

Attacchi di *Botrytis cinerea* su *Anemone japonica* 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

Nei mesi autunnali del 2014 su piante di anemone giapponese, (*Anemone japonica*) coltivato a formare bordi misti in un giardino della Valle Cervo (Biella) ad una altezza di 900 m sono state osservate estese necrosi fogliari. Dai tessuti colpiti è stato costantemente isolato un fungo identificato sia in base alle osservazioni morfologiche sia mediante ITS come *Botrytis cinerea*. A quanto risulta dalla letteratura scientifica consultata, questa è la prima segnalazione di *Botrytis cinerea* su *Anemone japonica* in Italia e nel mondo.

Parola chiave: anemone; giardini; necrosi fogliari; muffa grigia.

Summary

A leaf spot of *Anemone japonica* caused by *Botrytis cinerea*
During the fall of 2014 a previously, unknown leaf spot was observed on Japanese anemone (*Anemone japonica*) grown in borders in a garden located in Valle Cervo near Biella (northern Italy) at 900 m. Affected plants showed extensive leaf necrosis. From affected leaf tissues was isolated constantly a fungus that, through morphological observation and ITS analysis was identified as *Botrytis cinerea*. To our knowledge, this is the first report of this pathogen on *Anemone japonica* in Italy as well as worldwide.

Key words: Japanese anemone; gardens; foliar blight; gray mould.

Introduzione

L'anemone giapponese (*Anemone japonica*) è una pianta erbacea perennante rizomata appartenente alle Ranunculacee originaria della Cina. Ha un portamento cespuglioso con grandi foglie di colore verde chiaro e produce stoloni sotterranei. La fioritura avviene nel periodo autunnale con fiori piatti, larghi 6-8 cm, di colore bianco o rosato. Questa specie è dotata di resistenza sia alla siccità sia alle basse temperature ed è adatta per la costituzione di giardini a bassa manutenzione in zone collinari e montane.

In questa nota si riporta l'osservazione di una nuova malattia osservata nel Biellese su piante di anemone giapponese coltivate in un giardino della Valle Cervo durante l'autunno 2014.

Sintomatologia e isolamento del patogeno.

A partire dall'inizio di settembre 2014 e in ottobre su piante di anemone giapponese di 2-5 anni di età formanti cespugli di dimensione di 60-70 cm di diametro coltivate in un giardino di Valle Cervo (Biella), ad un'altitudine di 900 m (45°36'00"N 8°03'00"E), sono comparse alterazioni fogliari mai osservate



Figura 1 - Necrosi fogliari su *Anemone japonica* causate da *B. cinerea*.
Figure 1 - Leaf spot caused by *B. cinerea* on *Anemone japonica*.

prima su questa specie. Le aree necrotiche a carico delle foglie, si originavano spesso in corrispondenza delle aree in cui i petali ormai appassiti, staccandosi dai fiori, si posavano sulle foglie al termine della fioritura. Le necrosi risultavano inizialmente rotondeggianti, di pochi mm di diametro, successivamente si estendevano fino ad interessare l'intera lamina fogliare che disseccava (Figg. 1 e 2).

Gli attacchi interessavano la maggior parte delle piante presenti nel giardino con un'incidenza compresa tra il 10-25% delle foglie presenti durante il periodo di inizio fioritura (fine agosto inizio settembre) raggiungendo il 40-60% di foglie colpite alla fine di ottobre, in corrispondenza di temperature comprese tra i 10 e 20°C. Particolarmente gravi erano gli attacchi su foglie di piante allevate in condizioni ombrose o dove l'umidità relativa nei mesi di inizio autunno era più elevata. Da foglie prelevate in ripetute occasioni e portate in laboratorio si procedeva ad isolamenti su PDA (Potato Dextrose Agar) addizionato di solfato di streptomina (25 mg/l) dopo una disinfezione superficiale in una soluzione di ipoclorito di sodio (1%). Le capsule contenenti i frammenti di foglie colpite erano poste in termostato a 20-22°C in alternanza di luce/buio (12 ore di fotoperiodo). Dopo 5 giorni si osservava la presenza di colonie fungine inizialmente grigio-chiare virante nei successivi giorni al grigio scuro. In tali colture le ife settate producevano conidi ellissoidali di dimensione 11,4-19,3 (14,5) µm x 10,3-11,6 (11,6) µm. Sulla base delle caratteristiche morfologiche osservate il patogeno risultava ascrivibile alla specie *Botrytis cinerea* (Ellis e Waller, 1974).

Il DNA estratto da una coltura pura del fungo era usato per



Figura 2 - Residui fiorali come fonti di inoculo di *B. cinerea* su *Anemone japonica*.

Figure 2 - *B. cinerea* infected flower parts as inoculum source for leaf infection on *Anemone japonica*.

una reazione di PCR utilizzando i primer ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) 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). Il prodotto di PCR veniva sequenziato direttamente, ottenendo una sequenza di 447 paia di basi (GenBank accession number KU497733). Quest'ultima, analizzata con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) confermava che il fungo isolato dall'anemone appartiene alla specie *Botrytis cinerea* mostrando un'omologia del 100% con l'isolato GenBank accession number KT692578.

Inoculazione artificiale

Uno degli isolati ottenuti *in vitro* (sigla AG14-ITS32) era scelto come rappresentativo e inoculato su piante di *A. japonica* allevate in substrato di torba di sfagno in vaso di 3,5 L di capacità, aventi un anno circa di età. Per la verifica della patogenicità era impiegata una coltura del patogeno ottenuta dopo 7 giorni di accrescimento su PDA addizionato di streptomicina solfato. L'inoculazione delle foglie era effettuata in modo puntiforme simulando quanto osservato presso il giardino; in particolare, i petali prelevati da piante di anemone venivano irrorati con una sospensione di conidi e frammenti di micelio alla concentrazione di 1×10^5 conidi/ml ed erano immediatamente posti a contatto con le foglie sane. Le foglie inoculate venivano chiuse in un sacchetto di plastica trasparente per favorire il mantenimento di umidità relativa prossima alla saturazione. Complessivamente

venivano impiegate due piante e inoculate 5 foglie/pianta. Piante di *A. japonica* mantenute nelle medesime condizioni e non inoculate venivano impiegate come riferimento. Le piante erano tenute in serra alla temperatura compresa tra i 17 e 20°C. La camera umida era rimossa dopo 5 giorni. Necrosi puntiformi comparivano sulle piante inoculate con *B. cinerea* 7 giorni dopo l'inoculazione artificiale ed erano molto simili a quelle osservate sulle piante di anemone naturalmente infette. Sulle piante dei vasi testimoni non erano osservate alterazioni. Dalle foglie inoculate presentanti i sintomi descritti veniva regolarmente reisolato lo stesso fungo che presentava le caratteristiche morfologiche di *B. cinerea*.

Conclusioni

A quanto ci risulta questa è la prima segnalazione nel mondo di attacchi di *Botrytis cinerea* su *A. japonica*, mentre in letteratura scientifica è riportata la presenza di *Botrytis cinerea* su *A. coronaria* in Italia (Garibaldi, 1981). Su questa specie è nota la presenza *Aecidium ranunculacearum* e di una ruggine causata da *Urocystis japonica* in Cina, di un mal bianco causato da *Oidium* sp. e di *Phyllosticta anemones* in sud Africa (Farr e Rossman, 2015).

Gli attacchi di *B. cinerea* sull'anemone giapponese sono risultati, per il momento limitati, in base alle nostre osservazioni, a diversi giardini del biellese.

In merito alle misure di prevenzione della muffa grigia dell'anemone è utile eliminare e distruggere prontamente gli steli infetti. Risulta di estrema importanza evitare che la vegetazione resti bagnata per tempi prolungati, per cui si sconsigliano le irrigazioni serali e trapianti in posizioni in ombra.

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.
- Ellis M. B., Waller J. M. (1974) - *Sclerotinia fuckeliana* (conidial state: *Botrytis cinerea*). *CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria*, 431, 1-2.
- Farr D. F., Rossman A. Y. (2015) - *Fungal Databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Fonte: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>.
- Garibaldi A. (1981) - Le principali malattie crittogamiche dell'anemone. *Culture Protette*, 10 (7), 43-48.
- White T. J., T. Bruns, 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, Inc., New York, NY, USA, 315–322.