

# Nuovi parassiti fungini riscontrati in Piemonte e Liguria: *Diaporthe eres* su *Pyrus communis*, *Alternaria alternata* su *Salvia elegans* e *Sclerotinia sclerotiorum* su *Nasturtium officinale*

Domenico Bertetti\* - Vladimiro Guarnaccia\*\*\* - Slavica Matic\* - Pietro Pensa\* - Davide Spadaro\*,\*\* - 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)

\*\*\*Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Uppsalaalaan 8, 3584 CT, Utrecht, Paesi Bassi.

In questa nota sono riportati tre parassiti fungini riscontrati, per la prima volta in Italia, su *Pyrus communis*, *Salvia elegans* e *Nasturtium officinale*. L'identificazione dei microrganismi è avvenuta tramite l'osservazione delle caratteristiche morfologiche degli isolati e le successive analisi molecolari.

## *Diaporthe eres* su pero (*Pyrus communis*)

Nel corso dell'estate 2014 e in quelle successive, una vetusta pianta di una vecchia varietà di pero (*Pyrus communis*) coltivata in un giardino privato in Torre Canavese (TO), produceva frutti che recavano i sintomi di seguito descritti. All'approssimarsi della maturazione, gran parte dei frutti cadevano senza presentare evidenti alterazioni esterne, se non lievi imbrunimenti sull'epicarpo, di consistenza molliccia al tatto. I frutti, visti in sezione, presentavano un marciume molle e marrone, che, a partire dall'interno del frutto, coinvolgeva gran parte del mesocarpo. Gli isolamenti erano effettuati utilizzando terreno PDA (patata, destrosio, agar), dopo aver asportato una porzione dell'epicarpo, prelevando piccoli pezzi di mesocarpo lungo i confini dei tessuti marcescenti. Dagli isolamenti si sviluppavano colonie fungine con micelio sottile, prima biancastro, poi grigiastro che, allevate su PDA per 20 giorni, in alternanza luce/buio (14h; 10h), alla temperatura di 25°C ±1, generavano picnidi e numerosissimi conidi. Questi ultimi erano di due tipologie diverse: gli  $\alpha$  conidi erano ialini, unicellulari, ellissoidali, affusolati e misuravano 4,2 - 9,3 × 1,1 - 3,3 (media: 6,2 × 2,1)  $\mu$ m; i  $\beta$  conidi erano ialini, unicellulari, filiformi e ricurvi e misuravano 13,5 - 29,7 × 0,6 - 1,4 (media: 20,8 × 1,0)  $\mu$ m. L'accrescimento medio giornaliero rilevato per uno degli isolati coltivato per 7 giorni su PDA, a 25°C costanti, in assenza di luce, era di 7,4 mm. Queste caratteristiche coincidevano con quelle riportate per *Phomopsis*, genere anamorfo di *Diaporthe* (Gomes *et al.*, 2013). L'identificazione molecolare veniva effettuata tramite il



Figura 1 - Attacchi di *Sclerotinia sclerotiorum* su piante di *Nasturtium officinale* allevate in vaso.

Figure 1 - Symptoms and signs caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on potted plants of *Nasturtium officinale*.

sequenziamento e la filogenesi di cinque *loci* genici (ITS, *tefl*, *cal*, *his3* e *tub2*) solitamente utilizzati per condurre le analisi molecolari all'interno del genere *Diaporthe* (Guarnaccia e Crous, 2017). Il DNA di uno degli isolati era estratto ed i 5 *loci* amplificati mediante PCR. I prodotti delle amplificazioni erano sequenziati. Le sequenze ITS, *tefl*, *cal* e *his3* (GenBank numeri di deposito: MH063907, MH063913, MH063895, MH063901) mostravano il 99% di similitudine con *Diaporthe eres*; la sequenza *tub2* (GenBank numero di deposito: MH063919) mostrava il 100% di similitudine con *D. eres*. Nell'analisi filogenetica condotta, le sequenze dei cinque *loci* scelti venivano combinate, ottenendo un albero filogenetico in cui l'isolato da *P. communis* si inseriva nel gruppo di *D. eres*, permettendo di attribuire a questa specie il microrganismo.

La patogenicità di un isolato di *D. eres* veniva dimostrata inoculando sia 4 pere della cv Abate Fétel, sia 9 pere della cv Williams. I frutti erano prima immersi in una soluzione di ipoclorito di sodio (1%) per 20 minuti. Successivamente, una sospensione di  $\alpha$  e  $\beta$  conidi ottenuta da una coltura su PDA era inoculata per ferita, alla concentrazione di  $5 \times 10^5$  CFU/ml. La sospensione conidica era inoculata nei tre fori praticati su ciascun frutto, in posizione equatoriale (30  $\mu$ l/foro). Tutti i frutti erano conservati ad una temperatura variabile da 23 a 27°C. In entrambi i casi, i primi sintomi di marciume iniziavano a comparire solamente sui frutti inoculati, circa 3 giorni dopo l'inoculazione e da essi veniva reisolata *D. eres*.

## *Alternaria alternata* su *Salvia elegans*

Nel giugno 2017 e nel corso della successiva estate, circa 50 piante di *S. elegans* di 6-8 mesi di età, coltivate in un giardino privato in una località biellese (BI), presentavano foglie con clorosi e necrosi marroni lungo i margini e sul lembo. Le foglie colpite cadevano precocemente. Dagli isolamenti fatti su PDA, si sviluppavano colonie fungine che formavano anelli concentrici alternati, di colore verde olivaceo pallido e più scuro. Gli isolati, allevati in alternanza di luce/buio (14h/10h) su PCA (patata, carota, agar) (Simmons, 2007), producevano conidi olivacei, da

ellittici a ovoidali o irregolari, di  $9-31 \times 6-13$  (media:  $17 \times 8$ )  $\mu\text{m}$ . I conidi avevano 1-5 setti trasversali, fino a 2 setti longitudinali e apice lungo da 2 a 5 (media: 3)  $\mu\text{m}$  o assente. Queste caratteristiche riconducevano il fungo isolato da *S. elegans* al genere *Alternaria*, sezione II di Simmons (Simmons, 2007).

Per confermare l'identificazione del genere e definire la specie, uno degli isolati era coltivato in purezza ed il suo DNA veniva estratto utilizzando l'E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek, Darmstadt, Germany). Con il DNA estratto veniva condotta una reazione di PCR, utilizzando i primers ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) e il prodotto ottenuto veniva sequenziato, ottenendo una sequenza che, analizzata con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997), non consentiva di differenziare *Alternaria alternata* da altre specie. Quindi venivano impiegati i primers specifici H31a (5'-ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG-3') e H31b (5'-GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT-3') (Glass e Donaldson, 1995), applicando la stessa metodologia prima descritta. La nuova sequenza ottenuta (GenBank numero di deposito MG213850) mostrava il 100% di similitudine con *A. alternata*.

Nel test di patogenicità, tre piante apparentemente sane di *S. elegans* erano inoculate applicando sulle foglie il micelio del fungo ottenuto da una coltura allevata su PDA. Le piante venivano chiuse per 7 giorni in una camera umida e le prime necrosi fogliari comparivano dopo 10 giorni. Da esse veniva reisolato lo stesso parassita artificialmente inoculato.

#### *Sclerotinia sclerotiorum* su *Nasturtium officinale*

Nel corso della primavera 2018, alcune piante di crescita delle fontane (*Nasturtium officinale*) di circa 60 giorni di età, coltivate in un'azienda agricola situata in Albenga (SV), mostravano clorosi e ingiallimenti fogliari. In seguito, le foglie imbrunivano, avvizzivano, disseccavano e si adagiavano sulla superficie del vasetto. I fusti delle piante colpite marcivano e avvizzivano a partire dalla base. Un rado micelio biancastro si diffondeva sulla superficie del terriccio e, chiudendo la pianta in camera umida per alcuni giorni, avvolgeva fusti e foglie (Fig.1). Nel terriccio e sui tessuti dell'ospite, il micelio produceva sclerozi grigio scuri, sferoidali, a volte allungati e irregolari, da 2 a 5 mm di dimensione. Le alterazioni descritte si estendevano a macchia d'olio, passando da una pianta a quella attigua. Era colpito circa il 2% delle 480 piante coltivate. Dagli isolamenti effettuati su PDA si ottenevano colonie fungine con micelio bianco, compatto che generava sclerozi scuri, sferoidali, allungati o irregolari, di 2-8 mm. In base ai sintomi e ai segni descritti *in vivo* e alle caratteristiche degli isolati, l'agente della malattia osservata su *N. officinale* era identificato come *Sclerotinia sclerotiorum* (Mordue e Holliday, 1976).

Il DNA di uno degli isolati era estratto con l'E.Z.N.A.

Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek, Darmstadt, Germany). Una reazione di PCR veniva condotta sul DNA estratto, utilizzando i primers ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) e la sequenza (Gene Bank numero di deposito MH327997) ottenuta dal sequenziamento, era analizzata con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) ( $E = 0$ ) che confermava che il fungo apparteneva a *S. sclerotiorum*.

La patogenicità di uno degli isolati era dimostrata inoculando 15 piantine apparentemente sane di *N. officinale* di 20 giorni di età. Le piante erano inoculate miscelando al terriccio (3g/litro) cariossidi di grano sterilizzate e colonizzate dal fungo. Le piante erano mantenute chiuse in una camera umida, all'interno di una cella climatica, alla temperatura di  $23^\circ\text{C} \pm 1$ . I primi sintomi di marciume basale comparivano dopo circa 5 giorni. Successivamente, il micelio biancastro del parassita si diffondeva sul terriccio, le piante apparivano stroncate e morivano. Dai tessuti sintomatici era possibile reisolare *S. sclerotiorum*.

#### 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

- ALTSCHUL S. F., MADDEN T. L., SCHAEFFER 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.
- GLASS N. L., DONALDSON G. C. (1995) - Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1323 - 1330.
- GOMES R. R., GLIENKE C., VIDEIRA S. I. R., LOMBARD L., GROENEWALD J. Z., CROUS P. W. (2013) - *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 31, 1-41.
- GUARNACCIA V., CROUS P. W. (2017) - Emerging citrus diseases in Europe caused by species of *Diaporthe*. *IMA Fungus*, 8 (2), 317-334.
- MORDUE J. E. M., HOLLIDAY P. (1976) - CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, Sheet 513.
- SIMMONS E. G. (2007) - *Alternaria*. An identification manual. Utrecht, The Netherlands, CBS Biodiversity Series, 775 pp.
- 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.