

Attacchi di *Myrothecium verrucaria* su spinacio in Italia

Giovanna Gilardi* - 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

Nella primavera del 2015, piante di spinacio (*Spinacia oleracea* L.) cv Donkey coltivato in tunnel in provincia di Brescia su circa 1 ha, mostravano alterazioni fogliari in precedenza mai osservate. La distribuzione dei sintomi nelle coltivazioni era uniforme e interessava il 5-10% delle piante. Dai tessuti alterati veniva costantemente isolato un fungo identificato come *Myrothecium verrucaria*. Vengono descritti i sintomi della malattia osservata per la prima volta in Italia e nel mondo e riportate informazioni ritrovate nella letteratura scientifica su questo patogeno.

Parole chiave *Spinacia oleracea*; colture orticole da foglia; necrosi fogliari; ortaggi di quarta gamma.

Summary

First report of a new leaf spot of spinach caused by *Myrothecium verrucaria* in Italy

*In the spring 2015 plants of spinach (*Spinacia oleracea* L.) cv. Donkey showed symptoms of a new foliar disease spread on about 1 ha of commercial plastic greenhouses near Brescia, in northern Italy. The disease, caused by *Myrothecium verrucaria*, interested five to ten percent of the plants. Disease symptoms observed for the first time in Italy as well as in the world on spinach are described. The information found in the scientific literature on this pathogen are reported.*

Key words: *Spinacia oleracea*; leafy vegetables; leaf spot; ready to eat vegetables.



Figura 1 - Necrosi fogliari causate da *Myrothecium verrucaria* su spinacio.

Figure 1 – Leaf spots caused by *Myrothecium verrucaria* on spinach.

Introduzione

La coltivazione dello spinacio (*Spinacia oleracea* L.) in Italia è attuata frequentemente in ambiente protetto. La produzione destinata al mercato della quarta gamma assume particolare rilievo in alcune regioni quali Campania (1200 ha), Veneto (300 ha), e Toscana (1100 ha), mentre in Lombardia tale coltura assume un peso di circa il 5% della superficie destinata a lattuga, rucola selvatica, valerianella, bietola e da altre brassicacee minori. Le recenti osservazioni dei numerosi patogeni osservati per la prima volta in Italia nei sistemi colturali per la IV gamma, rappresentano un chiaro esempio delle problematiche fitopatologiche che possono emergere come conseguenza dell'intenso sfruttamento dei terreni coltivati. In particolare su spinacio è recente l'osservazione di *Fusarium oxysporum* f.sp. *spinaciae* (Sigillo *et al.*, 2014) e *Pythium aphanidermatum* in Campania (Garibaldi *et al.*, 2015).

In questa breve nota viene segnalata la presenza, per la prima volta in Italia, di attacchi di un agente di necrosi fogliari osservato su piante di spinacio coltivate in tunnel presso un'azienda lombarda in provincia di Bergamo. Si descrivono i sintomi dell'alterazione, le caratteristiche morfologiche utili all'identificazione dell'agente causale e le informazioni rinvenute in letteratura scientifica su questo patogeno.

Descrizione della malattia

Durante la primavera del 2015, venivano osservate alterazioni fogliari su piante di spinacio cv Donkey seminate nel mese di aprile a partire da seme conciato con

thiram e metalaxyl-M. I primi sintomi venivano osservati sulle prime foglie vere, 10-15 giorni dopo la semina e consistevano in aree circolari e depresse (1-2 mm) con margini definiti visibili su entrambi i lembi fogliari seguiti da clorosi fogliari. In presenza di elevata umidità relativa le necrosi evolvevano rapidamente con un andamento ad anelli concentrici e i tessuti erano interessati da marciumi molli (Figura 1). I sintomi venivano osservati in presenza di temperature dell'aria comprese tra i 10 e i 20°C, su una superficie coltivata di circa 1 ha di tunnel con una diffusione a macchia. Presso tali aree la diffusione dei sintomi interessava il 5-10% delle piante con una gravità variabile. Le piante nelle parti più umide dei tunnel andavano incontro a una rapida morte. Sui tessuti fogliari, veniva osservata la presenza di agglomerati neri rappresentati da sporodochi del patogeno di colore bianco crema virante al nero con l'età (Figura 2).

Identificazione del patogeno

In laboratorio si è proceduto all'isolamento in purezza del patogeno dalle parti alterate delle piante di spinacio. I tessuti rappresentati da frammenti di tessuto fogliare alterato, di circa 15 foglie venivano lavati in una soluzione di ipoclorito all'1% e immediatamente risciacquati in acqua sterile e posizionati in capsule Petri contenenti il substrato potato dextrose agar (PDA) addizionato di solfato di streptomicina (25 mg/l). Dopo cinque giorni di incubazione alla temperatura di 24°C il 70% delle colonie era costituito da un fungo bianco ad accrescimento lento. Con il trascorrere del tempo, dopo circa 6 giorni nell'interno della massa di micelio venivano osservate formazioni rappresentate da sporodochi, ad andamento concentrico, spesso confluenti, di colore verde-nero. All'osservazione al microscopio i conidi erano di forma prevalentemente cilindrica, non settati, delle dimensioni di 5,8-9,2 (7,6) e 1,9-2,8 (2,4) µm corrispondenti alle caratteristiche di *Myrothecium* sp. (Domsch *et al.*, 1980).

Per l'identificazione molecolare del patogeno, il DNA di un isolato scelto come rappresentativo tra i 5 ottenuti dalle piante di spinacio mostranti i sintomi sopra descritti, era estratto a partire da una coltura monoconidica con E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA), ed usato per una reazione di PCR mediante i primers ITS1/ITS4 impiegati per l'amplificazione della regione intergenica tra le sequenze codificanti per gli RNA ribosomiali 28S e 18S, comprendente al suo interno la sequenza del rRNA 5,8S (Internal Transcribed Spacer) (White *et al.*, 1990). Il prodotto era purificato ed inviato a sequenziare mediante BMR Genomics (Padova), ottenendo una sequenza di 516 paia di basi depositata con il GenBank accession number KT354922. L'analisi della sequenza con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) consentiva l'identificazione del patogeno come *Myrothecium verrucaria* (Alb. & Schwein) Ditmar:Fr. avendo il 100% di similarità con la sequenza depositata con il codice KR708633.1.

Verifica della patogenicità

La riproduzione dei sintomi osservati in campo è stata



Figura 2 – Particolare dei sintomi fogliari causate da *Myrothecium verrucaria* su spinacio.

Figure 2 – Detail of symptoms caused by *Myrothecium verrucaria* on spinach.

effettuata mediante inoculazione artificiale di spinacio (cv Donkey) 15 giorni dopo la semina effettuata in vasi della capacità di 2 litri di substrato. Un isolato del patogeno era scelto come rappresentativo e propagato su PDA. La sospensione di conidi ottenuta a partire dalla coltura del patogeno, veniva portata alla concentrazione di 1×10^6 conidi/ml e veniva irrorata sulle piante di spinacio mediante nebulizzazione. Successivamente all'inoculazione artificiale i vasi venivano posti in cella climatica alla temperatura compresa tra 20 e 24°C in condizioni di umidità relativa prossima alla saturazione ottenuta mediante l'incappucciamento con sacchetti di polietilene trasparente per 5 giorni. Venivano impiegati 5 vasi con 10 piante/vaso. Dopo 7 giorni veniva osservata su spinacio la presenza di necrosi fogliari simili a quelle osservate sulle piante colpite in tunnel, confermando la patogenicità dell'isolato fungino saggiato. Nessuna alterazione fogliare veniva rilevata sulle piante testimoni, irrorate con acqua sterile e mantenute nelle stesse condizioni ambientali. Le prove sono state ripetute tre volte ottenendo una diffusione delle necrosi fogliari sul 60-70% delle foglie con la comparsa di sintomi analoghi a quelli osservati in campo. Il re-isolamento dello stesso fungo mostrante le caratteristiche morfologiche di *M. verrucaria* ha soddisfatto i postulati di Koch confermando che tale isolato è l'agente causale delle necrosi fogliari osservate su spinacio.

Conclusioni

A quanto ci risulta questa è la prima segnalazione nel mondo di attacchi di *Myrothecium verrucaria* su spinacio. Isolati fungini di questa specie sono stati studiati per il possibile impiego come antagonisti di patogeni fogliari (Yang, 1994; Yang *et al.*, 1995 a,b). E' inoltre riportata la possibilità di questa specie di essere impiegato come erbicida biologico (Yang e Jong, 1995a; Weavera *et al.*, 2009). Walker e Tilley (1997) in prove condotte in condizioni controllate studiando le potenzialità di un isolato di *M. verrucaria* come erbicida biologico hanno evidenziato una elevata virulenza (oltre l'80% delle piante morte) su diverse specie infestanti

e coltivate tra cui *Amaranthus retroflexus*, *Helianthus annuus*, *Raphanus sativus*, *Pisum sativum*, *Sesbania exaltata*, *Anoda cristata*, *Datura stramonium*. Tra queste specie sono riportate anche *Beta vulgaris* e *Chenopodium amaranticolor* appartenenti alla stessa famiglia botanica dello spinacio. L'uso come micorbicida e come mezzo di lotta biologico va quindi considerato con molta attenzione essendo *M. verrucaria* patogeno su diverse specie vegetali e di interesse ornamentale (Cunfer *et al.*, 1969; Nguyen *et al.*, 1973; Leath e Kendall, 1983) causando sintomi diversificati con una sempre più frequente osservazione in diverse parti del mondo (Farr e Rossman, 2015). Tra gli isolati di questa specie è nota una certa differenza di spettro di ospiti e virulenza (Cunfer *et al.*, 1969; Nguyen *et al.*, 1973; Yang e Jong, 1995a) e alcuni di essi sono produttori di micotossine (Domsch *et al.*, 1980).

Allo stato attuale è difficile capire l'origine di questa malattia causata da questo patogeno che è polifago, di cui in alcuni casi è stata accertata la possibilità di essere trasmesso mediante semi (Nguyen *et al.*, 1973). Gli attacchi di *M. verrucaria* su spinacio nell'area lombarda sono risultati, per il momento limitati. Non si conosce ancora con precisione l'estensione di tale alterazione in altre aziende, tuttavia in considerazione dell'elevata intensità di coltivazione e specializzazione dell'orticoltura locale, è ipotizzabile un elevato rischio di una manifestazione diffusa su larga scala del problema fitopatologico riscontrato. Sarà pertanto importante un attento monitoraggio considerando il recente ritrovamento della specie *Myrothecium roridum* su valerianella presso il medesimo areale di coltivazione di ortaggi per la IV gamma (Garibaldi *et al.*, 2016).

Ringraziamenti

Lavoro svolto con un contributo del progetto Europeo Horizon 2020 (EMPHASIS), No 634179 "Effective Management of Pests and Harmful Alien Species - Integrated Solutions".

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.
 Cunfer B. M., Graham J. H., Lukezic F. L. (1969) - Studies on the biology of *Myrothecium roridum* and *M. verrucaria* pathogenic on red clover. *Phytopathology*, 59, 1306-1309.
 Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H. (1980) -

Myrothecium. In: *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, New York, Vol. 1, 481-487.
 Farr D. F., Rossman A. Y. (2015) - *Fungal Databases - Syst. Mycol. Microbiol. Lab. ARS, USDA*. Accessibile da: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>, 22 Agosto 2015.
 Garibaldi A., Gilardi G., Ortega-Franco S., Gullino M. L. (2016) - First Report of Leaf Spot of Lamb's Lettuce (*Valerianella oleroria*) Caused by *Myrothecium roridum* in Italy. *Plant Disease*, 100, 1237.
 Garibaldi A., Gilardi G., Ortu G., Gullino M. L. (2015) - Root rot of spinach in Southern Italy caused by *Pythium aphanidermatum*, *Plant Disease*, 99, 1591.
 Leath K. T., Kendall W. A. (1983) - *Myrothecium roridum* and *M. verrucaria* pathogenic to roots of red clover and alfalfa. *Plant Disease*, 67, 1154-1155.
 Nguyen T. H., Mathur S. B., Neergaard P. (1973) - Seed-borne species of *Myrothecium* and their pathogenic potential. *Transactions of the British Mycological Society*, 61, 347-354.
 Sigillo L., Sinape V., Serratore V., Infantino A. (2014) Occurrence of Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* on spinach (*Spinacia oleracea*) in Southern Italy. *Plant Disease*, 98, 1003.
 Walker H. L., Tilley A. M. (1997) - Evaluation of an Isolate of *Myrothecium verrucaria* from Sicklepod (*Senna obtusifolia*) as a potential Mycoherbicide Agent. *Biological Control*, 10, 104-112.
 Weaver M. A., Jinb X., Hoagland R. E., Boyette C. D. (2009) - Bioherbicidal efficacy by *Myrothecium verrucaria* spray adjuvants or herbicide mixtures. *Biological Control*, 50, 150-156.
 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.
 Yang S. M. (1994) - Control of *Carduus acanthoides* with *Myrothecium verrucaria* in the greenhouse in the absence of dew. *Phytopathology*, 84, 1136.
 Yang S., Jong S. C. (1995a) - Host range determination of *Myrothecium verrucaria* isolated from leafy spurge. *Plant Disease*, 79, 994-997.
 Yang S., Jong S. C. (1995b) - Factors influencing pathogenicity of *Myrothecium verrucaria* isolated from *Euphorbia esula* on species of Euphorbia. *Plant Disease*, 79, 998-1002.