

Attacchi di *Colletotrichum kahawae* su rucola coltivata (*Eruca sativa*) in Italia

Giovanna Gilardi* - Ivana Puglisi*** - Santa Olga Cacciola*** - Maria Lodovica Gullino*,** - Angelo Garibaldi*

*Centro di Competenza per l'Innovazione in campo agro-ambientale (Agroinnova) - Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, Grugliasco (TO)

**DISAFA- Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, Grugliasco (TO)

***Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente (Di3A),
Università degli Studi di Catania. Via S. Sofia, 100, Catania 95123

Riassunto

Durante l'estate-autunno 2014 sono state osservate alterazioni fogliari a carico di piante di *Eruca sativa* coltivate in serra in Piemonte. I sintomi osservati a carico delle foglie di piante dell'età compresa tra i 7 e 25 giorni dalla semina, consistevano in aree decolorate circolari a sviluppo rapido con diametro compreso tra i 5 e i 50 mm. Le foglie colpite gravemente disseccavano. L'alterazione è stata osservata in presenza di elevata umidità relativa, bagnatura fogliare e temperature comprese tra i 20 e i 28°C. Dagli isolamenti effettuati veniva ottenuto un fungo mostrante conidi cilindrici di 9,3-16,5 (14,4) x 3,4-6,3(4,7) µm e acervuli corrispondenti alle caratteristiche di un *Colletotrichum*. Tale osservazione veniva confermata mediante l'amplificazione della regione ITS1-5.8-ITS2 e del gene β tubulina 2 secondo la quale è stato ottenuto un prodotto di amplificazione di 600 pb (KT259853) che identificava il patogeno come *Colletotrichum kahawae*. Questa è la prima segnalazione di *C. kahawae* su rucola coltivata in Italia e nel mondo.

Parole chiave: patogeni fogliari; IV gamma; antracnosi.

Summary

First report of leaf spot of rocket (*Eruca sativa*) caused by *Colletotrichum kahawae* in Italy

In the summer-autumn 2014 on plants of cultivated rocket (Eruca sativa) grown in commercial greenhouses in Piedmont (Northern- Italy), symptoms of a new leaf spot disease were observed. Affected plants of 7 to 25 days from sowing, showed a leaf spot normally circular, usually 5 to 50 mm in diameter located on the foliar limb. At later stages severely infected leaves dried up and died. A fungus showing conidia of size 9,3-16,5 (14,4) x 3,4-6,3(4,7) µm emerging from acervuli typical of Colletotrichum was consistently isolated from leaf tissues of symptomatic plants. The disease was severe under high humidity conditions at air temperature of 20-28°C. The ITS1-5.8S-ITS2 region and the fragment of the beta-tubulin 2 gene (TUB2) of genomic DNA of one representative isolate was amplified. The 600 bp segment obtained showed that the pathogen belong to Colletotrichum kahawae. Symptoms of this disease are described, as well as the morphological and molecular identification of the pathogen. This is the first report of Colletotrichum kahawae on cultivated rocket in Italy as well as worldwide.

Key words: foliar pathogens; fresh cut leafy vegetables; anthracnose.

Introduzione

Negli ultimi anni l'interesse degli orticoltori si è rivolto a specie minori tra cui la rucola coltivata [*Eruca sativa* Mill., anche indicata come *E. vesicaria* (L.) Cav. subsp. *sativa* (Mill.) Thell.] (Bianco *et al.*, 2009), pianta annuale che è essenzialmente destinata alle produzioni di prima gamma come prodotto in mazzetto, alla trasformazione per la produzione di salse a base di pesto e al consumo come prodotto di IV gamma.

La coltivazione intensiva di specie minori, come è accaduto per la rucola, può favorire l'insorgenza di alterazioni mai descritte in precedenza. Tra le fitopatie osservate su rucola coltivata responsabili di alterazioni dell'apparato fogliare sono note al momento *Fusarium equiseti* e *Alternaria japonica* (Garibaldi *et al.*, 2011a,b) e *Peronospora parasitica* (Koike *et al.*, 1998; Rimmer *et al.*, 2007). In questa nota descriviamo i sintomi di una nuova malattia fogliare osservata per la prima volta in Italia e, a quanto ci risulta nel mondo, in coltivazioni di *E. sativa* in Piemonte.

Sintomatologia

Su piante di rucola coltivate in diversi tunnel in plastica su una superficie di circa 1 ettaro, a partire dal mese di agosto 2014 fino all'ottobre successivo sono comparse delle alterazioni consistenti in macchie depresse di 5-50 mm di diametro. I sintomi si osservavano come piccole lesioni circolari, infossate, spesso bianche al centro, con un margine netto e marrone scuro che in seguito si sviluppavano fino ad interessare anche l'intero lembo fogliare (Figure 1 e 2). L'alterazione, interessava con intensità variabile tra il 5 e il 15% le coltivazioni di rucola coltivata iniziando a manifestarsi sia su piante allo stadio di cotiledoni sia su quelle di 25-35 giorni dalla semina. L'alterazione è stata osservata in presenza di elevata umidità relativa, bagnatura fogliare e temperature comprese tra i 20 e i 28°C. La fase finale dell'alterazione consisteva nel disseccamento delle foglie colpite.

Identificazione del patogeno

Gli isolamenti erano effettuati a partire dalle foglie colpite



Figura 1 - Necrosi fogliari causate da *Colletotrichum kahawae* su rucola coltivata in tunnel.

Figure 1 - Leaf spot caused by *Colletotrichum kahawae* on cultivated rocket in tunnel.

utilizzando PDA (Potato Dextrose Agar) addizionato di solfato di streptomina (25 mg/litri). I tessuti erano precedentemente disinfettati in una soluzione di ipoclorito di sodio (1%) per circa 10 secondi e poi abbondantemente sciacquati in acqua sterile. Le capsule Petri con gli isolamenti erano mantenute in termostato a 22-24° C. Le colonie fungine che si sviluppavano dagli isolamenti dopo un periodo di incubazione di 6 giorni in alternanza di luce/buio erano di colore grigio virante al nero. L'osservazione al microscopio ottico consentiva di evidenziare la presenza di acervuli 91,5 x 79,0 (86,4) µm tipici del genere *Colletotrichum* e di conidi di forma prevalentemente cilindrica di dimensioni comprese tra 9,3-16,5 (14,4) x 3,4-6,3(4,7) µm (Bailey e Jeger, 1992).

Il DNA è stato estratto da un isolato scelto come rappresentativo usando il Kit PowerPlant Pro DNA Isolation (MO BIO Laboratories, USA). La regione ITS1-5.8S-ITS2 e il frammento della beta-tubulina 2 (TUB2) compreso fra gli esoni 2 e 6 sono stati amplificati usando 200 ng di DNA genomico (Faedda *et al.*, 2011) ottenendo il prodotto di amplificazione di 600 pb. L'analisi della sequenza, effettuata con l'utilizzo dell'algoritmo BLASTn (Morgulis *et al.*, 2008) (E=0), ha consentito di identificare il patogeno come *Colletotrichum kahawae* (GenBank accession number KT259853) che mostrava il 100% di omologia con l'isolato depositato in banca dati KC425710.1 (Schena *et al.*, 2014).

Inoculazione artificiale

Uno degli isolati scelto come rappresentativo tra quelli ottenuti *in vitro* era inoculato su 15 piante di rucola coltivate di 25 giorni di età coltivate in vasi della capacità di 2 litri di substrato contenenti terriccio costituito da torba di sfagno, pomice, corteccia di pino e argilla. L'inoculo consisteva in colture del fungo ottenute dopo 8-10 giorni di accrescimento *in vitro* su PDA in alternanza luce/buio. L'inoculazione avveniva irrorando sulle foglie delle piante una sospensione di conidi alla concentrazione di 1x10⁵ conidi/ml. Subito dopo l'inoculazione le piante erano mantenute per 5 giorni in camera umida e sistemate in cella climatica alla temperatura di 25°C. I primi sintomi venivano osservati alla rimozione



Figura 2 - Particolari dei sintomi fogliari degli attacchi di *Colletotrichum kahawae* su rucola.

Figure 2 - Detail of leaf symptoms caused by *Colletotrichum kahawae* on rocket.

della camera umida consistenti in diffuse necrosi puntiformi che evolvevano in necrosi estese nel corso di 7-10 giorni. I sintomi corrispondevano a quelli osservati sulle piante in natura. Sulle piante testimoni non si osservava la presenza di alcun sintomo. Dalle foglie delle piante inoculate veniva ripetutamente reisolato lo stesso fungo mostrante le caratteristiche morfologiche riconducibili a *Colletotrichum*. Nessun fungo veniva ottenuto dalle piante di rucola coltivate impiegate come testimone.

Conclusioni

Su *E. sativa* coltivata in sistemi produttivi intensivi per la quarta gamma negli USA in Florida e in Giappone sono state osservate alterazioni fogliari causate da un altro agente di antracnosi identificato come *Colletotrichum higginsianum* (Takeuchi *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2014); tale specie è riportata su *Lepidium draba*, specie infestante invasiva in Europa (Caesar *et al.*, 2010), risultando inoltre patogeno su diverse brassicacee coltivate quali ravanello (*Raphanus sativus*), rapa (*Brassica rapa*) e *Brassica juncea* (Caesar *et al.*, 2010). *Colletotrichum kahawae* è stato identificato tra le specie responsabili di antracnosi su mango in Italia (Ismail *et al.*, 2015). La possibile causa della comparsa di *C. kahawae* su rucola nei nostri areali sarà oggetto di approfondimento al fine di adottare opportune strategie preventive volte a contenere la diffusione di questo patogeno.

A quanto ci risulta questa è la prima segnalazione in Italia e nel mondo di attacchi di *Colletotrichum kahawae* su rucola coltivata.

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 Horizon2020 (Contratto N. 634179).

Lavori citati

- Bailey J. A., Jeger M. J. (1992) - *Colletotrichum*. Biology, Pathology and Control. CAB International, Wallingford, UK
- Bianco V. (2009) - Le specie ortive minori in Italia. *Italus Hortus*, 16, 1-21.
- Caesar A. J., Lartey R. T., Caesar-TonThat T. (2010) - First report of anthracnose stem canker of the invasive perennial weed *Lepidium draba* caused by *Colletotrichum higginsianum* in Europe. *Plant Disease*, 94, 1166.
- Faemma R., Agosteo G. E., Schena L., Mosca S., Frisullo S., Magnano di San Lio G., Cacciola S. O. (2011) - *Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the causal agent of olive anthracnose in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 283-302
- Garibaldi A., Gilardi G., Bertoldo C., Gullino M. L. (2011 a) - First report of leaf spot of rocket (*Eruca sativa*) caused by *Fusarium equiseti* in Italy. *Plant Disease*, 95, 1315.
- Garibaldi A., Gilardi G., Bertoldo C., Gullino M. L. (2011 b) - First report of leaf spot of wild (*Diplotaxis tenuifolia*) and cultivated (*Eruca vesicaria*) rocket caused by *Alternaria japonica* in Italy. *Plant Disease*, 95, 1316.
- Ismail A. M., Cirvilleri G., Yaseen T., Epifani F., Perrone G., Polizzi G. (2015) - Characterisation of *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of mango in Italy. *Journal of Plant Pathology* 97, 167-171.
- Koike S. T. (1998) - Downy mildew of arugula, caused by *Peronospora parasitica*, in California. *Plant Disease*, 82, 1063.
- Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T. L., Agarwala R., Schäffer A. A. (2008) - Database Indexing for production MegaBLAST Searches. *Bioinformatics*, 24, 1757-1764.
- Patel J. S., Costa de Novaes M. L., Zhang S. (2014) - First Report of *Colletotrichum higginsianum* Causing Anthracnose of Arugula (*Eruca sativa*) in Florida. *Plant Disease*, 98, 1269.
- Rimmer S. R., Shattuck V. I., Buchwaldt L. (2007) - Compendium of brassica diseases. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA, 117 pp.
- Schena L., Mosca S., Cacciola S. O., Faemma R., Sanzani S. M., Agosteo G. E., Sergeeva V., Magnano di San Lio G. (2014) - Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant Pathology*, 63, 437-446.
- Takeuchi J., Horie H., Shimada R. (2007) - First report of anthracnose of rocket salad by *Colletotrichum higginsianum* occurring in Japan. *Annual Report of the Kanto-Tosan Plant Protection Society* 54, 31-34.