

RICERCA

Diaporthe eres Nitschke, agente di marciume su frutti di pero in Italia

Domenico Bertetti* - Vladimiro Guarnaccia** - Davide Spadaro*,*** - Maria Lodovica Gullino*,***

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

** Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Paesi Bassi

*** DiSAFA, Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

Riassunto

Sono descritti i sintomi di un marciume osservato, a partire dall'estate del 2014, su numerosi frutti prodotti da un albero di una vecchia varietà di pero (*Pyrus communis* L.), allevato in un giardino privato del Piemonte. Vengono descritte le caratteristiche morfologiche del fungo isolato e allevato *in vitro* (colonie, range di accrescimento, forma e dimensioni di α e β -conidi) che hanno consentito di attribuire il microrganismo al genere *Phomopsis* (anamorfo di *Diaporthe*).

La successiva analisi molecolare, condotta tramite sequenziamento e filogenesi di cinque loci genici,

identificava il fungo come *Diaporthe eres* Nitschke. Il test di patogenicità dimostrava la virulenza di uno degli isolati. Infine, vengono discussi alcuni criteri da adottare per prevenire e contenere la diffusione di questo parassita che viene segnalato su *P. communis* per la prima volta in Italia

Parole chiave: *Pyrus communis*; *Phomopsis oblonga*; marciume dei frutti.

Summary

First report of fruit rot caused by *Diaporthe eres* Nitschke on European pear cultivated in Italy

In the summer of 2014 and in the following years, a new rot was observed on several fruits of an old cultivar of European pear (*Pyrus communis* L.) grown in a private garden located in Piedmont (northern Italy). Symptoms on decayed fruits are described. The fungal causal agent of the disease was isolated from affected fruits. The features of the microorganism observed *in vitro* (colonies, range of growth, α and β -conidia) are reported. These permitted to attribute the isolates to the genus *Phomopsis* (anamorph of *Diaporthe*). Afterwards, the molecular analysis carried out with sequencing and phylogenesis of five genic loci, identified the pathogen as *Diaporthe eres* Nitschke. The pathogenicity of one of the isolates was confirmed reproducing rots on artificially inoculated healthy European pear fruits. Finally, some strategies are discussed to prevent and to control *D. eres* on *P. communis* on which this pathogen is reported for the first time in Italy.

Key words: *Pyrus communis*; *Phomopsis oblonga*; fruit rot.



Figura 1 - Vetusto esemplare di pero (*Pyrus communis*), appartenente ad una vecchia varietà coltivata in Piemonte, i cui frutti sono stati colpiti da *Diaporthe eres*.

Figura 1 - Old European pear tree (*Pyrus communis*) belonging to an ancient variety cultivated in Piedmont, producing fruits affected by *Diaporthe eres*.

Introduzione

La coltivazione del pero (*Pyrus communis* L.) occupa, nel nostro Paese, una superficie di circa 29.000 ha, con una produzione annuale che, nel 2017, ha superato i sette milioni di quintali di prodotto raccolto (<http://agri.istat.it>). In Italia, le varietà coltivate nei secoli scorsi sono state numerose, come testimoniano le bellissime tavole ottocentesche di elevato pregio artistico della Pomona Italiana (Gallesio, 1839) e la successiva dettagliata descrizione di Girolamo Molon (1901). Nel corso del tempo, il numero di varietà si è progressivamente ridotto, a vantaggio di quelle più adatte ai sistemi produttivi delle aziende moderne. In questi ultimi anni, un rinnovato interesse ha coinvolto gli antichi frutti ed enti di ricerca, operatori del settore e associazioni di semplici appassionati hanno contribuito alla loro riscoperta, con la finalità di preservarne il patrimonio genetico. Numerose vecchie varietà di pero sono state recuperate



Figura 2 - Marciume causato da *Diaporthe eres* su frutti di una vecchia varietà di pero allevata in Piemonte: sezione.

Figure 2 - Fruit rot caused by *Diaporthe eres* on fruits belonging to an ancient cultivar of European pear grown in Piedmont: sections of a decayed fruit.

anche in Piemonte, come documentano le schede redatte dalla omonima Regione (<http://www.regione.piemonte.it>).

Sintomi riscontrati ed identificazione del patogeno

Durante il mese di agosto 2014 e nelle estati successive, i frutti prodotti da una pianta vetusta e di notevoli dimensioni (Figura 1), appartenente ad una vecchia varietà di pero, coltivata in un giardino privato situato a Torre Canavese (TO), recavano i sintomi qui descritti. I frutti colpiti cadevano all'approssimarsi della maturazione senza presentare esternamente alcuna evidente alterazione, se non la presenza di lievi imbrunimenti di consistenza molliccia. Sezionati longitudinalmente, i frutti presentavano un marciume molle, di colore marrone, che, a partire dall'interno, coinvolgeva gran parte del mesocarpo (Figura 2). E' possibile che l'infezione provenisse dalla cavità calicina e/o da quella peduncolare. Le alterazioni descritte venivano riscontrate su gran parte dei frutti prodotti. Da alcune pere colpite erano effettuati gli isolamenti, utilizzando terreno di coltura costituito da patata, destrosio, agar (PDA, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), distribuito in piastre Petri sterili di 90 mm. Gli isolamenti venivano effettuati asportando una parte dell'epicarpo con la lama di un bisturi sterilizzata su fiamma e prelevando frammenti di pericarpo (3×3×3mm circa) lungo i margini dei tessuti marcescenti. Dagli isolamenti si sviluppavano numerose colonie fungine costituite da micelio sottile, in un primo tempo biancastro, poi grigiastro, che erano purificate tramite successivi passaggi su PDA. Su questo substrato, alcune colonie erano allevate in purezza, a partire da dischetti di micelio (diam. 6 mm) posti al centro di piastre Petri (diam. 90 mm), in alternanza luce/buio (14h; 10h), alla temperatura di 25°C ±1. Dopo circa 10 giorni di accrescimento, le colonie apparivano formate da micelio grigiastro, piuttosto aereo che costituiva anelli concentrici (Figure 3a, 3b). Dopo circa 20 giorni di accrescimento, le stesse colonie generavano picnidi contenenti numerosissimi conidi di due diversi tipi. Gli α conidi erano ialini, unicellulari, ellissoidali, affusolati, ed avevano le dimensioni di 4,2 - 9,3 × 1,1 - 3,3 (media: 6,2 × 2,1) μm (n = 50). I β conidi, anch'essi ialini e unicellulari, erano

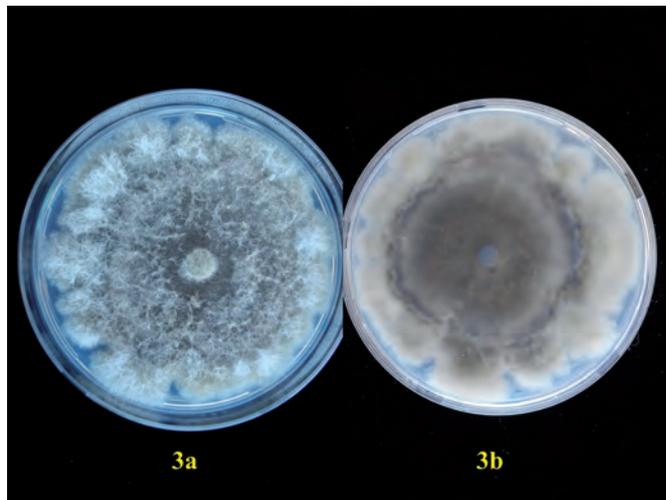


Figura 3a - Colonia di *Diaporthe eres* isolata da frutti di pero e allevata per 10 giorni su substrato PDA (lato superiore). Figura 3b - La stessa colonia osservata dal lato inferiore.

Figure 3a - A colony of *Diaporthe eres* isolated from rotted fruits of European pear and grown on PDA medium for 10 days: from above. Figure 3b - The same colony at the bottom.

filiformi e ricurvi, con dimensioni di 13,5 - 29,7 × 0,6 - 1,4 (media: 20,8 × 1,0) μm (n = 50) (Figura 4). L'accrescimento medio giornaliero di uno degli isolati (DB14AGO27) era determinato ponendo tre dischetti (diam. 6 mm) prelevati da una sua coltura allevata su PDA, al centro di tre piastre Petri contenenti lo stesso substrato, poi mantenute a 25°C costanti, in assenza di luce. Il diametro di ciascuna colonia veniva rilevato quotidianamente per 7 giorni, ottenendo un accrescimento medio giornaliero finale di 7,4 mm. Le caratteristiche morfologiche generali descritte coincidono con quanto riportato per il genere *Phomopsis*, anamorrofo di *Diaporthe* (Gomes *et al.*, 2013).

Alla luce della moderna tassonomia basata su analisi di tipo molecolare, l'identificazione avveniva attraverso il sequenziamento e la filogenesi di cinque *loci* genici (ITS, *tef1*, *cal*, *his3* e *tub2*) comunemente utilizzati nelle analisi molecolari all'interno del genere *Diaporthe* (Guarnaccia e Crous, 2017). L'isolato DB14AGO27 veniva sottoposto



Figura 4 - α-conidi e β-conidi prodotti *in vitro* da picnidi di *Diaporthe eres* isolata da frutti di pero e coltivata su PDA.

Figure 4 - α and β-conidia produced *in vitro* by picnidia of *Diaporthe eres* isolated from decayed fruits of European pear and cultivated on PDA medium.

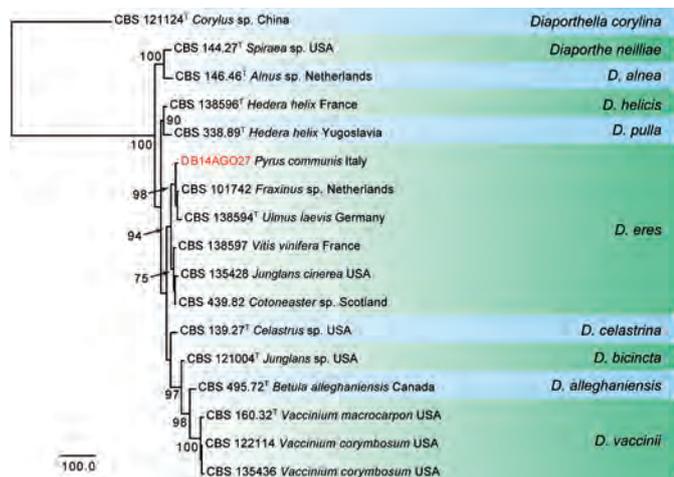


Figura 5 - Albero filogenetico ottenuto con sequenze ITS, *tef1*, *cal*, *his3* e *tub2*. I valori di bootstrap sono indicati ai nodi dell'albero. L'isolato DB14AGO27 è evidenziato in rosso. L'isolato CBS 121124 della specie *Diaporthe corylina* rappresenta la radice dell'albero filogenetico. I ceppi tipo delle specie presenti sono indicati con ^T.

Figure 5 - Phylogenetic tree of ITS, *tef1*, *cal*, *his3* and *tub2* sequences. Bootstrap support values are shown at the nodes. The isolate DB14AGO27 is shown in red. The scale bar represents the number of changes. The tree was rooted to *Diaporthe corylina* (CBS 121124). The ex-type isolates are indicated with ^T.

ad estrazione del DNA. I cinque *loci* selezionati venivano amplificati mediante PCR e, successivamente, i prodotti della PCR venivano sequenziati. Al fine di identificare la specie di appartenenza dell'isolato DB14AGO27, un'analisi filogenetica veniva effettuata combinando le sequenze dei cinque *loci* scelti. Le sequenze ITS, *tef1*, *cal* e *his3* (GenBank Accession Numbers: MH063907, MH063913, MH063895, MH063901) e la sequenza *tub2* (GenBank Accession Number: MH063919) mostravano rispettivamente il 99% e il 100% di similitudine con le seguenti sequenze di *Diaporthe eres* Nitschke: CBS 138594, KJ210529, KJ210550, KJ434999, KJ420850, KJ420799 (Udayanga *et al.*, 2014). Nell'albero filogenetico ottenuto (Figura 5), i valori derivano dall'analisi bootstrap, l'isolato CBS 121124 (*Diaporthe corylina*) rappresenta la radice dell'albero filogenetico e l'isolato DB14AGO27 (in rosso) oggetto di questo studio si inserisce nel gruppo di *Diaporthe eres*, permettendo di attribuire a questa specie il microrganismo ottenuto da *P. communis*.

Inoculazione artificiale e saggi di patogenicità

Per dimostrare la patogenicità di *D. eres* isolata da pere e soddisfare i postulati di Koch, 4 pere apparentemente sane della cv Abate Fétel venivano inoculate artificialmente con l'isolato DB14AGO27. L'inoculo consisteva in una sospensione di α e β conidi ricavata da una coltura del fungo allevata su PDA e mantenuta per 20 giorni alla temperatura di $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, in alternanza luce/buio (14h; 10h). La concentrazione della sospensione conidica utilizzata era di 5×10^5 CFU/ml. Prima dell'inoculazione, i frutti venivano disinfettati, immergendoli in una soluzione di ipoclorito di sodio (1%) per 20 minuti. In seguito, essi erano accuratamente sciacquati in acqua corrente e lasciati asciugare su fogli di carta bibula. Quindi, su ogni frutto erano praticati tre fori in posizione equatoriale, in cui era inoculata la sospensione conidica (30 μl /foro). Quattro frutti utilizzati come testimoni sani erano trattati allo stesso

modo, iniettando acqua sterile. Infine, tutti i frutti erano sistemati in un contenitore alveolare e mantenuti ad una temperatura variabile da 23 a 27°C. Dopo circa tre giorni, attorno alle ferite praticate sui frutti inoculati iniziavano a comparire i primi sintomi di marciume. Trascorsi sei giorni dall'inoculazione, i sintomi divenivano più evidenti e dai tessuti del pericarpo era possibile reisolare lo stesso fungo inoculato. I testimoni non mostravano alcun sintomo. Il test di patogenicità veniva ripetuto con 9 pere della cv Williams, applicando lo stesso protocollo descritto per la prima prova. I primi sintomi di marciume iniziavano a comparire tre giorni dopo l'inoculazione. Trascorsi sei giorni dall'inoculazione, i marciumi mostravano diametri variabili da 18 a 44 (media: 33) mm (Figura 6). Anche in questo caso *D. eres* veniva reisolata dai frutti sintomatici, mentre i frutti testimone non presentavano alcun sintomo.

Conclusioni

Parassiti appartenenti al genere *Phomopsis* (o al suo teleomorfo *Diaporthe*), su pero, causano il disseccamento dei germogli e dei rami, cancri, die-back e il marciume dei frutti (Smit *et al.*, 1996). In bibliografia, sono numerose le segnalazioni di questi parassiti su *Pyrus communis*: *Phomopsis ambigua* (o il suo anamorfo *D. ambigua*) sono stati segnalati negli Stati Uniti (English, 1940), in Olanda (Poeteren Van, 1931), in Giappone (Tanaka, 1934) e in Cina (Ciferri, 1955); *P. enteroleuca* in Germania (Wollenweber e Hochapfel, 1936); *P. mali* (anamorfo di *Diaporthe pernicioso*) in Olanda (Poeteren Van, 1935), in Francia (Barthelet, 1943), in Germania (Kröber, 1956) e nella ex Unione Sovietica (Dzagnidze, S. I., 1957); *Diaporthe parasitica* (Sin.: *Cryphonectria parasitica*) è stata riportata in Belgio (Marchal, 1935); *D. pernicioso* (teleomorfo di *Phomopsis mali*) in Inghilterra (Cayley, 1923), in Francia (A. A. V. V., 1954), in Georgia (Dzagnidze, 1964) e in Moldavia (Martsikh, 1965). Lo stesso microrganismo è stato segnalato anche in Italia quale agente di cancri (Govi, 1951) e marciume dei frutti (Lovisolo, 1958), presente sia come parassita che saprofita su varie specie frutticole coltivate (Lovisolo, 1958) e come agente della moria di giovani piante (Ferri, 1961). Sempre nel nostro Paese, *Diaporthe eres* è stata recentemente segnalata quale agente di cancri del fusto di *Prunus persica* (Prencipe *et al.*, 2017). *Phomopsis oblonga* (anamorfo di *Diaporthe eres*) è stata identificata in Cina, su alcuni ospiti appartenenti al genere *Pyrus* fra cui anche *P. communis* (Bai *et al.*, 2015). Riteniamo che la nostra sia la prima segnalazione di *D. eres* su *P. communis* in Italia.

Nel nostro Paese, la presenza di *D. eres* si affianca dunque a quella di *D. pernicioso* segnalata su rami, giovani piante e frutti di pero (Govi, 1951; Ferri, 1961; Lovisolo, 1958). Le misure adottate per la prevenzione e il contenimento di *D. pernicioso* sono sufficienti anche nei confronti di *D. eres*, il cui rinvenimento su un singolo, vetusto esemplare, da molto tempo non più soggetto alle cure colturali necessarie, non desta particolare preoccupazione. E' plausibile che i marciumi riscontrati sui frutti siano correlati alla presenza di alterazioni e cancri causati dallo stesso parassita sui rami dell'ospite, la cui esplorazione risulta difficoltosa, date le ragguardevoli dimensioni della pianta. Per contenere *D. eres* su pero è fondamentale rimuovere i rami recanti cancri, disseccamenti sospetti e/o sintomi di die-back, la cui relazione con questo parassita dovrà essere confermata

da esami approfonditi (riscontro della presenza di picnidi, osservazione dei conidi al microscopio ottico, isolamenti ecc.), successivi all'osservazione visiva dei sintomi. I tagli di potatura andranno eseguiti sul legno sano, avendo cura di disinfettare gli strumenti di taglio e di allontanare e bruciare i rami colpiti, i residui di potatura, così come i frutti colpiti, sui quali il microrganismo può costituire una pericolosa fonte di inoculo.

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

- A. A. V. V. (1954) - Annual Report of the National Institute for Agronomical Research, 1951, 250 pp.
- Bai Q., Zhai L., Chen X., Hong N., Xu W., Wang G. (2015) - Biological and molecular characterization of five *Phomopsis* species associated with pear shoot canker in China. *Plant Disease*, 99, 1704-1712.
- Barnett H. L., Hunter Barry B. (1972) - Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, USA, 237 pp.
- Barthelet J. (1943) - Researches on some parasites of fruit trees. *Ann. Épiphyt.*, N. S., 9 (1), 27 - 45.
- Cayley D. M. (1923) - Fungi associated with "die back" in stone fruit trees. I. *Annals of Applied Biology*, 10, 253 - 275.
- Ciferri R. (1955) - Preliminary list of noteworthy diseases of cultivated plants in continental eastern Cina. *Plant Disease Reporter*, 39, 785 - 792.
- Dzagnidze S. I. (1957) - A biological study of *Phomopsis mali* Roberts. *Soobshch. Akademii Nauk Gruzinskoj SSR*, 18 (6), 727 - 731.
- Dzagnidze Sh. I. (1964) - *Phomopsis* on Apple and Pear. *Zashch. Rast.*, Moskva, 9 (7), 38.
- English W. H. (1940) - Taxonomic and pathogenicity studies of the fungi which cause decay of Pears in Washington. *Research Studies of the State College of Washington*, 8 (3), 127-128.
- Ferri F. (1961) - The presence of *Diaporthe perniciosa* on young Pear plants. *Progressive agriculture*, 7, 1515 - 1518.
- Gallesio G. (1839) - *Pomona italiana*, ossia Trattato degli Alberi da Frutto, Capurro, Pisa.
- Gomes R. R., Glienke C., Videira S. I. R., Lombard L., Groenewald J. Z., Crous P. W. (2013) - *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 31, 1-41.
- Govi G. (1951) - A rugose canker of Pear trees caused by *Phomopsis mali* Rob. *Ann. Sper. agr.*, N S., 5, 791 - 803.
- Guarnaccia V., Crous P. W. (2017) - Emerging citrus diseases in Europe caused by species of *Diaporthe*. *IMA Fungus*, 8 (2), 317-334.
- <http://agri.istat.it/jsp/dawinci.jsp?q=plC170000010000011001&an=2017&ig=1&ct=266&id=15A%7C21A%7C30A>
- http://www.regione.piemonte.it/agri/area_tecnico_scientifica/biodiversita/dwd/CULTIVAR_PERO.PDF
- Kröber H. (1956) - Bark and fruit rot of pip, stone and berry fruit caused by *Phomopsis* species. *NachrBl. dtsh. PflSchDienst*, 8 (11), 161 - 164.
- Lovisol O. (1958) - Attacks of *Phomopsis mali* on various



Figura 6 - Riproduzione dei sintomi di marciume su pere "William" artificialmente inoculate con una sospensione conidica di *Diaporthe eres*. A sinistra: testimoni non inoculati.

Figure 6 - Rot symptoms on pear fruits "William" artificially inoculated with a conidial suspension of *Diaporthe eres*. On the left: control fruits.

species of cultivated plants. *Bollettino della Stazione di patologia vegetale, Roma*, Ser. 3, 15, 241 - 271.

Lovisol O. (1958) - Notes on some diseases of fruit. I. On a rotting of Apple, Pear, and Persimmon caused by *Phomopsis mali*. *Bollettino della Stazione di patologia vegetale, Roma*, Ser. 3, 15, 299 - 315.

Marchal É. (1935) - Observations and researches carried out at the State Phytopathological Station during the year 1934. *Bulletin de l'Institut agronomique de Gembloux*, 4 (2), 97-105.

Martsikh Zh. G. (1965) - Pathogenic fungi causing diseases of Apple and Pear branches. *Infekts. zabolovaniya kul'turn rast.*, Kishinev, 1965, 4, 29 - 40.

Molon G. (1901) - *Pomologia*. Descrizione delle migliori varietà di albicocchi, ciliegi, meli, peri, peschi. Hoepli, Milano, 717 pp.

Poeteren Van N. (1931) - Report of the activities of the Phytopathological Service in the year 1930. *Versl. en Meded. Plantenziektenkundigen Dienst te Wageningen*, 64, 189 pp.

Poeteren Van N. (1935) - Report on the work of the Phytopathological Service in the year 1935. *Versl. PIZiekt. Dienst Wageningen*, 83, 88 pp.

Prencipe S., Nari L., Vittone G., Spadaro D. (2017) - First report of *Diaporthe eres* causing stem canker on peach (*Prunus persica*) in Italy. *Plant Disease*, 101, 1052.

Smit W. A., Viljoen C. D., Wingfield B. D., Wingfield M. J., Calitz F. J. (1996) - A new canker disease of apple, pear, and plum rootstocks caused by *Diaporthe ambigua* in South Africa. *Plant Disease*, 80, 1331-1335.

Tanaka I. (1934) - Studies on the canker disease of Pear tree caused by *Diaporthe ambigua* Nitschke. *Hokkaido Agricultural Experiment Station Reports*, 31, 85 - 122.

Udayanga D., Castlebury L. A., Rossman A. Y., Chukeatirote E., Hyde K. D. (2014) - *Fungal Diversity* 67(1), 203-229.

Wollenweber H. W., Hochapfel H. (1936) - Contributions to the knowledge of parasitic and saprophytic fungi. I. *Phomopsis, Dendrophoma, Phoma* and *Ascochyta*, and their relationship to fruit-rotting. *Zeitschrift für parasitenkunde*, 8 (5), 561 - 605.