floricola di Albenga (SV). Questa cultivar faceva parte di un assortimento varietale, complessivamente costituito da circa 20.000 vasi. Le piante avevano circa 6 mesi di età e provenivano da talee radicate. In seguito alla radicazione, le talee erano state trapiantate. Alla comparsa dei sintomi, le piante erano coltivate in vasi di plastica in tinta coccia (diam. 15 cm) contenenti terriccio costituito da torba, pomice, carbonato di calcio e fertilizzante complesso. L'ambiente di coltivazione era una serra di ferro e vetro e la densità colturale era di circa 16 piante/m². L'irrigazione era localizzata per singolo vaso, con impianto di irrigazione a goccia. Il 2% delle piante in coltivazione manifestava i sintomi di seguito descritti. Le foglie di gran parte della chioma, a partire da quelle basali, presentavano clorosi, seguita da ingiallimento, avvizzimento e disseccamento, anche dei piccioli (Fig. 1). I fusti colpiti avvizzivano, assumendo vistose colorazioni bruno-nerastre, a partire dalla base. Effettuando sezioni, sia in senso longitudinale, sia in senso trasversale, era possibile osservare l'imbrunimento dei vasi conduttori (Figg. 2 e 3). Le piante colpite morivano in seguito agli attacchi. Gli isolamenti erano condotti a partire da fusti sintomatici di *P.*



Figura 2 - Imbrunimenti vascolari causati da *Verticillium nonalfalfae* su *Pelargonium grandiflorum* "Fabiola": sezione longitudinale.
 Figure 2 - Vascular browning caused by *Verticillium nonalfalfae* on *Pelargonium grandiflorum* "Fabiola": longitudinal section.

grandiflorum, prima disinfettati in soluzione di ipoclorito di sodio (1%) per circa 30 secondi e poi abbondantemente risciacquati in acqua sterile. Numerosi frammenti di tessuto, prelevati al confine con gli imbrunimenti dei vasi conduttori infetti, erano distribuiti su substrato PDA (Potato Dextrose Agar). Su questo terreno di coltura, mantenuto a temperatura ambiente, si sviluppavano costantemente numerose colonie fungine caratterizzate da micelio aereo, abbastanza fiocoso, che in un primo tempo appariva bianco e, dopo circa 15 giorni, assumeva colore grigio-verde scuro (Fig. 4a). A contatto con il substrato colturale, le colonie erano prima biancastre, poi assumevano sfumature giallastre e, infine, divenivano grigio-verdi (Fig. 4b). Dalle colonie ottenute erano ricavati gli isolati monoconidici che erano conservati a $7^{\circ}\text{C} \pm 1$. Uno di questi (DB15APR01M1) era coltivato in purezza per osservare le caratteristiche morfologiche. Il micelio produceva ife settate, pigmentate di bruno, solitarie o aggregate, a volte torulose, larghe fino a $5 \mu\text{m}$ (Fig. 4c) e rami conidiofori ialini, ramificati, settati, con setti più ravvicinati alle estremità (Fig. 4d). I rami conidiofori supportavano fialidi subulate, riunite in verticilli (ogni verticillo era costituito da 1-3 fialidi), disposti lungo il ramo conidioforo (fino a tre verticilli lungo il ramo) (Fig. 4e). Le fialidi laterali erano lunghe 18-46 (media: 24) μm , mentre quelle apicali erano più lunghe: 23-48 (media: 33) μm . La larghezza delle fialidi era di 1,1-2,6 (media: 1,7) μm alla base e di 0,6-1,8 (media: 1,0) μm alle estremità.



Figura 3 - Imbrunimenti vascolari causati da *Verticillium nonalfalfae* su *Pelargonium grandiflorum* "Fabiola": sezione trasversale.
 Figure 3 - Vascular browning caused by *Verticillium nonalfalfae* on *Pelargonium grandiflorum* "Fabiola": transverse section.

I conidi erano numerosissimi, ialini, da ellittici con apici arrotondati a ovali ed avevano dimensioni di $3,1-6,7 \times 1,7-3,5$ (media: $5,1 \times 2,5$) μm (Fig. 4f). Non venivano osservati microsclerozi.

Il DNA di un isolato monoconidico (DB15APR01M1) ottenuto da *P. grandiflorum* veniva estratto da una coltura pura ottenuta su PDA, utilizzando il E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (OMEGA Bio-Tek). Il DNA ricavato era usato come stampo per le reazioni di PCR, effettuate con l'ausilio di primers specifici per *Verticillium* (Inderbitzin *et al.*, 2011), per ottenere l'amplificazione dei seguenti tre geni: elongation factor 1-alpha (EF), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GPD) e actina (ACT). Quindi, i prodotti di PCR venivano purificati e sequenziati, ottenendo sequenze di 653, 708 e 560 paia di basi, per i tre geni rispettivamente. L'analisi di queste sequenze, effettuata con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997), identificava l'isolato da *P. grandiflorum* come *Verticillium nonalfalfae* con il 100% di similitudine con le sequenze KC307758.1, JN188163.1, JN188099.1 presenti in GenBank. Alle nuove sequenze depositate erano assegnati i seguenti Genbank accession numbers: KU840911, KU840909 e KU840907, rispettivamente per i geni EF, GPD e ACT.

Inoculazione artificiale

Per provare la patogenicità di *V. nonalfalfae* isolato da *P. grandiflorum* "Fabiola", l'isolato DB15APR01M1 era inoculato artificialmente su 5 piante apparentemente sane della stessa cultivar, di circa 3 mesi di età. L'inoculo era preparato in beute contenenti substrato PDB (Potato Dextrose Broth) poste in agitazione per 9 giorni, alla temperatura variabile da 21 a 23°C . Poi, l'inoculo era omogeneizzato e diluito, ottenendo una sospensione conidica alla concentrazione finale di 3×10^6 CFU/ml. Quindi, le radici delle piante di *P. grandiflorum* "Fabiola" erano immerse nella sospensione conidica ottenuta e subito trapiantate in vasi contenenti 2 litri di terriccio disinfestato a vapore, costituito da torba di sfagno, pomice, corteccia di pino e argilla (50:20:20:10). Cinque piante testimone erano

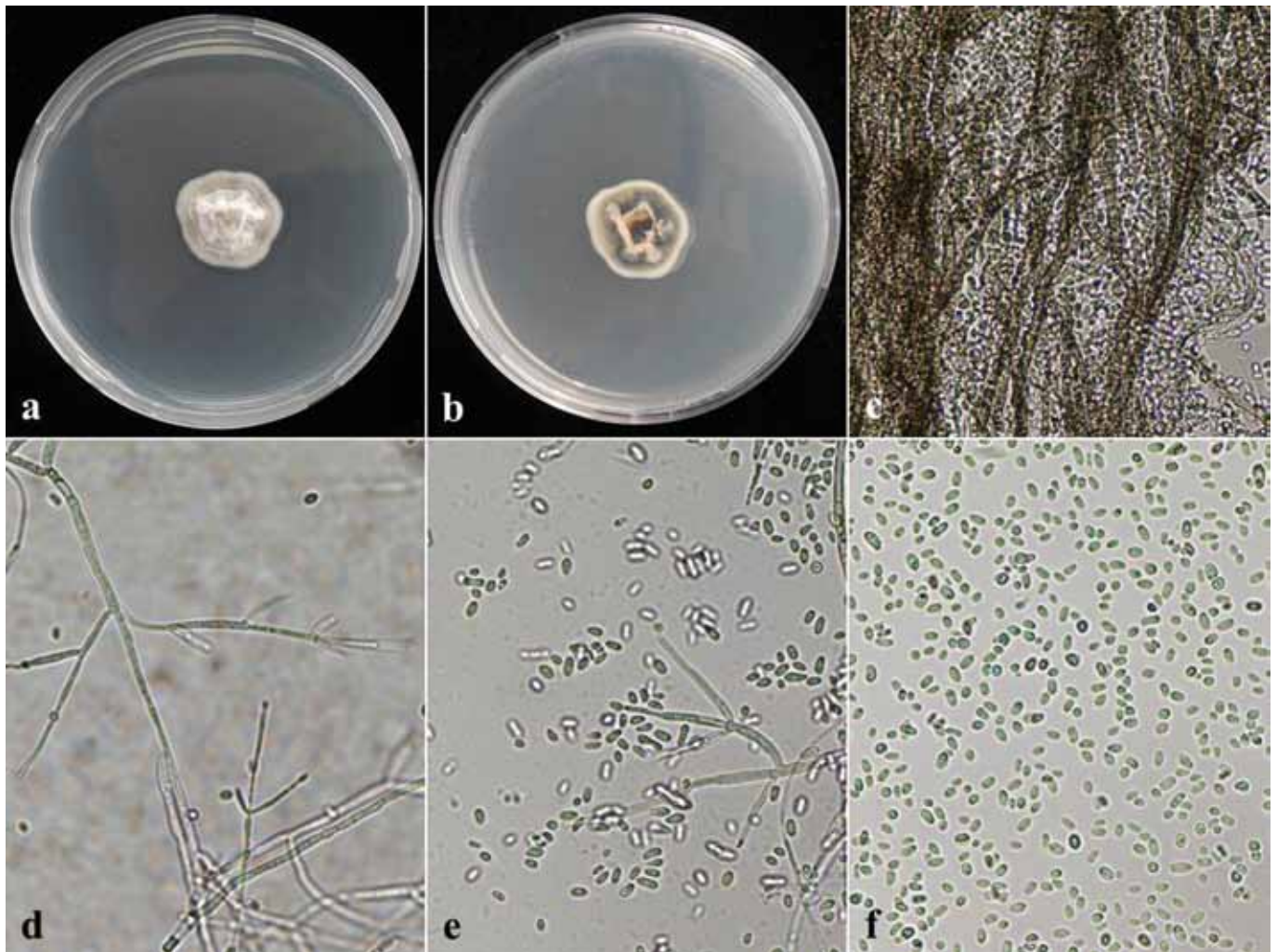


Figura 4 - Aspetti morfologici di *Verticillium nonalfalfae* isolato da *Pelargonium grandiflorum* "Fabiola". 4a. Colonia di crescita su PDA: accrescimento sul substrato. 4b. Colonia cresciuta su PDA: accrescimento a contatto con il substrato. 4c. Ife settate, pigmentate, brune, solitarie o aggregate. 4d. Rami conidiofori ramificati. 4e. Fialidi subulate riunite in verticilli. 4f. Conidi ialini, ellittici con apici arrotondati o ovali.

Figure 4 - Morphological aspects of *Verticillium nonalfalfae* isolated from *Pelargonium grandiflorum* "Fabiola". 4a. Colony grown on PDA: frontal view. 4b. Colony grown on PDA: reverse view. 4c. Brown-pigmented septate, solitary and aggregated hyphae. 4d. Branched conidiophora. 4e. Subulate and verticillate phialides. 4f. Cylindrical with rounded apices to oval conidia.

trattate in acqua sterile. Tutti i vasi erano sistemati in serra riscaldata, dove la temperatura media giornaliera variava da 15 a 21°C. Circa 15 giorni dopo l'inoculazione artificiale, i primi sintomi di clorosi e ingiallimento comparivano sulle foglie basali delle sole piante inoculate, mentre invece i testimoni non presentavano alcun sintomo. Con il procedere della malattia, le piante inoculate avvizzivano e morivano, disseccando nell'arco di tempo di 50 giorni dall'inoculazione (Figura 5). *V. nonalfalfae* era costantemente reisolato dai tessuti vascolari delle piante inoculate.

Conclusioni

Su ospiti appartenenti al genere *Pelargonium* vengono riportati sia *V. dahliae*, sia *V. albo-atrum*. Quest'ultimo è stato segnalato negli Stati Uniti, su *P. × hortorum* e *P. domesticum* (Baker *et al.*, 1940), in Inghilterra su *P. domesticum* (Fletcher e Griffin, 1972), in Polonia su *Pelargonium* sp. (Orlikowski, 1995). Nel nostro Paese, la presenza di *V. dahliae* su *P. grandiflorum* è nota da tempo (Garibaldi e Gullino, 1973). *V. nonalfalfae* è una specie di recente introduzione che annovera come ospiti *Solanum tuberosum*, *Spinacia oleracea*, *Humulus lupulus* e



Figura 5 - Test di patogenicità su piante di *Pelargonium grandiflorum* "Fabiola" allevate in vaso e artificialmente inoculate con l'isolato DB15APR01-M1 di *Verticillium nonalfalfae*: a destra i testimoni non inoculati.

Figure 5 - Pathogenicity test carried out on plants of *Pelargonium grandiflorum* "Fabiola" artificially inoculated with the isolate DB15APR01-M1 of *Verticillium nonalfalfae*: on the right side non inoculated controls.

Petunia × hybrida (Inderbitzin *et al.*, 2011) e che è stata recentemente segnalata su *Ailanthus altissima* sia negli Stati Uniti (Rebbeck *et al.*, 2013; Snyder *et al.*, 2013), sia in Europa (Maschek e Halmschlager, 2016). Pertanto, *V. nonalfalfae* viene qui segnalato su *P. grandiflorum* per la prima volta, sia nel nostro Paese, sia nel resto del mondo. La presenza dei sintomi precedentemente descritti sulla sola cv Fabiola, coltivata assieme a numerose altre, rende plausibile la presenza di cultivar meno suscettibili o resistenti a *V. nonalfalfae*: tuttavia, questa ipotesi dovrà essere attentamente valutata in prove di suscettibilità appositamente condotte con le specie e cultivar appartenenti al genere *Pelargonium* più coltivate nel nostro Paese. Per quanto concerne la prevenzione, occorre partire dall'impiego di materiale propagativo proveniente da piante sane, evitare terreni poco drenanti, eccessi di irrigazione e di concimazione. E' necessario mantenere il substrato di coltivazione lontano dal luogo di mantenimento delle piante, per evitare la sua contaminazione con il parassita proveniente da eventuali vasi infetti. In caso di attacchi, la rapida eliminazione delle piante infette consente di contenere la diffusione della malattia, come nel caso descritto in questa nota. Le piante vicine a quelle colpite andranno accantonate e tenute sotto osservazione, poiché conidi e/o frammenti di micelio prodotti dal parassita possono facilmente passare da un vaso all'altro tramite schizzi di acqua, soprattutto in presenza di elevata densità colturale. I contenitori riutilizzabili andranno accuratamente disinfettati in soluzioni di ipoclorito di sodio e successivamente risciacquati prima del loro reimpiego. Occorre disinfettare anche i bancali, le stuoie e i teli pacciamanti su cui sono state coltivate le piante recanti i sintomi, cambiando anche l'ambiente di coltivazione delle piante sane. Tutto ciò al fine di evitare il contatto di queste ultime con il terreno e le superfici su cui poggiavano i vasi infetti: infatti, l'acqua di irrigazione può essere un veicolo del parassita, trasferendolo dal substrato contaminato. Infine, sebbene *V. nonalfalfae* non produca microsclerozi nel terreno, è comunque fondamentale allontanare il terriccio contaminato dal parassita o provvedere alla sua disinfestazione con il vapore. Per quanto concerne la lotta

biologica, nei confronti di *V. nonalfalfae* dovrebbe essere saggiata l'efficacia dei prodotti commerciali contenenti *Trichoderma* spp.

Ringraziamenti

Lavoro svolto nell'ambito del progetto "Effective Management of Pests and Harmful Alien Species - Integrated Solutions" (EMPHASIS), realizzato con il contributo del programma di Ricerca e Innovazione dell'Unione Europea Horizon 2020 (Contratto N. 634179).

Lavori citati

- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997) - Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programme. *Nucleic Acids Research*, 25, 389-402.
- Baker K. F., Snyder W. C., Hansen H. N. (1940) - Some hosts of *Verticillium* in California. *Plant Disease Reporter*, 24, 424-425.
- Fletcher J. T., Griffin M. J. (1972) - *Verticillium* Wilt on *Pelargoniums*. *Plant Pathology*, 21, 158-162.
- Garibaldi A., Gullino G. (1973) - Malattie nuove o poco note delle piante da fiore e ornamentali in Italia. *Notiziario sulle Malattie delle Piante*, 88/89, 53-71.
- Inderbitzin P., Bostock R. M., Davis R. M., Usami T., Platt H. W., Subbarao K. V. (2011) - Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS one*, 6 (12), 1-22.
- Maschek O., Halmschlager E. (2016) - First report of *Verticillium* wilt on *Ailanthus altissima* in Europe caused by *Verticillium nonalfalfae*. *Plant Disease*, 100, 529.
- Orlikowski L. B. (1995) - *Verticillium* or *Phytophthora* of pelargonium? *Ochrona Roślin*, 39 (11), 3-4.
- Rebbeck J., Malone M. A., Short P. G., Kasson M. T., O'Neal E. S., Davis D. D. (2013) - First Report of *Verticillium* Wilt Caused by *Verticillium nonalfalfae* on Tree-of-Heaven (*Ailanthus altissima*) in Ohio. *Plant Disease*, 97, 999.
- Snyder A. L., Kasson M. T., Salom S. M., Davis D. D., Griffin G. J., Kok L. T. (2013) - First Report of *Verticillium* Wilt of *Ailanthus altissima* in Virginia Caused by *Verticillium nonalfalfae*. *Plant Disease*, 97, 837.