

Parassiti fogliari riscontrati su nuovi ospiti coltivati in Piemonte e Liguria: *Pseudonectria buxi* su *Buxus microphylla*, *Botrytis cinerea* su *Salvia dorisiana* e *Calendula officinalis*

Domenico Bertetti* - 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)

In questa nota sono descritti i sintomi causati da parassiti fungini sulle parti aeree di tre piante ornamentali: *Buxus microphylla*, *Salvia dorisiana* e *Calendula officinalis*. L'osservazione delle caratteristiche morfologiche degli isolati e le successive analisi molecolari condotte su di essi hanno consentito l'identificazione dei parassiti.

Pseudonectria buxi su *Buxus microphylla* (Fig.1).

Nel giugno 2015, gli apici vegetativi dei rametti di alcune piante di *B. microphylla*, facenti parte di una siepe coltivata in un giardino privato di Settime (AT), presentavano imbrunimenti e disseccamenti ad andamento basipeto. I rami colpiti portavano foglie prima clorotiche e poi bronzee che, infine, disseccavano e cadevano, spogliando il ramo. Fruttificazioni di colore rosa pallido comparivano sulla pagina inferiore delle foglie colpite. Osservate al microscopio ottico, le fruttificazioni erano costituite da acervuli con parafisi lunghe 97,1-274,2 (media: 185,6) μm e contenenti numerosi conidi. Questi ultimi apparivano privi di setti, di forma ellittica - affusolata, con dimensioni di 8,7-14,00 \times 1,9-3,5 (media: 10,9 \times 2,9) μm . Le piante colpite non morivano ma il loro valore estetico e quello della siepe erano compromessi. Dagli isolamenti si ottenevano numerose colonie fungine caratterizzate da micelio prima biancastro, poi rosa arancio che originava rami conidiofori verticillati. I conidi erano ovatoellittici, privi di setti e avevano dimensioni di 3,6-6,5 \times 1,8-3,5 (media: 4,8 \times 2,5) μm . Queste caratteristiche corrispondevano a *Pseudonectria buxi* (Shi e Hsiang, 2014), anche nota come *Volutella buxi*. Le analisi molecolari condotte sul DNA estratto da un isolato monoconidico, impiegando sia i primers ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990), sia una reazione di PCR del gene della beta-tubulina (Shi e Hsiang, 2014), consentivano di identificare l'isolato da *B. microphylla* come *P. buxi* (*V. buxi*). La patogenicità di uno degli isolati era dimostrata irrorando le chiome di 3 piante sane di *B. microphylla* con una sospensione conidica preparata da una coltura *in vitro* del microrganismo. Prima dell'inoculazione artificiale, alcune foglie (10/pianta) erano tagliate, provocando ferite. Tre testimoni



Figura 1 - Disseccamenti causati da *Pseudonectria buxi* su foglia di *Buxus microphylla* e acervoli prodotti dal parassita.
Figure 1 - Symptoms caused by *Pseudonectria buxi* on leaves of *Buxus microphylla* and acervula produced by the pathogen.

erano trattati allo stesso modo, ma irrorati con acqua sterile. Tutte le piante erano chiuse per 3 giorni in camere umide e mantenute a 25°C \pm 1. Trascorsi circa 3 giorni dall'inoculazione, le prime fruttificazioni, costituite da acervuli identici a quelli osservati sulle piante infette, comparivano solo alle estremità delle foglie ferite e inoculate. Successivamente, le foglie disseccavano. Lo stesso parassita inoculato veniva reisolato dalle alterazioni artificialmente prodotte.

Botrytis cinerea su *Salvia dorisiana*

Nell'estate 2015 e nell'autunno successivo, circa 70 piante di *S. dorisiana* coltivate sia in vaso, sia in piena terra, in un giardino privato nella provincia di Biella, presentavano necrosi scure, di forma irregolare, a carico dei lembi fogliari che, a volte, venivano colonizzate da un'efflorescenza grigiastria. Le alterazioni si intensificavano nei periodi di piogge intense, colpendo soprattutto le piante situate più in ombra. Le piante alterate non morivano, tuttavia perdevano il loro valore estetico. Dagli isolamenti, si ottenevano numerose colonie fungine con caratteristiche riconducibili a *Botrytis cinerea* (Ellis, 1971). L'analisi della sequenza ITS (Internal Transcribed Spacer) era condotta su uno degli isolati, utilizzando i primers ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990). La sequenza ottenuta, analizzata con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) (E=0), identificava come *B. cinerea* il parassita isolato da *S. dorisiana*, confermando l'identificazione morfologica.

Uno degli isolati di *B. cinerea* era inoculato, applicando sulle foglie di 3 piante sane di *S. dorisiana* dei dischetti di micelio prelevati da una coltura del fungo cresciuta su PDA. Sulle 3 piante testimoni erano invece applicati dischetti di PDA privi di inoculo. Le piante, chiuse in camera umida, erano mantenute in una serra, soggetta a temperature variabili da 15 a 23°C. Le sole foglie inoculate iniziavano a manifestare i primi sintomi di necrosi circa 5 giorni dopo l'inoculazione e *B. cinerea* veniva reisolata dalle foglie alterate.

Botrytis cinerea su *Calendula officinalis*

Nel marzo 2016, circa 750 piante di *C. officinalis* di 7 mesi, allevate in vaso, in una serra di un'azienda agricola di Albenga (SV), manifestavano clorosi fogliari, imbrunimenti e necrosi della chioma, a partire dalle parti più interne, dove anche i fusti presentavano necrosi ed erosioni. Sulle infiorescenze colpite le ligule avvizzivano e disseccavano, arrotolandosi. Gli attacchi più intensi determinavano la morte delle piante colpite. Dagli isolamenti si sviluppavano le colonie tipiche di *B. cinerea* (Ellis, 1971). L'identificazione morfologica era confermata dall'analisi della sequenza ITS condotta su uno degli isolati. Nel test di patogenicità, uno dei ceppi di *B. cinerea* isolato era coltivato su PDA e la sospensione di conidi e micelio ottenuta dalla coltura era inoculata artificialmente su 3 piante sane di *C. officinalis* allevate in vaso. Le piante inoculate e 3 piante testimoni trattate con acqua sterile erano sistemate in una camera umida (rimossa dopo 5 giorni), collocata in una cella climatica, con temperatura media giornaliera variabile da 26 a 27°C. Le prime clorosi comparivano sulle foglie inoculate dopo circa 4 giorni ed erano seguite da necrosi, marciumi e disseccamenti. *B. cinerea* era reisolata dai tessuti alterati, mentre invece le piante-testimone restavano asintomatiche.

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, 3389-3402.
ELLIS M. B. (1971) - Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 608 pp.
SHI F., HSIANG T. (2014) - *Pseudonectria buxi* causing leaf and stem blight on *Buxus* in Canada. *Eur. J. Plant Pathol.*, 138, 763-773.
WHITE T.J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J.W. (1990) - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications, Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. Editors, Academic Press, San Diego, California, USA, 315–322.

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

Domenico Bertetti* - Sara Franco Ortega* - Pietro Pensa* - 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)

In questa nota sono riportate le alterazioni causate da *Verticillium nonalfalfae* su *Pelargonium grandiflorum*, registrate in Liguria e osservate per la prima volta nel nostro Paese. Vengono descritti i sintomi, le caratteristiche morfologiche osservate *in vitro* e le analisi molecolari condotte sugli isolati.

Nella primavera 2015, alcune piante di *P. grandiflorum* cv Fabiola, di circa 6 mesi di età, coltivate in vaso, in una serra localizzata presso un'azienda floricola di Albenga (SV), manifestavano i sintomi qui descritti. Le foglie e i piccioli presentavano clorosi, ingiallimenti, avvizzimenti e disseccamenti, con andamento acropeto. I fusti avvizzivano e diventavano bruno-nerastri, seguendo lo stesso andamento. I vasi conduttori, osservati in sezione, apparivano imbruniti. (Fig.1). Infine, le piante colpite morivano. Dagli isolamenti, effettuati su substrato PDA (Potato Dextrose Agar), partendo dai fusti di piante recanti sintomi, si sviluppavano numerose colonie fungine con micelio aereo che prima era bianco, mentre a maturità diveniva grigio-verde scuro. Da queste colonie erano ricavati gli isolati monoconidici su cui erano osservate le caratteristiche morfologiche del fungo. Il micelio era costituito da ife settate che producevano rami conidiofori ramificati, dotati di setti, questi ultimi più ravvicinati alle estremità, a supporto di fialidi subulate, riunite in verticilli. Le fialidi portavano i conidi ialini, di forma da ovale ad ellittica con estremità arrotondate, di 3,1-6,7 × 1,7-3,5 (media: 5,1 × 2,5) µm. Il fungo non produceva microsclerozi.

Dal micelio di uno degli isolati monoconidici era estratto il DNA. Le reazioni di PCR sul DNA estratto erano effettuate utilizzando primers specifici per *Verticillium* (Inderbitzin *et al.*, 2011). Venivano amplificati i seguenti geni: elongation factor 1-alpha (EF), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GPD) e actina (ACT). I prodotti di PCR, purificati e sequenziati, consentivano di ottenere sequenze di 653, 708 e 560 paia di basi rispettivamente (Genbank accession numbers KU840911, KU840909 e KU840907). Le loro analisi, effettuate con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997), identificavano il fungo isolato da *P. grandiflorum* come *Verticillium nonalfalfae*.

La patogenicità di uno degli isolati monoconidici era provata inoculandolo artificialmente su 5 piante apparentemente sane di *P. grandiflorum* cv Fabiola. L'inoculazione avveniva immergendo le radici delle piante in una sospensione conidica del fungo, ottenuta in substrato PDB (Potato Dextrose Broth) e usata alla concentrazione finale di 3×10⁶