

Attacchi di *Fusarium oxysporum* su *Mammillaria zeilmanniana* e *Cereus peruvianus florida*, entrambi coltivati in Italia

Domenico Bertetti* - Giuseppe Ortu* - Pietro Pensa* - Maria Lodovica Gullino*,**
- Angelo Garibaldi*

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

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

Riassunto

Durante il mese di ottobre 2014, su *Mammillaria zeilmanniana* e *Cereus peruvianus florida* sono stati riscontrati i sintomi descritti in questa nota. Per entrambe le specie, allevate in aziende floricole nei pressi di Vallecrosia (IM), il parassita fungino agente delle malattie veniva identificato come *Fusarium oxysporum*. L'identificazione avveniva in seguito all'osservazione di microconidi, sporodochi, macroconidi e clamidospore prodotti dagli isolati su diversi terreni di coltura. Su isolati monoconidici ottenuti da entrambi gli ospiti era condotta l'analisi del gene TEF (Elongation Factor 1 α) che confermava le identificazioni. Vengono riportati i sintomi osservati, le osservazioni al microscopio ottico sulle colture *in vitro* e le analisi molecolari effettuate. Infine, sono forniti consigli per prevenire e per combattere le malattie descritte sui due nuovi ospiti. *F. oxysporum* è riportato su *M. zeilmanniana* per la prima volta in Italia e in Europa e su *C. peruvianus florida* per la prima volta in Italia e nel mondo.

Parole chiave: piante ornamentali; succulente; tracheofusariosi.

Summary

First report of *Fusarium oxysporum* on *Mammillaria zeilmanniana* and *Cereus peruvianus florida*, both cultivated in Italy

In October 2014, symptoms described in this note were detected on *Mammillaria zeilmanniana* and *Cereus peruvianus florida* growing in two nurseries, both located near Vallecrosia (Imperia province, Northern Italy). The causal agent of the diseases was identified as *Fusarium oxysporum* for both the hosts. The observation of microconidia, sporodochia, macroconidia and chlamidospores grown *in vitro* on different media allowed the morphological identification. The Elongation Factor 1 α (TEF) carried out on single-spore cultures confirmed the identifications. Finally, some strategies are reported to prevent and to control *F. oxysporum* on *M. zeilmanniana* and *C. peruvianus florida*. *F. oxysporum* is reported on *M. zeilmanniana* for the first time in Europe, whereas the pathogen is reported on *C. peruvianus florida* for the first time in the world.

Introduzione

Vengono descritti i sintomi delle malattie, mai precedentemente osservate né in Italia, né nel resto del mondo, su due specie appartenenti alla famiglia delle Cactaceae, entrambe coltivate in due aziende floricole nei pressi di Vallecrosia (IM): *Mammillaria zeilmanniana* e *Cereus peruvianus florida*.

Sintomi osservati ed identificazione dei parassiti

Mammillaria zeilmanniana

Nel corso del mese di ottobre 2014, numerose piante di *M. zeilmanniana* recavano i sintomi qui descritti. Le piante, di circa 38 mesi di età, erano state riprodotte per seme ed erano allevate in vasi di plastica (diam. 10 cm) in tinta coccio che contenevano substrato di coltivazione torboso, con scheletro (pH ~ 6,5 ; E.C. ~ 500 μ S). Esse erano collocate all'interno di una serra di ferro/vetro ed erano allevate su bancale rialzato, alla densità colturale di 100 piante/m². L'irrigazione avveniva per aspersione manuale. Le alterazioni riscontrate riguardavano i fusti che apparivano clorotici, di consistenza gommosa o molle al tatto (Fig. 1) e che, a partire dai tessuti del colletto, marcivano seguendo un andamento acropeto (Fig. 2). Anche le radici apparivano marcescenti. Con l'aggravarsi della malattia, i fusti avvizzivano, disseccavano e morivano, afflosciandosi (Fig. 3). Era colpita la quasi totalità delle 2000 piante coltivate. Gli isolamenti venivano effettuati dai fusti di numerose piante di *M. zeilmanniana* recanti i sintomi descritti. Da essi si ottenevano, con regolarità, numerose colonie fungine caratterizzate da micelio biancastro, rosa pallido che generava pigmenti debolmente rosati nel substrato colturale. Su terreno CLA (Carnation Leaf-Piece Agar) (Fisher *et al.*, 1982), il micelio produceva corte monofalidi con microconidi unicellulari, di forma ovata-ellittica, con dimensioni di 6,1-8,5 \times 2,3-3,2 (media: 7,2 \times 2,8) μ m. Sul medesimo substrato, gli isolati provenienti da *M. zeilmanniana* davano origine a sporodochi bianco-rosati che generavano moltissimi macroconidi lievemente falcati, con un numero di setti variabile da 3 a 6 (media: 4) e caratterizzati dalla cellula basale a forma di piede e dalla cellula apicale ottusa. Le loro dimensioni erano di 31,4-56,8 \times 2,8-4,0 (media: 42,7 \times 3,5) μ m. Sempre su CLA

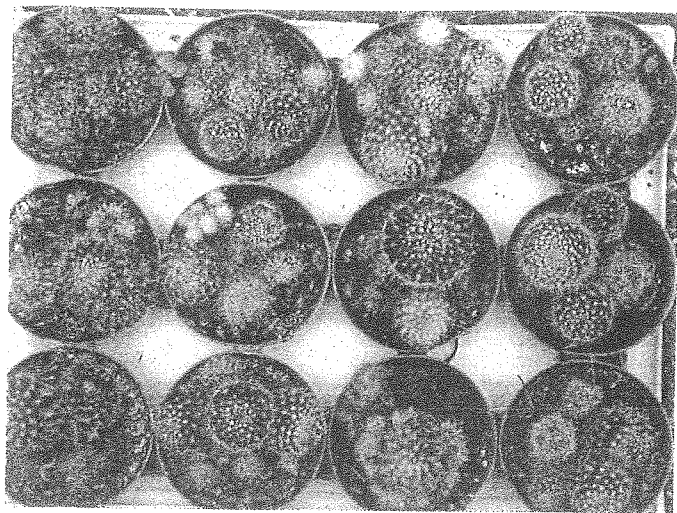


Figura 1 - Sintomi causati da *Fusarium oxysporum* su fusti di piante di *Mammillaria zeilmanniana* allevate in vaso.
 Figure 1 - Symptoms caused by *Fusarium oxysporum* on stems belonging to potted plants of *Mammillaria zeilmanniana*.

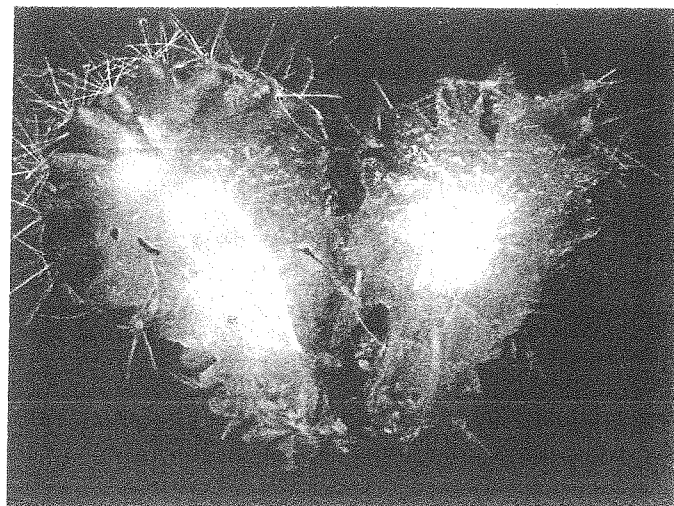


Figura 2 - Marciume del colletto e della base del fusto causato da *Fusarium oxysporum* su *Mammillaria zeilmanniana*.
 Figure 2 - Rot of collar and stem basis caused by *Fusarium oxysporum* on *Mammillaria zeilmanniana*.

venivano osservate le clamidospore, intercalari, con parete ruvida, singole, in coppie o in piccoli gruppi. Le loro misure erano 6-9 (media: 8) μm . Le caratteristiche morfologiche descritte per gli isolati fungini ottenuti da *M. zeilmanniana* coincidono con quelle di *Fusarium oxysporum* (Leslie e Summerell, 2006).

L'identificazione morfologica del parassita isolato da *M. zeilmanniana* era confermata dall'analisi molecolare condotta su una coltura di un isolato monoconidico (DB 140TT12M1). Il DNA di questo ceppo era usato come stampo per una reazione di PCR con i primer EF1/EF2 (O'Donnell *et al.*, 1998) in grado di amplificare il gene che codifica il fattore di allungamento della trascrizione 1 α (TEF). Il prodotto dell'amplificazione veniva sequenziato direttamente: la sequenza di 413 paia di basi (GenBank accession number KT183486) ottenute veniva analizzata con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) che la identificava come *F. oxysporum*, confermando le conclusioni delle osservazioni morfologiche.

Cereus peruvianus florida

Sempre nel mese di ottobre 2014 in provincia di Imperia, erano coltivate 50.000 piante di *C. peruvianus florida* riprodotte per talea. Queste erano allevate in contenitori alveolari (diam. 4 cm), sistemati su bancale, collocato all'interno di una serra di ferro/vetro, alla densità colturale di 330 piante/m² ed erano irrigate con aspersione manuale. Il substrato di coltivazione utilizzato era torboso, con scheletro (pH ~ 6,5; E.C. ~ 500 μS). Alla comparsa dei sintomi, le piante avevano circa 6 mesi di età. In questo caso, il decorso della malattia era molto lento e i sintomi consistevano in uno sviluppo stentato e ridotto delle piante che non marcivano, ma assumevano colorazione anomala (Fig. 4). Successivamente, le piante andavano incontro ad un progressivo, lento deperimento (Fig. 5) che perdurava lungamente senza causarne la morte (in giugno 2015, circa 8 mesi dopo l'osservazione dei sintomi, le piante erano ancora vive) e che causava un notevole danno estetico. Era

colpito circa il 2% delle piante coltivate.

Gli isolamenti, effettuati dai fusti di piante deperenti, consentivano di ottenere numerose colonie fungine biancastre, leggermente rosate che producevano pigmenti di analogo colore nel mezzo di coltura agarizzato. Coltivati su CLA, gli isolati producevano microconidi su corte monofialidi e macroconidi in sporodochi. I primi erano unicellulari, di forma ovale o ellittica, e dimensioni di 5,0-7,4 \times 1,7-3,1 (media: 6,2 \times 2,4) μm . I secondi, dotati di 3-5 (media: 4) setti, avevano forma leggermente falcata, con cellula basale a forma di piede, cellula apicale ottusa e dimensioni di 28,4-48,4 \times 2,8-4,1 (media: 38,3 \times 3,5) μm . Su CLA, gli isolati producevano anche le clamidospore: sia terminali che intercalari; esse erano dotate di parete verrucosa e apparivano singole, in coppie, in catene o in gruppi. Le loro dimensioni variavano da 5,6 a 11,5 (media: 7,4) μm . Anche nel caso di *C. peruvianus florida* le caratteristiche morfologiche degli isolati conducevano a *F.*

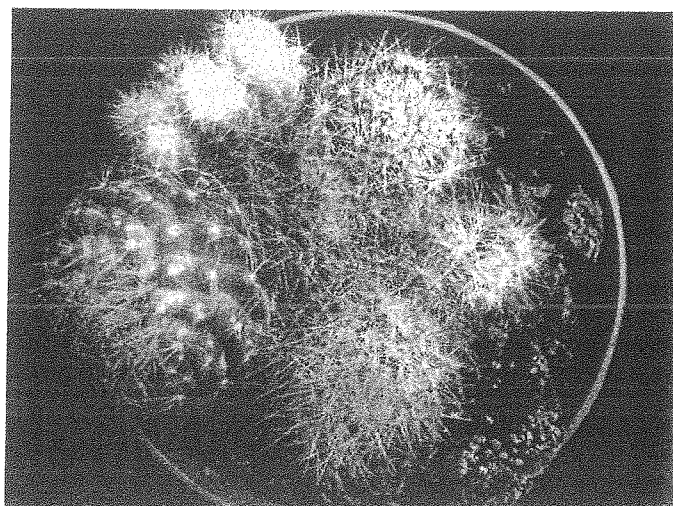


Figura 3 - Avvizzimento e disseccamento dei fusti di *Mammillaria zeilmanniana* causati da *Fusarium oxysporum*.
 Figure 3 - Wilt and rot caused by *Fusarium oxysporum* on affected stems of *Mammillaria zeilmanniana*.

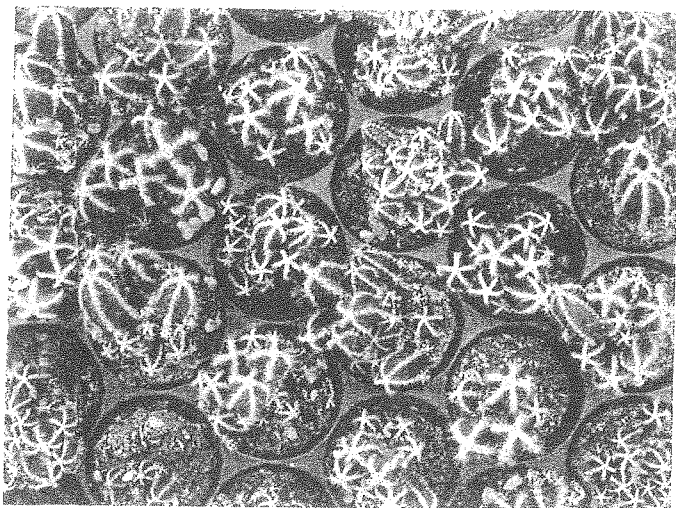


Figura 4 – Accrescimento stentato causato da *Fusarium oxysporum* di giovani piante di *Cereus peruvianus florida* allevate in alveolo.
Figure 4 – Stunted growth caused by *Fusarium oxysporum* on young plants of *Cereus peruvianus florida*.

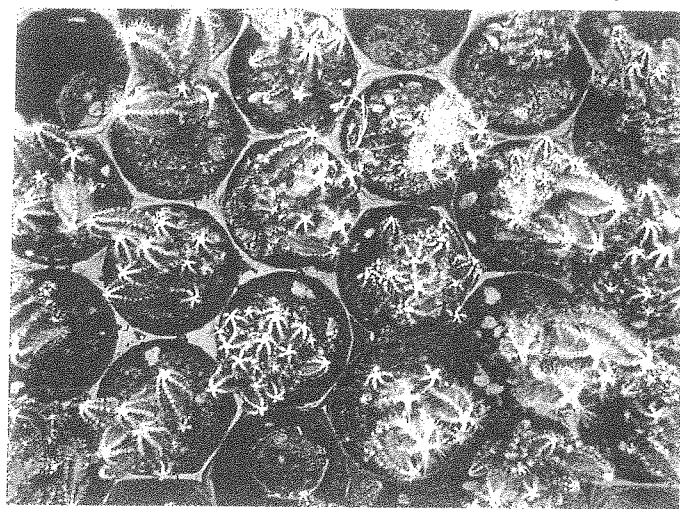


Figura 5 - Progressivo, lento deperimento causato da *Fusarium oxysporum* su piante di *Cereus peruvianus florida* allevate in alveolo.
Figure 5 - Progressive and slow withering caused by *Fusarium oxysporum* on plants of *Cereus peruvianus florida*.

oxysporum (Leslie e Summerell, 2006).

Anche per *C. peruvianus florida* l'identificazione morfologica era confermata effettuando l'analisi del gene TEF (Elongation Factor 1 α). Questa, condotta sulla coltura di un ceppo monoconidico (DB14NOV09M1), seguendo la stessa metodologia prima riportata, dava una sequenza di 413 paia di basi (GenBank accession number KT183484) che identificava l'isolato come *F. oxysporum*.

Test di patogenicità

Per *M. zeilmanniana* i sintomi precedentemente descritti venivano riprodotti inoculando artificialmente tre piante apparentemente sane della stessa specie. Le piante erano state ottenute per seme, avevano 25 mesi di età, ed erano allevate in vaso, in una miscela di torba di sfagno, perlite, corteccia di pino e argilla (50:20:20:10). La tecnica di inoculazione adottata consisteva nel praticare delle ferite sui fusti dell'ospite (3/pianta) in cui erano successivamente inseriti 3

spilli, precedentemente sterilizzati, recanti all'estremità un frammento di micelio prelevato da una coltura dell'isolato monoconidico DB14OTT12M1, coltivato per 15 giorni, su PDA (Talgø e Stensvand, 2013). Tre piante testimone erano ferite con spilli senza inoculo. Tutte le piante erano sistemate in serra, dove la temperatura variava da 22 a 34°C. La comparsa delle prime necrosi si verificava 5 giorni dopo l'inoculazione artificiale, attorno alle ferite praticate sulle sole piante inoculate. Con il progredire della malattia, i fusti marcivano, le piante morivano e disseccavano. Dai tessuti necrotizzati delle piante inoculate veniva reisolato lo stesso parassita inoculato, soddisfacendo i postulati di Koch. Il test di patogenicità era ripetuto due volte con analogo risultato. Per *C. peruvianus florida* il test di patogenicità era effettuato adottando la stessa tecnica descritta sopra. L'isolato monoconidico inoculato (DB14NOV09M1) era coltivato su PDA per 12 giorni e quindi inoculato in 3 piante di *C. peruvianus florida* (3 ferite/pianta) allevate in vaso, nello stesso tipo di substrato precedentemente descritto. Anche in questo caso, le tre piante testimone erano ferite con spilli privi di inoculo. Le piante inoculate e quelle testimone erano allevate in serra, soggetta a una temperatura variabile da 21 a 34°C. Le prime necrosi comparivano dopo soli due giorni, attorno alle ferite inoculate con il parassita. Successivamente, le necrosi si estendevano all'interno dei fusti, fino a provocarne il totale svuotamento. Non di rado i fusti colonnari infetti cedevano stroncati dal marciume dei tessuti interni (Fig. 6). Lo stesso parassita inoculato era reisolato dalle piante infette, soddisfacendo i postulati di Koch. Al contrario, nessuna colonia compariva dai tentativi di reisolamento effettuati dalle piante testimone che restavano asintomatiche. Il test di patogenicità veniva ripetuto, ottenendo lo stesso risultato.

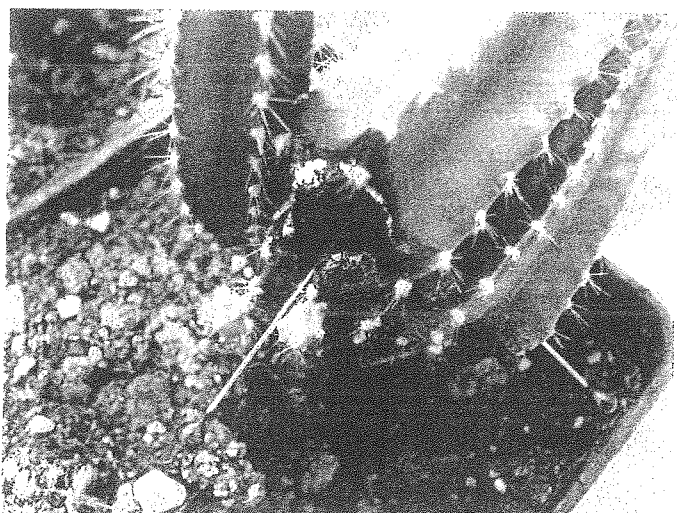


Figura 6 - Marciume su fusto di *Cereus peruvianus florida* artificialmente inoculato con *Fusarium oxysporum*.
Figure 6 - Stem rot of *Cereus peruvianus florida* artificially inoculated with *Fusarium oxysporum*.

Conclusioni

F. oxysporum su *M. zeilmanniana* è stato segnalato in California (French, 1989) e Florida (Alfieri *et al.*, 1984). Sul genere *Cereus* ricordiamo *Fusarium blasticola* su

varie cactacee, tra cui *Cereus* spp. nella ex Cecoslovacchia (Petak, 1931), *F. oxysporum* su *C. schottii* in Messico (McLaughlin, 1934) e su *Cereus* sp. negli Stati Uniti (Farr *et al.*, 1989) e ancora lo stesso parassita recentemente segnalato su *Cereus peruvianus monstruosus* (Garibaldi *et al.*, 2011) e *C. marginatus* var. *crispata* (Garibaldi *et al.*, 2014).

Per prevenire e contrastare la diffusione di *F. oxysporum* su *M. zilmanniana* e *C. peruvianus florida* si rimanda a quanto recentemente suggerito nei confronti di questo parassita su *Astrophytum myriostigma* ed *Euphorbia mamillaris* var. *variegata* (Bertetti *et al.*, 2016). Pertanto, in questa occasione ribadiamo solamente la necessità di accertare la forma *specialis* di appartenenza degli ultimi isolati di *F. oxysporum*: qualora si trattasse di *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum*, già riportato su alcune specie succulente in Italia (Polizzi e Vitale, 2004; Lops *et al.*, 2013), particolare attenzione andrà posta per evitare la formazione accidentale di feite causate da lavorazioni o da irrigazione irregolare. Inoltre, durante le operazioni di taleggio, oltre ad evitare tutte le possibili contaminazioni (i materiali ed utensili impiegati durante questa operazione, compresi i bancali di lavorazione, necessitano di essere lavati con prodotti adatti all'igienizzazione), sarà opportuno disinfettare la superficie di taglio con un fungicida attivo contro i *Fusarium*. Infine, essendo i due ospiti riportati in questa nota riproducibili anche tramite seme, pare opportuno verificare con opportuni test *in vitro* la trasmissibilità del parassita tramite seme infetto.

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

Alfieri S. A., Langdon K. R., Wehlburg C., Kimbrough J. W. (1984) - Index of Plant Diseases in Florida. Florida Department of Agriculture and Consumer Service, Division of the Plant Industry Bulletin, 11, 1-389.
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., Pensa P., Gullino M. L., Garibaldi A. (2016) - Attacchi di *Fusarium oxysporum* su due nuove specie succulente coltivate in Italia: *Astrophytum myriostigma* ed *Euphorbia mamillaris* var. *variegata*. Protezione delle Colture, 9 (1), 22-26.

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.

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.

French A. M. (1989) - California plant disease host index. California Department of Food and Agriculture, Division of Plant Industry, Sacramento, California, USA, 394 pp.

Garibaldi A., Pensa P., Bertetti D., Ortu G., Gullino M. L. (2014) - First report of dry and soft rot of *Cereus marginatus* var. *crispata* caused by *Fusarium oxysporum* in Italy. Plant Disease, 98, 1441.

Garibaldi A., Pensa P., Bertetti D., Poli A., Gullino M. L. (2011) - First report of basal stem rot of Apple Cactus (*Cereus peruvianus monstruosus*) caused by *Fusarium oxysporum* in Italy. Plant Disease, 95, 877.

Leslie J. F., Summerell B. A. (2006) - The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa, USA, 388 pp.

Lops F., Cibelli F., Raimondo M. L., Carlucci A. (2013) - First report of stem wilt and root rot of *Schlumbergera truncata* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* in southern Italy. Plant Disease, 97, 846.

McLaughlin A. M. (1934) - A *Fusarium* disease of *Cereus schottii*. Phytopathology, 34, 495-506.

O'Donnell K., Kistler H. C., Cigelnik E., Ploetz R. C. (1998) - Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Science USA, 95, 2044-2049.

Petrak F. (1931) - Contributions to the knowledge of some fungous diseases of Cacti. Zeitschr. für Parasitenkunde, 5, 226-249.

Polizzi G., Vitale A. (2004) - First report of basal stem rot of golden barrel cactus caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* in Italy. Plant Disease, 88, 85.

Talgø V., Stensvand A. (2013) - A simple and effective inoculation method for *Phytophthora* and fungal species on woody plants. OEPP/EPPO Bulletin 43 (2), 276-279.