

## RICERCA

# Attacchi di *Pseudonectria buxi* (DC.) Seifert, Gräfenhan & Schroers su *Buxus microphylla* Siebold & Zucc. coltivato in Italia

Domenico Bertetti\* - Giuseppe Ortu\* - 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 del mese di giugno 2015, alcune piante di *Buxus microphylla* di una siepe situata in un giardino privato nei pressi di Settime (AT) presentavano le alterazioni di foglie e fusti descritte in questa nota. Il fungo agente della malattia veniva isolato dalle estremità dei rami colpiti ed identificato come *Pseudonectria buxi* in base alle fruttificazioni fogliari osservate *in vivo* e alle caratteristiche morfologiche prodotte *in vitro* dagli isolati. Sia l'analisi della sequenza ITS (Internal Transcribed Spacer), sia la successiva analisi molecolare condotta con primers specifici per *P. buxi* confermavano l'identificazione del parassita. Infine, sono illustrati alcuni criteri per prevenire e contrastare la diffusione di questo microrganismo, la cui presenza su *B. microphylla* è qui segnalata per la prima volta nel nostro Paese.

**Parole chiave:** piante ornamentali; necrosi fogliari; necrosi del fusto; *Volutella buxi*; *Pseudonectria rousseliana*.

## Summary

**Presence of *Volutella* blight caused by *Pseudonectria buxi* (DC.) Seifert, Gräfenhan & Schroers on Japanese Boxwood (*Buxus microphylla* Siebold & Zucc.) grown in Italy**

During June 2015, leaf and stem blight were observed on plants of *Buxus microphylla* belonging to an hedge located in a private garden in the Asti province (northern Italy). Symptoms are reported. The fungal causal agent of the disease was isolated from affected stems and identified as *Pseudonectria buxi* on the basis of the features of acervula and conidia produced on affected leaves and observed *in vivo* and by morphological characteristics of conidia and conidiophores produced *in vitro*. The ITS (Internal Transcribed Spacer) analysis and a molecular analysis carried out using specific primers for *P. buxi*, both confirmed the identification. Finally, some strategies to prevent and to control the diffusion of this pathogen are discussed. *P. buxi* is reported on *B. microphylla* for the first time in Italy.

**Key words:** ornamental plants; littleleaf boxwood; leaf blight; stem blight; *Volutella buxi*; *Pseudonectria rousseliana*.

## Introduzione

Molte specie appartenenti al genere *Buxus*, famiglia Buxaceae, vengono largamente impiegate nella realizzazione di siepi sempreverdi e nell'arte topiaria (Pherson, 2005). Tra queste, una delle più diffuse è *B. microphylla* Siebold & Zucc., specie arbustiva a lenta crescita su cui viene qui riportata la malattia di recente osservata in Piemonte e descritta per la prima volta nel nostro Paese.

## Sintomi riscontrati ed identificazione del parassita

Nel mese di giugno 2015, in un giardino privato situato nei pressi



Figura 1 - Sintomi causati da *Pseudonectria buxi* su piante di *Buxus microphylla* allevate in siepe.

Figure 1 - Symptoms caused by *Pseudonectria buxi* on plants of *Buxus microphylla* belonging to an hedge.

di Settime (AT), una siepe costituita da circa 60 esemplari di *B. microphylla* recava le alterazioni di seguito descritte. Alcuni apici vegetativi dei rametti apparivano imbruniti e presentavano disseccamento con andamento basipeto. Le foglie distribuite sui rami colpiti in un primo tempo divenivano clorotiche, poi bronzee e, infine, disseccavano assumendo colore paglierino. Le foglie cadevano, lasciando spoglio il ramo (Figure 1, 2). Sulla



Figura 2 - Disseccamento di foglie e rami causati da *Pseudonectria buxi* su piante di *Buxus microphylla*: particolare.

Figure 2 - Leaf and stem blight caused by *Pseudonectria buxi* on plants of *Buxus microphylla*: detail.



Figura 3 - Acervuli prodotti da *Pseudonectria buxi* sulla pagina inferiore di una foglia di *Buxus microphylla*.

Figure 3 - Acervula produced by *Pseudonectria buxi* on the lower leaf surface of *Buxus microphylla*.

pagina inferiore delle foglie colpite era possibile osservare la presenza di fruttificazioni di colore rosa pallido (Figura 3) che, osservate al microscopio ottico, apparivano costituite da acervuli dotati di parafisi lunghe 97,1-274,2 (media: 185,6)  $\mu\text{m}$  (Figura 4). Gli acervuli liberavano numerosi conidi unicellulari, ellittici, affusolati, aventi le dimensioni di 8,7-14,00  $\times$  1,9-3,5 (media: 10,9  $\times$  2,9)  $\mu\text{m}$ . La malattia colpiva circa il 10% delle piante della siepe che non morivano in seguito agli attacchi ma perdevano il loro valore estetico, anche in seguito alle successive, intense potature di rimonda. Alcuni campioni di *B. microphylla* erano prelevati dai rami colpiti e da essi erano effettuati gli isolamenti. Dopo il lavaggio per circa 30 secondi in acqua e ipoclorito di sodio (1%), i rametti erano accuratamente risciacquati in acqua sterile e dai loro tessuti posti al confine con le estremità necrotizzate, erano prelevati numerosi frammenti che venivano distribuiti in piastre Petri contenenti PDA (Potato, Dextrose, Agar). Dagli isolamenti si ottenevano costantemente le colonie di un fungo da cui erano ricavati gli isolati monoconidici per le successive osservazioni ed analisi. Il fungo era costituito da un micelio prima biancastro che, a maturità, assumeva colore rosa arancio (Figura 5) e che generava rami conidiofori verticillati (Figura 6) e conidi unicellulari, di forma ovata-ellittica e dimensioni di 3,6-6,5  $\times$  1,8-3,5 (media: 4,8  $\times$  2,5)  $\mu\text{m}$ . Nelle colonie allevate *in vitro* non venivano prodotti acervuli. Le caratteristiche dell'isolato da *B. microphylla* corrispondevano a quelle riportate per *Pseudonectria buxi* (Shi e Hsiang, 2014a), parassita fungino noto anche come *Volutella buxi* o *Pseudonectria rousseliana*.

L'identificazione morfologica era confermata dall'analisi ITS (Internal Transcribed Spacer) condotta estraendo il DNA del fungo da una coltura dell'isolato monoconidico DB15GIU06M1, allevato su PDA, impiegando il Nucleospin Plant kit (Macherey Nagel). La reazione di PCR condotta sul DNA estratto mediante l'impiego dei primer ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990), consentiva di ottenere una sequenza di 490 paia di basi (Gene Bank accession number KT736315) che, analizzata con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) (E = 0), identificava come *Volutella buxi*, sinonimo di *P. buxi*, il microorganismo isolato da *B. microphylla*. Inoltre, il DNA estratto dallo stesso isolato DB15GIU06M1 era impiegato per una reazione di PCR del gene della beta-tubulina (Shi e

Hsiang, 2014a). L'analisi della sequenza di 590 paia di basi (KU665623) ottenuta confermava l'identificazione di *V. buxi*.

### Inoculazione artificiale e riproduzione dei sintomi

Per dimostrare la patogenicità del fungo isolato da *B. microphylla*, 3 piante dello stesso ospite, apparentemente sane, allevate in vaso e di 3 anni, erano inoculate artificialmente con l'isolato monoconidico DB15GIU06M1. Immediatamente prima della inoculazione artificiale, le foglie delle piante utilizzate (10 per pianta) erano tagliate circa a metà, in modo da provocare ferite. L'inoculo era ottenuto allevando il fungo su PDA, per circa 10 giorni. Successivamente, dalla coltura *in vitro* era ottenuta una sospensione conidica del microorganismo che veniva irrorata sulla chioma delle piante sane (5 ml/pianta), alla concentrazione di  $1 \times 10^8$  CFU/ml. Tre piante usate come testimoni venivano trattate allo stesso modo ma irrorate con acqua sterile. Tutte le piante erano chiuse in camere umide (rimosse dopo 3 giorni) e collocate in una cella climatica mantenuta a  $25^\circ\text{C} \pm 1$ . Circa 3 giorni dopo l'inoculazione, alle estremità delle sole foglie tagliate e inoculate comparivano le prime fruttificazioni, i cui acervuli erano identici a quelli descritti, accompagnate da alterazioni di colore. Poi le alterazioni si estendevano alla parte di lembo rimasta che, infine, disseccava. Dalle foglie colpite era possibile reisolare lo stesso parassita inoculato, soddisfacendo i postulati di Koch. I testimoni restavano invece asintomatici.

### Conclusioni

Su *P. buxi* esiste una bibliografia piuttosto estesa che, a partire dai primi decenni del secolo scorso, annovera questo fungo tra i principali parassiti di *Buxus* spp. Negli Stati Uniti, *Volutella buxi* (= *P. buxi*) è stata riportata su *B. sempervirens* (Dodge e Swift, 1930), su *B. sempervirens* e *B. suffruticosa* (Andrus, 1934), su *B. sempervirens* e su *Buxus* sp. (Farr *et al.*, 1989). In Spagna, sempre su *B. sempervirens*, è stato osservato *Chaetodochium buxi* (Sin.: *V. buxi*) (Urquijo, 1944). Un'accurata descrizione di *P. rousseliana* su bosso è stata fornita da Bezerra (1963). Molto più recentemente, uno studio condotto con molti isolati di questo parassita ottenuti in Canada ha consentito di disegnare primers specifici per la sua identificazione molecolare, ha saggiato la suscettibilità di alcune cultivar di *B. sempervirens* e ha stabilito che questo microorganismo si comporta da parassita primario, in grado di infettare per ferita i tessuti di fusti e foglie (Shi e Hsiang, 2014a). Infine, altrettanto recente è la segnalazione avvenuta in Cina di *P. buxi* su *B. sinica* var. *insularis* (Shi e Hsiang, 2014b). Al fine di prevenire gli attacchi di *P. buxi* su *B. microphylla* e, in generale su *Buxus* spp., oltre ad osservare le consuete buone pratiche agronomiche, soprattutto l'irrigazione tramite ala gocciolante, l'aerazione delle chiome sia in vivaio, sia in siepe e tutto ciò che favorisce la crescita vigorosa della pianta, particolare attenzione va posta nei confronti delle potature, poiché questo parassita agisce attraverso ferite. Pertanto, le potature vanno ridotte allo stretto necessario, soprattutto durante l'emissione dei giovani germogli. Infatti, è stato dimostrato che l'età dei tessuti fogliari svolge un ruolo determinante nella gravità degli attacchi, risultando questi molto meno intensi su foglie di un anno rispetto a quelle di un mese (Shi e Hsiang, 2014a). Altrettanto pericolosi sono gli eventi meteorici, quali grandine o gelo. In prove di lotta preventiva condotte in Canada, tra i principi attivi registrati nel nostro Paese su piante ornamentali, il propiconazolo ha dimostrato buona efficacia nel contenere il parassita inoculato artificialmente su *B. sempervirens* (Shi e Hsiang, 2015). In fase preventiva andrebbe saggiata anche l'efficacia dei prodotti rameici. In prove di suscettibilità condotte su alcune cultivar



Figura 4 - Acervolo prodotto da *Pseudonectria buxi* e osservato in vivo su foglia di *Buxus microphylla*.  
Figure 4 - Acervulus produced by *Pseudonectria buxi* and observed in vivo on a leaf of *Buxus microphylla*.



Figura 5 - Colonia di *Pseudonectria buxi* isolata da ramo di *Buxus microphylla* e allevata su terreno PDA (Potato, Dextrose, Agar).  
Figure 5 - A colony of *Pseudonectria buxi* isolated from affected stem of *Buxus microphylla* and grown on medium PDA (Potato, Dextrose, Agar).

di *B. sempervirens* (“Green Gem”, “Green Mountain”, “Green Velvet”, “Green Mound”, “Pincushion”), tutte le cultivar saggiate sono risultate suscettibili: “Green Gem” è risultata quella più suscettibile, “Pincushion” quella meno suscettibile (Shi e Hsiang, 2014a). Occorrerebbe saggiare la suscettibilità di un maggior numero di cultivar di *Buxus* spp., scelte anche tra quelle di *B. microphylla*.

Se il parassita è già presente, occorre intervenire con potature di rimonda, tagliando i rami colpiti al di sotto delle necrosi, allontanando e bruciando i tessuti asportati e anche i residui di potatura. Sebbene *P. buxi* generalmente non causi la morte della pianta ospite, la necessità di praticare le potature di risanamento, causa sovente danni estetici alle piante e, con essi, la perdita di valore economico. Nel medesimo studio precedentemente citato, il propiconazolo ha mostrato efficacia anche in fase di lotta curativa, contenendo bene l’azione del parassita artificialmente inoculato (Shi e Hsiang, 2015).

### 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.  
Andrus C. F. (1933) – Fungous flora accompanying decline of Boxwood. *Plant Disease Reporter*, 17 (14), 169-170.  
Bezerra J. L. (1963) – Studies on *Pseudonectria rousseliana*. *Acta Botanica Neerlandica*, 12, 58.  
Dodge B. O., Swift M. E. (1930) – Notes on Boxwood troubles. *Journal of the New York Botanical Garden*, 31 (368), 191-198.  
Farr D. F., Bills G. F., Chamuris G. P., Rossman A. Y. (1989) - *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS Press, St. Paul, Minnesota, Stati Uniti, 1252 pp.  
Pherson C. (2005) – Boxwood – *Buxus microphylla*. *Landscape & irrigation*, 29, 38.

Shi F., Hsiang T. (2014a) - *Pseudonectria buxi* causing leaf and stem blight on *Buxus* in Canada. *European Journal of Plant Pathology*, 138, 763-773.

Shi F., Hsiang T. (2014b) – First report of *Pseudonectria buxi* causing Volutella blight on boxwood (*Buxus* sp.) in Beijing, China. *Plant Disease* 98 (9), 1282-1283.

Shi F., Hsiang T. (2015) – Chemical management of Volutella leaf and stem blight of boxwood. *European Journal of Plant Pathology*, 142 (1), 107-115.

Urquijo P. (1944) – *Mycosphaerella patouillardii* Sacc. and other folliicolous fungi of Box. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola*, Madrid, 13, 135-140.

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. coord.), Academic Press, San Diego, California, USA, 315–322.



Figura 6 - Ramo conidioforo verticillato e conidi di *Pseudonectria buxi* isolata da *Buxus microphylla* e prodotti su terreno PDA (Potato, Dextrose, Agar).  
Figure 6 - Verticillate phialides produced by *Pseudonectria buxi* isolated from *Buxus microphylla* and grown on medium PDA (Potato, Dextrose, Agar).