

Caratterizzazione di parassiti fogliari di colture orticole in passato identificati come *Myrothecium*

Slavica Matić* - Giulia Tabone* - Giovanna Gilardi*
- 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

Gravi necrosi fogliari e deperimenti delle piante causati da *Myrothecium roridum* e *Myrothecium verrucaria* sono stati osservati recentemente in coltivazioni intensive di ortaggi a foglia (valerianella, rucola selvatica, spinacio) nell'Italia settentrionale e meridionale. I generi *Paramyrothecium* e *Albifimbria* sono stati recentemente separati dal genere *Myrothecium* e contengono principalmente funghi saprofiti che vivono nel suolo, con la sola eccezione di *Paramyrothecium roridum* (in passato identificato come *M. roridum*) e *Albifimbria verrucaria* (già noto come *M. verrucaria*) identificati, invece, come fitopatogeni su diverse specie coltivate e spontanee. In questo studio sono stati impiegati 34 isolati di funghi identificati come *Myrothecium* ottenuti da piante interessate da necrosi fogliari appartenenti a sei specie orticole a foglia. La caratterizzazione morfologica degli isolati ha permesso l'assegnazione di 21 isolati a *Albifimbria verrucaria*, mentre i restanti isolati non potevano essere identificati morfologicamente. Le analisi BLASTn e le analisi filogenetiche di sei loci hanno permesso di identificare tutti i 34 isolati, i quali sono stati raggruppati in tre specie diverse: *Albifimbria verrucaria*, *Paramyrothecium foliicola* e *Paramyrothecium nigrum*. Nel corso di prove di patogenicità, tutte le tre specie fungine hanno causato necrosi fogliari sugli ospiti da cui sono state isolate. *P. foliicola* e *P. nigrum*, riportati in letteratura scientifica solo come saprofiti, sono risultati per la prima volta responsabili di necrosi fogliari su diverse specie orticole. I risultati ottenuti evidenziano il rischio di introduzione e di diffusione in campo di tali specie negli areali di coltivazione intensiva di ortaggi a foglia, considerando la possibilità dei semi di essere contaminanti in presenza di limitate conoscenze inerenti la lotta.

Parole chiave: Colture orticole a foglia; necrosi fogliare; *Albifimbria verrucaria*; *Paramyrothecium foliicola*; *Paramyrothecium nigrum*.

Summary

Characterization of leafy vegetable pathogens belonging to the group identified in the past as *Myrothecium*
Severe leaf necrosis and plant decay caused by *Myrothecium roridum* and *Myrothecium verrucaria* have recently been described on leafy vegetables as lamb's

lettuce, wildrocket and spinach under intensive cultivation in Northern and Southern Italy. *Paramyrothecium* and *Albifimbria* have recently been separated from the former genus *Myrothecium* and they mainly include saprophytic soil-inhabiting fungi, with the only exception of two phytopathogenic fungi, *Paramyrothecium roridum* (identified in the past as *M. roridum*) and *Albifimbria verrucaria* (already known as *M. verrucaria*). Thirty-four isolates of *Myrothecium*-like fungi have been obtained from plants affected by leaf necrosis belonging to six leafy vegetable hosts. The macro and micro-morphological observations of the isolates allowed the assignment of 21 isolates to *Albifimbria verrucaria*, while the remaining strains could not be distinguished morphologically. BLASTn and phylogenetic analyses of six loci assigned 34 strains to three different species: *Albifimbria verrucaria*, *Paramyrothecium foliicola* and *Paramyrothecium nigrum*. All three fungal species were able to cause the leaf necrosis on the original hosts as single species in pathogenicity assays. Two previously reported saprophytic species, *P. foliicola* and *P. nigrum*, observed in the development of plant disease for the first time show a particular risk of introduction and spread due to the possibility for seed-transmission, and to the limited studies for their management.

Key words: Leafy vegetables; leaf necrosis; *Albifimbria verrucaria*; *Paramyrothecium foliicola*; *Paramyrothecium nigrum*.

Introduzione

Gravi necrosi fogliari e deperimenti delle piante sono stati recentemente osservati in Italia in colture orticole. Gli agenti causali di queste alterazioni sono stati identificati come funghi appartenenti al genere *Myrothecium* (Tulloch, 1972); *M. roridum* e *M. verrucaria* (Garibaldi et al., 2016a, b, c). I funghi del genere *Myrothecium* appartengono al phylum *Ascomycota*, all'ordine *Hypocreales* e alla famiglia *Stachybotriaceae* (Crous et al., 2014). Un recente studio tassonomico della famiglia delle *Stachybotriaceae*, condotto sulla base dell'origine polifiletica delle specie in essa comprese, ha evidenziato differenze a carico del genere *Myrothecium* (introducendo 13 nuovi generi di funghi), identificati come 'myrothecium-like' (Lombard et al., 2016). Specie di questo genere sono diffuse in tutto il mondo e sono comuni abitanti del suolo, generalmente presenti come saprofiti su materiale vegetale in decomposizione (Domsch et al., 2007), con l'eccezione di *Paramyrothecium roridum* (già noto come *M. roridum*) e *Albifimbria verrucaria* (già noto come *M. verrucaria*) responsabili di deperimento e necrosi fogliari su diverse specie orticole ed erbacee coltivate e spontanee e, per tale motivo, utilizzati come agenti di lotta biologica a infestanti, nematodi, insetti (Twomey et al., 2000; Zhao et al., 2011).

Allo stato attuale è difficile capire l'origine delle alterazioni causate da *Myrothecium* spp. che sono polifagi e di cui, in alcuni casi, è stata accertata la possibilità di essere trasmessi mediante semi (Nguyen et al., 1973; Bharath et al., 2006). La loro simultanea comparsa, presso aree di coltivazione intensiva di ortaggi a foglia, fa comunque presupporre un elevato rischio di introduzione mediante materiale di propagazione, unitamente al manifestarsi di condizioni climatiche favorevoli.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di caratterizzare le specie fungine ascrivibili al genere *Myrothecium* isolate da diversi ortaggi a foglia e da basilico sulla base dell'aggiornamento tassonomico descritto da Lombard *et al.* (2016), impiegando analisi filogenetiche multi-locus. Sono stati inoltre condotti saggi per valutare la patogenicità delle diverse specie identificate nei confronti di diversi ortaggi a foglia per valutare possibili nuovi ospiti.

Sintomatologia

A partire dal 2015 rucola selvatica (*Diplotaxis tenuifolia* L.), rucola coltivata (*Eruca sativa* L.), valerianella (*Valerianella olitoria* L.), spinacio (*Spinacia oleracea* L.), lattuga (*Lactuca sativa* L.), basilico (*Ocimum basilicum* L.) coltivati in tunnel presso diverse aziende del nord e sud Italia e destinati al confezionamento in busta come prodotto pronto per l'uso, risultavano interessati da alterazioni dell'apparato fogliare in precedenza mai osservate su tali specie (Garibaldi *et al.*, 2016). I primi sintomi consistevano in piccole macchie circolari di colore grigio-marrone, di dimensioni di 1-2 mm, che espandendosi causavano lesioni necrotiche estese all'intero lembo fogliare. I tessuti colpiti generalmente assumevano una consistenza molle. Complessivamente, tra il 2015 e il 2018 a partire dai tessuti fogliari mostranti i sintomi precedentemente descritti sono stati ottenuti 34 isolati ascrivibili ai generi *Paramyrothecium* e *Albifimbria* (sin. *Myrothecium*), sottoposti a caratterizzazione morfologica e molecolare.

Identificazione morfologica

I 34 isolati sono stati propagati su agar patata (PDA; Merck®, Darmstadt, Germania), e osservati al microscopio ottico per la caratterizzazione morfologica. Gli isolati fungini presentavano abbondante micelio aereo con conidi portati in sporodochi scuri distribuiti in modo diverso sul substrato di coltivazione (Figura 1). In base a queste osservazioni 21 isolati venivano identificati come *A. verrucaria* e presentavano conidi ialini privi di setti, di forma limoniforme o ellissoidale senza appendici della dimensione di 5-7 × 2-3 µm ed erano portati in sporodochi che assumevano un colore verde-oliva o verde-scuro (Garibaldi *et al.*, 2016b, c), mentre il resto degli isolati non poteva essere identificato. In particolare, tali isolati presentavano le caratteristiche del genere *Paramyrothecium* che contiene specie morfologicamente indistinguibili (Lombard *et al.*, 2016). Questi isolati presentavano i conidi privi di setti, lisci, cilindrici-ellissoidali, di colore ialino-verde chiaro di dimensioni di circa 5-6,5 × 1-3 µm e con sporodochi di colore verde scuro-nero distribuiti sul PDA in anelli concentrici. Alcuni isolati di questo gruppo producevano su PDA essudati arancioni diffusi nel substrato e sono stati identificati mediante tecniche molecolari come *P. foliicola* (Figura 1).

Identificazione molecolare

L'identificazione molecolare dei 34 isolati è stata eseguita mediante estrazione del DNA fungino con il Kit E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini (Omega Bio-Tek, Darmstadt, Germania) e successiva amplificazione molecolare (PCR) della regione degli spaziatori

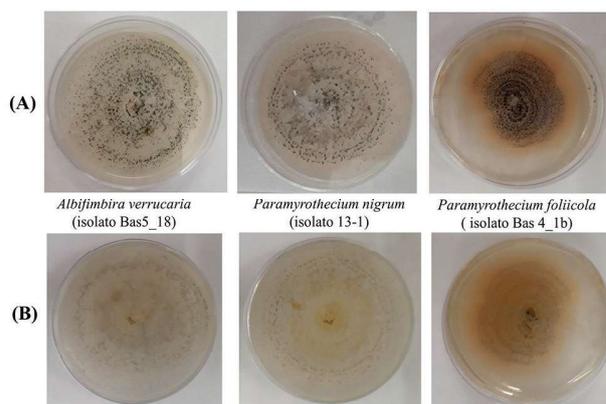


Figura 1 - Caratteristiche morfologiche di *Albifimbria verrucaria*, *Paramyrothecium foliicola* e *Paramyrothecium nigrum* su PDA. (A) Vista frontale del micelio su PDA; (B) vista inversa del micelio su PDA.

Figure 1 - Morphological characteristics of *Albifimbria verrucaria*, *Paramyrothecium foliicola* and *Paramyrothecium nigrum* on PDA. (A) Front view of a mycelium on PDA; (B) reverse view of a mycelium on PDA.

interni trascritti (ITS) mediante i primer ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990). I prodotti di PCR ottenuti, sono stati purificati ed inviati a sequenziare presso BMR Genomics (Padova) ottenendo sequenze di 510-530 paia di basi.

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle disponibili presso la banca dati NCBI utilizzando

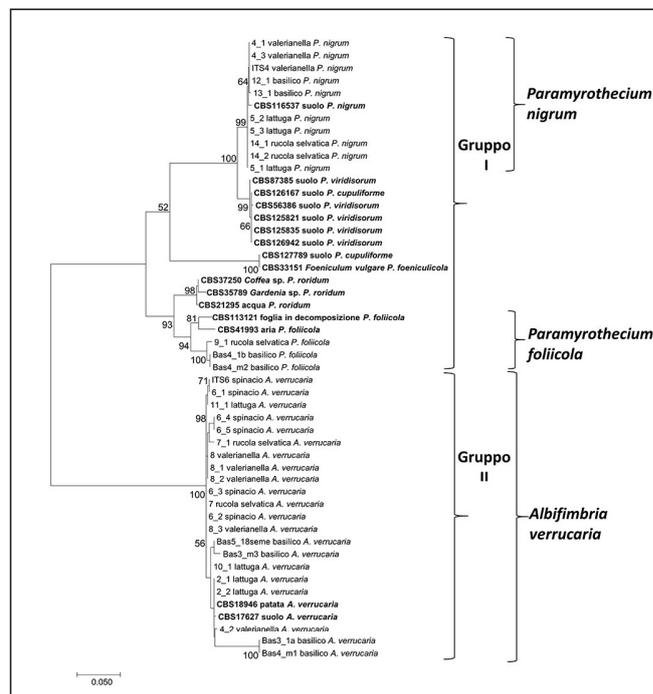


Figura 2 - Relazione filogenetica di *Albifimbria verrucaria*, *Paramyrothecium foliicola*, *Paramyrothecium nigrum* ed altre specie di *Paramyrothecium* sulla base del gene della calmodulina mediante analisi Maximum Likelihood. Gli isolati fungini di riferimento delle tre specie identificate e delle specie filogeneticamente vicine (Lombard *et al.*, 2016) sono riportati in grassetto.

Figure 2 - Phylogenetic relationship of *Albifimbria verrucaria*, *Paramyrothecium foliicola*, *Paramyrothecium nigrum* and other *Paramyrothecium spp.* based on calmodulin gene by Maximum Likelihood analysis. The reference fungal isolates of the three identified species and phylogenetically close species (Lombard *et al.*, 2016) are indicated in bold.

Tabella 1 - Reazione di diverse colture orticole da foglia all'inoculazione artificiale di isolati rappresentativi di *Paramyrothecium nigrum*, *Paramyrothecium foliicola* e *Albifimbria verrucaria* 7 giorni dopo l'inoculazione.
 Table 1 - Response of leafy vegetable hosts to the artificial inoculation of representative isolates belonging to *Paramyrothecium nigrum*, *Paramyrothecium foliicola*, and *Albifimbria verrucaria* 7 days after inoculation.

Specie	Isolato			
	<i>Paramyrothecium nigrum</i> 13-1	<i>Paramyrothecium foliicola</i> Bas4_1b	<i>Albifimbria verrucaria</i> ITS6	<i>Albifimbria verrucaria</i> as5_18
Lattuga	S	S	PR	PR
Valerianella	PR	PR	S	S
Rucola coltivata	AS	S	S	S
Rucola selvatica	S	AS	S	S
Spinacio	S	S	S	S
Basilico	S	S	PR	S

Gravità di malattia causata da diversi ceppi di *Paramyrothecium nigrum*, *Paramyrothecium foliicola* e *Albifimbria verrucaria*: 0-5% = resistente (R); 6-20% = parzialmente resistente (PR); 21-50% = suscettibile (S); >51-100% = altamente suscettibile (AS).

L'analisi BLASTn (Altschul *et al.*, 1997). Ventuno di esse hanno mostrato un'identità nucleotidica pari al 100% con *A. verrucaria*, mentre gli altri 13 isolati hanno mostrato un'elevata identità con diverse specie di *Paramyrothecium* (99-100%). Dieci dei 13 isolati sono risultati più simili a *P. roridum*, *Paramyrothecium nigrum*, ed altri *Paramyrothecium* spp., mentre 3 isolati (9-1, Bas4-1b, Bas4-m2) sono parsi più simili a *Paramyrothecium foliicola* e *P. roridum*.

L'analisi filogenetica sulla base dell'ITS e degli altri 5 loci (*tub2*, *cmdA*, *tef1*, LSU e *ATP6*) amplificati successivamente (Castlebury *et al.*, 2004; Lombard *et al.*, 2016) suddivideva gli isolati fungini in due gruppi (Figura 2). Il primo gruppo conteneva tutti gli isolati di *A. verrucaria* (incluso quello di riferimento) mentre il secondo gruppo includeva due sottogruppi. Il primo sottogruppo si differenziava in ulteriori due gruppi: (1) *P. nigrum* e (2) *Paramyrothecium viridisorum*, *Paramyrothecium foeniculicola* e *Paramyrothecium cupuliforme* con un valore di bootstrap del 52%. Il secondo sottogruppo includeva il gruppo di *P. roridum* e il gruppo di *P. foliicola*, con un valore di bootstrap del 93% (insieme ai rispettivi isolati di riferimento CBS). Inoltre, il gruppo di *P. nigrum* (valore: 99% bootstrap) includeva gli isolati studiati insieme all'isolato di riferimento di *P. nigrum*, chiaramente separati dalle specie filogeneticamente vicine di *P. viridisorum*, *P. foeniculicola* e *P. cupuliforme* (Lombard *et al.*, 2016). Il gruppo di *P. foliicola* (valore: 94% bootstrap) comprendeva gli isolati 9-1 da rucola selvatica e gli isolati Bas4-1b, Bas4-m2 ottenuti da basilico risultando distanti dal gruppo *P. roridum* (valore: 98% bootstrap). Successivamente sono state condotte analisi filogenetiche concatenate che hanno confermato l'appartenenza di questi isolati fungini alle specie *P. foliicola* e *P. nigrum*. In conclusione, la caratterizzazione molecolare dei 6 loci e le relative analisi filogenetiche hanno permesso l'assegnazione dei 34 isolati ottenuti da ortaggi a foglia alle specie *A. verrucaria*, *P. foliicola* e *P. nigrum*.

Saggi di patogenicità

Per verificare la patogenicità dei funghi identificati, sono stati scelti isolati rappresentativi appartenenti alle specie di *A. verrucaria*, *P. foliicola* e *P. nigrum* per l'esecuzione delle prove su lattuga, valerianella, rucola selvatica, rucola coltivata, spinacio e basilico. Le foglie

delle diverse specie orticole coltivate in vaso (14x14 cm) sono state inoculate artificialmente con la sospensione conidica (1×10^6 /ml) preparata a partire dalle colture fungine degli isolati 13-1, Bas4-1b, ITS6 e Bas5-18 precedentemente propagati in PDA per 10 giorni. Nel corso della prova effettuata in cella climatica (24 °C di giorno e 22°C di notte e 12 ore di fotoperiodo) sono stati impiegati 4 vasi per ciascun isolato e per ciascuna specie (Tabella 1). Per raggiungere il 100% di umidità relativa le piante sono state mantenute in camera umida racchiudendole nei sacchetti di plastica, e irrigate due volte al giorno. La camera umida è stata rimossa 5 giorni dopo l'inoculazione. Tutte le tre specie fungine hanno causato necrosi fogliari diffuse su tutti gli ospiti impiegati nel saggio. I primi sintomi apparivano come piccole macchie necrotiche sulla superficie fogliare di valerianella, rucola coltivata, spinacio e basilico, mentre la necrosi era più distribuita in ampie chiazze e lungo i margini fogliari su lattuga e rucola selvatica dopo sette giorni dalla rimozione della camera umida. Le lesioni necrotiche risultavano diffuse e interessavano l'intera lamina fogliare circa 15 giorni dopo l'inoculazione; in seguito le piante andavano incontro ad un rapido deperimento e morte.

Lo spinacio è risultato la specie più suscettibile, seguito da rucola coltivata, rucola selvatica e basilico. La valerianella e la lattuga inoculate con alcuni ceppi di tutte e tre le specie fungine hanno mostrato una resistenza intermedia (Tabella 1). La più elevata mortalità delle piante (circa l'80%) è stata osservata su valerianella inoculata con l'isolato ITS6 di *A. verrucaria* e su spinacio inoculato con l'isolato 13-1 di *P. nigrum*, seguiti dalla rucola coltivata, dalla rucola selvatica e dalla lattuga inoculati con l'isolato Bas4-1b di *P. foliicola*. Nessuna differenza importante nella gravità della malattia è stata osservata tra le tre specie fungine su rucola coltivata e selvatica. La gravità della malattia variava tra il 40 e il 60%, a seconda delle specie fungine e dell'isolato. D'altra parte, *P. foliicola* (Bas4-1b) su lattuga, *A. verrucaria* (ITS6) su valerianella e *P. nigrum* (13-1) su spinacio sono risultati più aggressivi rispetto agli altri ceppi saggiati (39%, 42% e 54% di gravità della malattia, rispettivamente). Questo studio ha evidenziato che lattuga, rucola (selvatica e coltivata), spinacio e basilico sono nuovi ospiti di *P. nigrum* e *P. foliicola* risultati responsabili di gravi necrosi fogliari in condizioni sperimentali.

Considerazioni finali

Attualmente più di 50 specie sono state assegnate ai generi *Albifimbria* e *Paramyrothecium* (Lombard *et al.*, 2016). All'interno di questi generi, *P. roridum* e *A. verrucaria* sono responsabili di necrosi fogliari e deperimento di diverse specie coltivate (*Helianthus annuus*, *Raphanus sativus*, *Pisum sativum*, mais, *Lotus corniculatus*, menta piperita, euforbia, *Beta vulgaris*, spinacio) e infestanti (*Amaranthus retroflexus*, *Sesbania exaltata*, *Anoda cristata*, *Chenopodium amaranticolor*, *Carduus acanthoides*, *Datura stramonium*) (Garibaldi *et al.*, 2016a,b,c; Farr e Rossmann, 2018).

Questo studio è stato finalizzato alla caratterizzazione molecolare e biologica di diversi isolati di *Albifimbria* e *Paramyrothecium* responsabili di necrosi fogliari su ortaggi a foglia coltivati in Italia. L'analisi filogenetica multi-locus ha permesso l'identificazione delle specie *A. verrucaria*, *P. foliicola* e *P. nigrum*. Nel corso di prove di patogenicità, tutte le tre specie fungine hanno causato necrosi fogliari sugli ospiti di origine. *P. foliicola* e *P. nigrum*, riportati in letteratura scientifica solo come saprofiti, sono risultati per la prima volta responsabili di necrosi fogliari su diverse specie orticole.

I risultati presentati evidenziano il rischio di introduzione di nuove specie in sistemi di coltivazione intensivi e della loro diffusione in campo essendo nota la possibilità per alcune specie di *Albifimbria* e *Paramyrothecium* di essere contaminanti dei semi ed essendo limitate le conoscenze inerenti le misure di lotta adottabili. Ulteriori studi molecolari ed epidemiologici saranno necessari per una approfondita conoscenza di questi agenti fitopatogeni emergenti sulle colture orticole.

Ringraziamenti

Lavoro svolto con il contributo 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

ALTSCHUL S. F., MADDEN T. L., SCHÄFFER A. A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D. J. (1997) - Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.

BHARATH B. G., LOKESH S., RAGHAVENDRU V. B., PRAKASH H. S., SHETTY B. G. (2006) - First report of the occurrence of *Myrothecium verrucaria* in watermelon seeds from India. *Australasian Plant Disease Notes*, 1, 3-4.

CASTLEBURY L. A., ROSSMAN A. Y., SUNG G. H., HYTEN A. S., SPATAFORA J. W. (2004) - Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycological Research*, 108, 864-872.

CHEN Y., RAN S. F., DAI D. Q., WANG Y., HYDE K. D., WU Y. M., JIANG Y. L. (2016) - *Myrothecium*. *Mycosphere*, 7, 64-80.

CHEN Z. D., LI P. L., CHAI A. L., GUO W. T., SHI Y. X., XIE X. W., LI B. J. (2018) - Crown canker caused by *Paramyrothecium roridum* on greenhouse muskmelon (*Cucumis melo*) in China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40, 115-120.

CROUS P. W., SHIVAS R. G., QUAEDVLIEG W., VAN DER BANK M., ZHANG Y., SUMMERELL B. A., ed altri. (2014) - Fungal Planet description sheets: 214-280. *Persoonia*, 32, 184-306.

DOMSCH K. H., GAMS W., ANDERSON T. (2007) - *Compendium of soil fungi*, 2nd Edition. IHW Verlag. Eching, Germany.

FARR D. F., ROSSMAN A. Y. (2018) - Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved November 15, 2018, from <https://nt.ars-grin.gov/fungal-databases/>

GILARDI G., GULLINO M. L., GARIBALDI A. (2018) - Emerging foliar and soil-borne pathogens of leafy vegetable crops: a possible threat to Europe. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 48, 116-127.

GARIBALDI A., GILARDI G., FRANCO-ORTEGA S., GULLINO M. L. (2016a) - First report of leaf spot of lamb's lettuce (*Valerianella olitoria*) caused by *Myrothecium roridum* in Italy. *Plant Disease*, 100, 1237.

GARIBALDI A., GILARDI G., FRANCO-ORTEGA S., GULLINO M. L. (2016b) - First report of leaf spot of spinach (*Spinacia oleracea*) caused by *Myrothecium verrucaria* in Italy. *Plant Disease*, 100, 1786.

GARIBALDI A., GILARDI G., FRANCO-ORTEGA S., GULLINO M. L. (2016c) - First report of leaf spot of wild rocket (*Diptotaxis tenuifolia*) caused by *Myrothecium verrucaria* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 98, 690.

LOMBARD L., HOUBRAKEN J., DECOCK C., SAMSON R. A., MEIJER M., REBLOVÁ M., GROENEWALD J. Z., CROUS P. W. (2016) - Generic hyper-diversity in *Stachybotriaceae*. *Persoonia*, 36, 156-246.

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.

TULLOCH M. (1972) - The genus *Myrothecium* Tode ex Fr. *Mycological Papers*, 130, 1-42.

TWOMEY U., WARRIOR P., KERRY B. R. (2000) - Effects of the biological nematicide, DiTera, on hatching of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematology*, 2, 355-362.

ZHAO L., LIU L., HU J. C., GAO J. M., WANG S. J. (2011) - Isolation and identification of a marine fungus *Myrothecium verrucaria* Hmp-F73 producing trichothecene with insecticidal and antimicrobial activities. *Chinese Journal of Biological Control*, 3, 331-337.