

PRESENZA DI ALCUNE NUOVE *FORMAE SPECIALES* DI *FUSARIUM OXYSPORUM* RECENTEMENTE RISCONTRATE SU SPECIE ORNAMENTALI IN ITALIA

D. BERTETTI¹, G. ORTU¹, P. PENSA¹, M. L. GULLINO^{1,2}, A. GARIBALDI¹

¹Centro di Competenza per l'Innovazione in campo agro-ambientale (Agroinnova)

Università di Torino - Via L. da Vinci, 44, 10095 Grugliasco (TO)

²DiSAFA - Università degli Studi di Torino, Via Leonardo da Vinci 44

10095 Grugliasco (TO)

domenico.bertetti@unito.it

RIASSUNTO

Nel corso di attività di monitoraggio condotte presso aziende floricole localizzate in Liguria, è stata recentemente osservata la presenza di tracheomicosi causate da *Fusarium oxysporum* su *Crassula ovata*, *Papaver nudicaule* ed *Echeveria agavoides*, mai riscontrate su queste specie, sia nel nostro Paese che nel resto del mondo. Vengono descritti i sintomi osservati, le caratteristiche morfologiche degli isolati ottenuti in purezza dalle piante colpite e le analisi molecolari che hanno consentito di identificare *F. oxysporum* quale agente causale delle alterazioni riscontrate e di determinare la presenza di tre nuove *formae speciales* di questo parassita: *crassulae*, *papaveris* ed *echeveriae*.

Parole chiave: piante succulente, papavero d'Islanda, fusariosi

SUMMARY

PRESENCE OF NEW *FORMAE SPECIALES* BELONGING TO *FUSARIUM OXYSPORUM* RECENTLY REPORTED ON ORNAMENTAL SPECIES GROWN IN ITALY

During the monitoring activity carried out in several farms located in Liguria, *Fusarium oxysporum* was detected on *Crassula ovata*, *Papaver nudicaule* and *Echeveria agavoides* for the first time in Italy, as well as in the world. Symptoms are described. *F. oxysporum* was identified by the morphological characteristics observed on the colonies cultivated *in vitro*. Molecular analysis permitted to confirm the identification as *F. oxysporum* and to recognize three new *formae speciales* of this pathogen: *crassulae*, *papaveris* and *echeveriae*.

Keywords: cacti, Iceland poppy, *Fusarium* wilt

INTRODUZIONE

Uno dei settori di maggiore interesse del florovivaismo ligure è quello della produzione di piante in vaso, come indicato dalla produzione annuale, registrata nella pianura di Albenga (SV), di oltre 50 milioni di vasi (Colla e Vio, 2005). Fra le piante coltivate, le succulente offrono un'ampia varietà di specie e cultivar, diverse per portamento, dimensioni e fioriture, commercializzate sia in vasi di piccole dimensioni, molto economici, che in grandi contenitori, più costosi (Borsotto *et al.*, 2008). Fra le tante specie coltivate annoveriamo due Crassulaceae, entrambi perennanti a fogliame persistente: *Crassula ovata* (sin.: *C. argentea*, *C. portulacacea*) ed *Echeveria agavoides*. Un altro settore di grande interesse per il comparto floricolo ligure è quello della produzione di fiore reciso. In tale ambito, *Papaver nudicaule*, famiglia Papaveraceae, è una specie erbacea piuttosto rustica che, pur essendo una produzione di nicchia, costituisce un'interessante novità. Questa specie è anche apprezzata per la realizzazione di bordure, aiuole e prati fioriti, in aree verdi private o di pubblica fruizione.

Durante l'estate 2010, numerose piante di *C. ovata* appartenenti alle cv Mini e Magical Tree, entrambe coltivate in vaso, in un'azienda di Bordighera (IM), manifestavano i seguenti

sintomi. In un primo tempo, si notava la prematura caduta di una parte delle foglie che apparivano lievemente clorotiche e che si distaccavano ancora turgide. Successivamente, le foglie manifestavano ingiallimenti vistosi e avvizzivano prima della filloptosi. Anche il fusto avvizziva, si ripiegava, a tratti marciva e, infine, disseccava con andamento acropeto. In alcuni casi, a causa delle alterazioni, i tessuti del fusto si spezzavano per il peso della chioma (Figura 1). Osservati in sezione, i vasi conduttori xilematici apparivano imbruniti.

Figura 1. Sintomi causati da *F. oxysporum* f. sp. *crassulae* su *Crassula ovata* cv Magical Tree



Durante l'autunno 2011, numerose piante di *P. nudicaule* coltivate sia in fuori suolo presso l'I.R.F. (Istituto Regionale per la Floricoltura) di Sanremo (IM), sia in piena terra, per produrre fiore reciso, presso un'azienda floricola di Ventimiglia (IM), presentavano arresto dello sviluppo, seguito da avvizzimento fogliare, accompagnato da lieve clorosi. Successivamente, le piante colpite si ripiegavano, e disseccavano. In un primo tempo, i sintomi interessavano la metà o due terzi della chioma, poi l'intera pianta che, infine, disseccava (Figura 2). I fusti e i piccioli delle piante colpite, sezionati longitudinalmente, mostravano l'imbrunimento dei vasi conduttori.

Durante la primavera 2012, numerose piante di *E. agavoides* allevate in vaso presso un'azienda floricola di Ventimiglia (IM), presentavano le seguenti alterazioni con andamento acropeto: le foglie, divenivano prima verde pallido, poi giallastre e ocracee e, infine, perdevano turgore, assumevano colorazione bruno violacea con aspetto traslucido, marcivano e disseccavano ripiegandosi lungo i bordi. In un primo tempo, le alterazioni riguardavano circa metà o due terzi della rosetta, poi l'intera pianta disseccava. Anche gli steli delle infiorescenze marcivano alla base e si ripiegavano. I vasi conduttori delle foglie, dei fusti e degli steli delle

Figura 2. Sintomi causati da *F. oxysporum* f. sp. *papaveris* su *Papaver nudicaule*



Figura 3. Sintomi causati da *F. oxysporum* f. sp. *echeveriae* su *Echeveria agavoides*



infiorescenze, sezionati longitudinalmente, apparivano imbruniti. Sovente, la superficie più interna delle foglie colpite presentava un micelio biancastro-aranciato che, osservato al microscopio ottico, manifestava la presenza di numerosi micro e macroconidi, riconducibili al genere *Fusarium* (Leslie e Summerell, 2006) (Figura 3).

Poiché *F. oxysporum* non era mai stato segnalato su nessuna delle tre specie prima elencate, lo scopo di questo lavoro è stato verificare l'esistenza di nuove *forme speciales* di questo parassita.

MATERIALI E METODI

Isolamento dei parassiti

Dai campioni delle tre specie recanti i sintomi descritti sono stati effettuati gli isolamenti, prelevando numerosi frammenti di tessuto lungo il margine degli imbrunimenti vascolari, successivamente trasferiti su terreno di coltura selettivo per *Fusaria* (Komada, 1975).

Nel caso di *C. ovata*, sia "Mini", sia "Magical Tree", si sono sviluppate le colonie di un fungo che, isolato in purezza, è stato allevato su SNA (Syntetic Nutrient Agar) (Nirenberg, 1976) per le successive osservazioni. Su questo substrato, il fungo isolato da *C. ovata* "Mini", ha prodotto macroconidi di $30-46 \times 4-5$ (media: 36×5) μm , di forma leggermente falcata, con una cellula basale a forma di piede e una cellula apicale ottusa, dotati di 3 (talvolta 4) setti. I microconidi, di $5-13 \times 3-4$ (media: 8×3) μm , unicellulari, ovato-ellittici (talvolta reniformi), sono stati prodotti da corte monofialidi. Le clamidospore, numerose, misuravano 6-8 μm , erano singole, sia terminali sia intercalari e dotate di parete ruvida. Su analogo substrato, l'isolato ottenuto da *C. ovata* "Magical Tree", ha prodotto macroconidi di $30-56 \times 3-4$ (media: 41×4) μm , quasi diritti, con cellula basale maggiormente affusolata dei precedenti e cellula apicale ottusa, dotati di 3 (talvolta 4 o 5) setti. I microconidi, di $5-13 \times 2-4$ (media: 9×3) μm , erano unicellulari, ovato-ellittici (talvolta reniformi) e supportati da corte monofialidi. Le clamidospore, di 6-9 μm , numerose, erano singole (a volte riunite in coppie), sia terminali sia intercalari e dotate di parete ruvida.

Nel caso di *P. nudicaule*, dai campioni prelevati da entrambi i siti di coltivazione in cui la malattia si era manifestata, sono state isolate numerose colonie di un fungo che, su PDA, ha generato numerosissimi microconidi di $3,9-6,7 \times 1,4-3,0$ (media: $5,4 \times 2,3$) μm , unicellulari, ovato-ellittici, supportati da corte monofialidi. Su substrato CLA (Carnation Leaf-Piece Agar) (Fisher *et al.*, 1982), lo stesso fungo ha prodotto numerosi macroconidi di $26,0-43,5 \times 3,1-4,4$ (media: $35,3 \times 3,7$) μm , leggermente falciformi, con 3 (raramente 4) setti e dotati di cellula basale a forma di piede e di cellula apicale ottusa. Su analogo substrato, il fungo ha generato clamidospore con diametro di 5,2-10,1 (media: 7,3) μm , dotate di parete ruvida, disposte sulle ife in posizione sia terminale sia intercalare, per lo più singolarmente, ma anche in coppie, in gruppi o in corte catene.

Nel caso di *E. agavoides*, dagli isolamenti si sono sviluppate numerose colonie di un fungo che, coltivato in purezza su CLA, ha prodotto macroconidi di $18,9-30,7 \times 3,0-4,2$ (media: $23,9 \times 3,6$) μm , simili a quelli osservati sulle foglie dello stesso ospite. Sullo stesso substrato, il fungo ha prodotto corte monofialidi generanti microconidi unicellulari, di $4,7-7,7 \times 1,7-3,1$ (media: $6,0 \times 2,4$) μm e numerose clamidospore con diametro di 6,8-9,5 (media: 7,7) μm , dotate di parete ruvida, disposte singolarmente o in coppia, sia terminali sia intercalari.

Analisi della sequenza ITS

L'analisi della sequenza ITS (Internal Transcribed Spacer) è stata condotta sui microrganismi isolati dai tre ospiti estraendo il loro DNA dalle rispettive colonie allevate su

PDA (Potato Dextrose Agar). Per l'estrazione è stato utilizzato il Nucleospin Plant kit (Macherey Nagel). Sul DNA estratto è stata poi condotta una reazione di PCR, impiegando i primer ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990). Successivamente, il prodotto dell'amplificazione è stato sequenziato, ottenendo le sequenze degli isolati, poi analizzate con l'algoritmo BLASTn (E = 0) (Altschul *et al.*, 1997).

Test di patogenicità con gli isolati ottenuti

Al fine di dimostrare la patogenicità degli isolati ottenuti da *C. ovata* “Mini” e “Magical Tree”, *P. nudicaule* ed *E. agavoides*, alcune piante apparentemente sane dei rispettivi ospiti sono state inoculate artificialmente, immergendo le loro radici nella sospensione conidica dei rispettivi isolati, ottenuta in substrato liquido, posto in agitazione (90 r.p.m.) per 10 giorni. Per *C. ovata*, è stato utilizzato l'idrolizzato di caseina, per *P. nudicaule* e *E. agavoides* il PDB (Potato Dextrose Broth). Gli inoculi ottenuti sono stati successivamente omogeneizzati e diluiti fino alla concentrazione voluta: 1×10^6 per entrambi le cultivar di *C. ovata* e 1×10^7 CFU/mL per *P. nudicaule* e *E. agavoides*. Per ciascun ospite, le piante testimone sono state trattate con acqua sterile. Tutte le piante inoculate, assieme ai testimoni, sono state poi trapiantate in terriccio costituito da torba di sfagno, pomice, corteccia di pino e argilla (50:20:20:10), disinfestato a vapore e collocate nei rispettivi ambienti di coltivazione: in cella climatica, alla temperatura di $25^\circ\text{C} \pm 1$ per *C. ovata*, in serra alla temperatura di $24\text{--}28^\circ\text{C}$ e $28\text{--}33^\circ\text{C}$, rispettivamente per *P. nudicaule* ed *E. agavoides*.

In una ulteriore prova di suscettibilità varietale, due ceppi di *F. oxysporum* isolati da *C. ovata* e due isolati da *E. agavoides* sono stati inoculati artificialmente su alcune Cactaceae (*Echinocactus grusonii*, *Mammillaria ginsamaru*, *Thelocactus rinconensis*, *T. bicolor*) e su alcune Crassulaceae (*Echeveria agavoides*, *C. ovata* cv Mini e Magical Tree).

Analisi filogenetiche

Per l'identificazione della *forma specialis* di appartenenza degli isolati di *F. oxysporum* sono state allestite delle analisi filogenetiche basate su diverse regioni genomiche. Nel caso dei ceppi ottenuti da *C. ovata*, il DNA estratto dagli isolati è stato utilizzato come stampo per l'amplificazione dei geni Mat alpha 1-1, Pg5 e Pgx1. Gli ampliconi ottenuti sono stati purificati attraverso l'utilizzo del QIAquick PCR purification kit (Qiagen) e sequenziati presso il servizio di sequenziamento della BMR genomics (<http://www.bmr-genomics.it>). Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state utilizzate per dei multiallineamenti (CLUSTALW) insieme alle sequenze degli stessi geni di diverse *formae speciales* presenti su GenBank. La costruzione dei rispettivi alberi filogenetici è stata eseguita con il metodo neighbor join tramite l'utilizzo del software Mega5. In tutte le analisi filogenetiche sono state calcolate 1000 repliche di bootstrap. Stessa procedura è stata usata per gli isolati ottenuti da *E. agavoides* e *P. nudicaule* ma, in questo caso, i geni utilizzati per le analisi erano EF 1 α , Pg1, Pg5, Pgx1 e Pgx4.

RISULTATI

Identificazione morfologica degli isolati

In base alle caratteristiche morfologiche precedentemente descritte, i microrganismi isolati da *C. ovata* “Mini” e “Magical Tree”, *P. nudicaule* e *E. agavoides* sono stati identificati come *Fusarium oxysporum* (Leslie e Summerell, 2006).

Identificazione dei parassiti con analisi molecolare

Per *C. ovata* “Mini” è stata ottenuta una sequenza di 515 paia di basi (Gene Bank accession number HQ682196), mentre per *C. ovata* “Magical Tree” una sequenza di 509 paia di basi (Gene Bank accession number HQ682197). Per *P. nudicaule* è stata ottenuta una sequenza di 507 paia di basi (Gene Bank accession number JX103564) e per *E. agavoides* una sequenza di 486 paia di basi (Gene Bank accession number JX441893).

L’analisi delle sequenze ottenute dai microrganismi isolati dai differenti ospiti le ha identificate come appartenenti a *F. oxysporum*, confermando l’identificazione morfologica degli isolati.

Riproduzione dei sintomi osservati

Per *C. ovata* (“Mini” e “Magical Tree”), *E. agavoides* e *P. nudicalule* i primi sintomi sono comparsi rispettivamente circa 13, 15 e 10 giorni dopo l’inoculazione artificiale, soltanto sulle piante infettate. I testimoni invece sono rimasti asintomatici. Dalle piante dei tre ospiti recanti i sintomi sono stati nuovamente isolati gli stessi funghi inoculati, soddisfacendo i postulati di Koch.

Nella successiva prova di suscettibilità, i ceppi isolati da *C. ovata* e da *E. agavoides* si sono rivelati patogeni soltanto quando inoculati sui rispettivi ospiti, mentre nessuna altra specie artificialmente inoculata ha mostrato alcun sintomo.

Analisi filogenetiche

Gli alberi filogenetici ottenuti per *C. ovata*, *E. agavoides* e *P. nudicaule* hanno messo in evidenza un raggruppamento degli isolati distanti dalle *formae speciales* note ed utilizzate per l’analisi filogenetica. Tale raggruppamento ha avvalorato quanto osservato nei saggi di suscettibilità varietale, confermando l’identificazione di tre nuove *formae speciales* non ancora descritte in precedenza.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

F. oxysporum è stato isolato, descritto e segnalato per la prima volta come parassita di *C. ovata*, *P. nudicalule* ed *E. agavoides* nel nostro Paese, così come nel resto del mondo (Garibaldi *et al.*, 2011; Garibaldi *et al.*, 2012; Garibaldi *et al.*, 2013).

La presenza di queste nuove *formae speciales* ha trovato conferma tramite analisi filogenetiche basate su diverse regioni genomiche (Ortu *et al.*, 2013 a, b, c). Nel caso di *F. oxysporum* f. sp. *echeveriae*, il risultato ottenuto dalle analisi filogenetiche ha trovato riscontro nella prova di suscettibilità condotta su alcune Cactaceae e Crassulaceae nei confronti degli isolati di *F. oxysporum* provenienti da *C. ovata* e *E. agavoides*: i ceppi saggiati appartengono a due *formae speciales* distinte, essendo essi risultati patogeni soltanto quando inoculati sui rispettivi ospiti di provenienza, ma non sulle altre specie inoculate (Ortu *et al.*, 2013 b).

La comparsa di queste nuove *formae speciales* di *F. oxysporum* invita ad approfondire gli aspetti epidemiologici di questi parassiti e ad accertare l’eventuale esistenza di ospiti secondari, potenziali veicoli della loro diffusione negli ambienti di coltivazione. Anche le origini delle infezioni andranno chiarite, così come la trasmissibilità dei parassiti tramite seme infetto, ancora da dimostrare per *C. ovata* ed *E. agavoides*, ma già accertata per *P. nudicaule* (Bertetti *et al.*, 2013). Andrà altresì approfondito, tramite ulteriori prove di suscettibilità varietale, lo spettro di ospiti che ciascuna nuova *forma specialis* è in grado di colpire al fine di valutare l’applicazione della resistenza genetica come strumento di lotta.

Ringraziamenti

Lavoro svolto con il contributo del Settimo Programma Quadro dell'Unione Europea (FP7/2007-2013), nell'ambito del progetto n° 261752, PLANTFOODSEC "Plant and Food Biosecurity, Network of Excellence".

Si ringrazia la Dott. Ssa Patrizia Martini dell'Istituto Regionale per la Floricoltura di Sanremo per la preziosa collaborazione svolta in questa attività di ricerca.

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
- Bertetti D., Ortu G., Gullino M. L., Garibaldi A., 2013. Contamination of seeds of Iceland Poppy (*Papaver nudicaule*) by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Pathology* (In stampa)
- Borsotto P., Sturla A., Trione S., 2008. La floricoltura ligure. Istituto Nazionale di Economia Agraria (I.N.E.A.) e Regione Liguria, Roma, 113 pp
- Colla L., Vio S., 2005. L'agricoltura nell'albenganese. Ed. Camera di Commercio Industria Artigianato e Agricoltura di Savona, Collana Strumenti 6/2005, 54 pp.
- Fisher N. L., Burgess L. W., Toussoun T. A., Nelson P. E., 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, 72, 151-153
- Garibaldi A., Bertetti D., Pensa P., Poli A., Gullino M. L., 2011. First Report of *Fusarium oxysporum* Causing Wilt on Jade Plant (*Crassula ovata*) in Italy. *Plant Disease*, 95, 1191
- Garibaldi A., Bertetti D., Pensa P., Poli A., Gullino M. L., 2013. First Report of Crown and Stem Rot of Crested Molded Wax Agave (*Echeveria agavoides*) caused by *Fusarium oxysporum* in Italy. *Plant Disease*, 97, 288
- Garibaldi A., Martini P., Repetto L., Odasso M., Bertetti D., Poli A., Gullino M. L., 2012. First Report of *Fusarium oxysporum* Causing Wilt on Iceland Poppy (*Papaver nudicaule*) in Italy. *Plant Disease*, 96, 1823
- Komada H., 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Prot. Res.* 8, 114-125
- Leslie J. F., Summerell B. A., 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa, USA, 388 pp
- Nirenberg H. I., 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium* Sektion *Liseola*. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft (Berlin-Dahlem), 169, 1-117
- Ortu G., Bertetti D., Gullino M. L., Garibaldi A., 2013 a. A new *forma specialis* of *Fusarium oxysporum* on *Crassula ovata*. *Journal of Plant Pathology*, 95, 25-31
- Ortu G., Bertetti D., Gullino M. L., Garibaldi A., 2013 b. *Fusarium oxysporum* f. sp. *echeveriae*, a novel *forma specialis* causing crown and stem rot of *Echeveria agavoides*. *Phytopathologia mediterranea* (In revisione)
- Ortu G., Bertetti D., Gullino M. L., Garibaldi A., 2013 c. *Fusarium oxysporum* f. sp. *papaveris*: a new *forma specialis* isolated from *Papaver nudicaule*. *Journal of Plant Pathology* (In revisione)
- 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