

## RICERCA

# Attacchi di *Botrytis cinerea* su *Calendula officinalis* coltivata 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

Nell'inverno 2016 e nella successiva primavera, numerose piante di *Calendula officinalis* allevate in vaso, presso un'azienda floricola di Albenga (SV), presentavano le alterazioni descritte in questa nota. Il parassita fungino isolato da foglie, piccioli, fusti e ligule delle infiorescenze era identificato come *Botrytis cinerea* dalle caratteristiche morfologiche osservate sulle colture *in vitro* e dall'analisi della sequenza ITS (Internal Transcribed Spacer). Da quanto emerso in bibliografia scientifica, questa è la prima volta che *B. cinerea* viene segnalata su *C. officinalis* nel nostro Paese.

**Parole chiave:** ornamentali; fiorrancio coltivato; muffa grigia.

## Summary

### First report of *Botrytis cinerea* on *Calendula officinalis* observed in Italy

In the winter 2016 and in the following spring, symptoms of grey mould described in this note were observed on several potted plants of *Calendula officinalis* growing in a farm in Albenga (Savona province, Northern Italy). *Botrytis cinerea* was isolated from leaves, petioles, stems and ligules of inflorescences of affected plants. The identification of the pathogen was carried out by the observation of features of colonies, conidia and conidiophores observed *in vitro* and with the ITS (Internal Transcribed Spacer) analysis. *B. cinerea* is reported on *C. officinalis* for the first time in Italy.

**Key words:** ornamental plants; pot marigold; grey mould.

## Introduzione

*Calendula officinalis*, famiglia Asteraceae, è una specie annuale, rustica, adatta a costituire bordure che, in Liguria, viene coltivata sia per la commercializzazione di vasi fioriti, sia per la produzione di fiori recisi. Di questa specie sono presenti numerosissime cultivar, tutte dai capolini molto colorati ed appariscenti. In questa nota sono descritti i sintomi comparsi su piante di *C. officinalis*, allevate in una azienda agricola ligure.

## Sintomi riscontrati ed identificazione dei parassiti

Nel mese di marzo 2016, 2500 piante di *C. officinalis* di 7 mesi erano allevate in vasi (diam. 14 cm) in tinta coccio, coltivati su un telo pacciamante scuro, collocato all'interno di una serra in ferro-vetro, presso un'azienda agricola di Albenga (SV). Le piante erano irrigate con impianto di distribuzione dell'acqua localizzato vaso per vaso. Circa il 30% delle piante coltivate



Figura 1 - Attacchi di *Botrytis cinerea* su piante di *Calendula officinalis* allevate in vaso.

Figure 1 - Symptoms of grey mould caused by *Botrytis cinerea* on potted plants of *Calendula officinalis*.

manifestava i sintomi di seguito descritti. Le foglie delle piante colpite presentavano clorosi e necrosi che determinavano l'imbrunimento dei tessuti e la loro marcescenza, a partire dalle parti più interne della chioma (Figura 1). Qui, i fusti presentavano necrosi ed apparivano erosi e nerastri. Anche le infiorescenze erano colpite e le ligule si arrotolavano,



Figura 2 - Sintomi di muffa grigia causati da *Botrytis cinerea* su ligule e foglie di *Calendula officinalis*: particolare.

Figure 2 - Grey mould caused by *Botrytis cinerea* on leaves and ligules of *Calendula officinalis*: detail.

avvizzivano e disseccavano (Figura 2). In seguito agli attacchi più gravi le piante colpite morivano. Numerose foglie, piccioli, fusti e ligule erano disinfettati in ipoclorito di sodio (1%) per circa 10 secondi e, successivamente, accuratamente risciacquati in acqua sterile. Quindi, numerosi frammenti erano prelevati dai tessuti su indicati, lungo i margini delle alterazioni e depositati su terreno di coltura PDA (Potato Dextrose Agar). Nelle piastre con gli isolamenti, mantenute ad una temperatura variabile da 20 a 23°C, si sviluppavano colonie con micelio grigiastro, tipiche di *Botrytis cinerea* che generavano rami conidiofori ramificati e conidi unicellulari, ovoidali, grigiastri se in massa, aventi dimensioni di  $12,7-7,7 \times 9,1-5,4$  (media:  $9,6 \times 7,2$ )  $\mu\text{m}$ . Gli stessi isolati, conservati alla temperatura di  $8^\circ\text{C} \pm 1$ , producevano sclerozi scuri e sferoidali, a volte allungati, aventi dimensioni da 0,5 a 2,1 mm. Anche queste caratteristiche, assieme a quelle precedentemente descritte, corrispondevano con quanto riportato per *B. cinerea* (Ellis, 1971).

L'analisi della sequenza ITS (Internal Transcribed Spacer) confermava questa identificazione. L'estrazione del DNA del fungo avveniva a partire dalla colonia di un isolato (DB16APR03) coltivato *in vitro*, impiegando l'E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (OMEGA Bio-Tek). Una reazione di PCR veniva condotta sul DNA estratto utilizzando i primers ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990). Il prodotto dell'amplificazione veniva sequenziato, ottenendo una sequenza di 455 paia di basi (Gene Bank accession number KX458182) che era successivamente analizzata con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) ( $E = 0$ ). La sequenza mostrava il 100% di similarità con diverse sequenze di *B. cinerea*, tra cui KT582111, confermando quanto già desunto dalle osservazioni morfologiche.

### Inoculazione artificiale e riproduzione dei sintomi

Per soddisfare i postulati di Koch, tre piante sane di *C. officinalis* allevate in vaso, di 9 mesi, erano inoculate artificialmente con uno dei ceppi di *B. cinerea* isolati (DB16APR03). Le colture del fungo erano coltivate in purezza, su PDA, per 10 giorni. Quindi, dalle colture *in vitro* era ottenuta una sospensione di conidi e micelio che veniva irrorata sulla chioma delle piante (circa 25 ml/pianta) alla concentrazione finale di  $4 \times 10^5$  CFU/ml. Tre piante-testimone erano irrorate con acqua sterilizzata. Tutte le piante erano sistemate in una cella climatica, all'interno di una camera umida, rimossa dopo 5 giorni, dove la temperatura media giornaliera variava da 26 a 27°C e l'U.R. da 76 a 88%. Dopo circa 4 giorni, i primi sintomi di clorosi comparivano solamente sulle foglie inoculate. Questi erano seguiti da necrosi e marciumi, da cui veniva reisolata *B. cinerea*. Circa 11 giorni dopo l'inoculazione artificiale, le piante inoculate apparivano disseccate. Invece, nessun sintomo compariva sulle piante-testimone.

### Conclusioni

*B. cinerea* su *C. officinalis* è stata riportata negli Stati Uniti (Cash, 1953), in Scozia (Foister, 1961) e, più recentemente, in Cina (Zhang, 2006). Non essendoci altre segnalazioni ufficiali, riteniamo che la presenza di *B. cinerea* su *C. officinalis* venga segnalata per la prima volta in Italia.

Studi condotti su *C. officinalis* hanno dimostrato che *B. cinerea* può colonizzare i semi (Neergaard, 1948; Pieta, 1991) e causare danni gravi alle coltivazioni che ne derivano (Shrotri *et al.*, 1985). Pertanto, per prevenire la presenza e la diffusione di questo parassita su *C. officinalis*, occorre partire da semi sani. Da osservazioni condotte in campo sulle piante colpite, *B. cinerea* sembra colonizzare, in qualità di saprofito, il primo bocciolo emesso dalla pianta che, probabilmente per ragioni legate alla luce, non riesce a completare il ciclo, rimanendo per lungo tempo in una condizione di mancato sviluppo, esposto perciò all'attacco del fungo. Da qui, quando le condizioni ambientali lo favoriscono, il parassita passa ad infettare le parti sane della chioma, soprattutto quelle più interne ed umide. Pertanto, la rimozione dei capolini sfioriti o abortiti può attenuare o evitare l'insorgere di attacchi sull'intera chioma. Inoltre, l'adozione di tecniche di coltivazione non favorevoli al microrganismo (quali l'utilizzo di ambienti ben ventilati e l'esclusione dell'irrigazione a pioggia) costituisce la premessa fondamentale per prevenire l'infezione del parassita. Altrettanto importante è evitare gli eccessi di concimazioni azotate. Per quanto riguarda la lotta chimica, occorre verificare l'efficacia dei principi attivi antibotritici ammessi sulle colture ornamentali e da fiore, quali prodotti rameici, iprodione, pyraclostrobin + boscalid, tiofanate metile (solo per le colture in campo), ciprodinil + fludioxonil, valutando anche l'eventuale insorgere di fenomeni di fitotossicità.

### 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.
- Cash E. K. (1953) - A checklist of Alaskan fungi. *Plant Disease Reporter Supplement*, 219, 1-70.
- Ellis M. B. (1971) - *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England, 608 pp.
- Foister C. E. (1961) - The economic plant diseases of Scotland. *Technical Bulletin Department of Agriculture and Fisheries for Scotland*, 1, 1-210.
- Neergaard P. (1948) - Eleventh annual report from the J. E. Ohlsen phytopathological laboratory. 1<sup>st</sup> August, 1945, to 31<sup>st</sup> July 1947.
- Pieta D. (1991) - Mycoflora of *Calendula officinalis* L. seeds. *Acta Agrobotanica* 44 (1-2), 49-53.
- Shrotri S. C., Gupta J. S., Srivastava R. N. (1985) - Seed-borne fungi of *Calendula officinalis* and their control. *Indian Phytopathology*, 38 (1), 142-143.
- Zhang Z. (2006) - Flora Fungorum Sinicorum. Vol. 26. *Botrytis, Ramularia*. Science Press, Beijing, 277 pages.