

Attacchi di *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* su *Sulcorebutia heliosa* e *Sulcorebutia rauschii* in Italia

Domenico Bertetti*, Slavica Matic*, Pietro Pensa*, 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

Nel mese di giugno 2018, su numerose piante di *Sulcorebutia heliosa* e di *S. rauschii* allevate in un'azienda floricola nei pressi di Ventimiglia (IM), venivano osservati i sintomi descritti in questa nota. L'osservazione di microconidi, macroconidi e clamidospore prodotti dagli isolati fungini ottenuti da piante infette consentivano di identificare come *Fusarium oxysporum* gli agenti causali di entrambi le malattie. L'analisi del gene TEF (Translation Elongation Factor 1 α) confermava le identificazioni e la successiva analisi IGS (Intergenic Spacer Region) attribuiva gli isolati ottenuti da entrambi gli ospiti alla forma *specialis opuntiarum*. Vengono riassunti i sintomi osservati, le osservazioni condotte al microscopio ottico sulle colture degli isolati e le analisi molecolari effettuate sui medesimi. Infine, vengono fornite alcune indicazioni per prevenire e per contenere la diffusione di *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* su *S. heliosa* e su *S. rauschii*, su cui il parassita viene riportato per la prima volta in Italia, così come nel resto del mondo.

Parole chiave: piante ornamentali; succulente; tracheofusariosi.

Summary

First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* on *Sulcorebutia heliosa* and *S. rauschii* grown in Italy

During June 2018, several plants of Sulcorebutia heliosa and S. rauschii, Cactaceae family, growing in a nursery located in Ventimiglia (Imperia province, Northern Italy) showed the symptoms described in this note. The fungal causal agents of both the diseases were isolated from affected plants and identified as Fusarium oxysporum by the observation of microconidia, macroconidia and chlamidospores produced in vitro. The morphological identification of genus and species was confirmed by the Translation Elongation Factor 1 α (TEF) analysis. The Intergenic Spacer Region (IGS) was used for the further molecular analyses and led both the parasites to the forma specialis opuntiarum of F. oxysporum. Finally, some strategies to prevent and to control F. oxysporum f. sp. opuntiarum are discussed. This pathogen is reported on S. heliosa and S. rauschii for the first time in Italy, as well as in the world.

Key words: ornamental plants, cacti, *Fusarium* wilt.

Introduzione

In questa nota sono riportati i sintomi delle malattie comparse, per la prima volta in Italia, così come nel resto del mondo, su piante di *Sulcorebutia heliosa* e di *S. rauschii*,

famiglia Cactaceae, coltivate in un'azienda ligure.

Sintomi osservati ed identificazione del parassita

Sulcorebutia heliosa

Nel mese di giugno 2018, 1000 piante di *S. heliosa*, riprodotte per seme, erano coltivate presso un'azienda agricola localizzata in Ventimiglia (IM). Alla comparsa della malattia, le piante avevano 2 anni di età ed erano allevate in vasi di plastica color coccio (diam. 10 cm), contenenti terriccio di coltivazione a base di torba, con scheletro (pH ~ 6,5; E.C. ~ 500 μ S). Le piante erano sistemate su bancale rialzato, all'interno di una serra di ferro/vetro, dotata di struttura in policarbonato a formare un'intercapedine d'aria con il vetro. La densità colturale era di 80 piante/m². L'irrigazione era effettuata all'occorrenza, tramite aspersione manuale. Le alterazioni osservate consistevano nell'avvizzimento dei fusti che, in seguito, collassavano, disseccavano e morivano (Figura 1). Visti in sezione, i tessuti interni apparivano marcescenti. Anche le radici erano fortemente compromesse. Era colpito il 10% circa delle piante in coltivazione. Gli isolamenti venivano effettuati prelevando del colletto e dalla base del fusto numerosi frammenti di tessuti interni, al margine delle alterazioni, poi distribuiti su terreno PDA (Potato, Dextrose, Agar). Dagli isolamenti si ottenevano numerose colonie fungine che, allevate in purezza sullo stesso substrato colturale, apparivano costituite da micelio di colore variabile da biancastro a viola pallido, che generava pigmenti viola pallido nel substrato agarizzato. Il fungo, coltivato su CLA (Carnation Leaf-Piece Agar) (Fisher *et al.*, 1982), produceva corte monofialidi a supporto di microconidi unicellulari, ovato-ellittici, di 4,3-8,2 \times 1,7-3,4 (media: 5,9 \times 2,6) (n = 50) μ m. Sullo stesso terreno erano osservati i macroconidi, non addensati in sporodochi. Essi avevano forma lievemente falcata, presentavano cellula apicale ottusa, cellula basale a forma di piede e 3 (talvolta 4) setti trasversali. Le dimensioni dei macroconidi erano di 22,6-41,6 \times 3,4-4,5 (media: 31,0 \times 3,8) (n = 50) μ m. Sempre su CLA erano osservate le clamidospore del fungo che erano a parete liscia, terminali o intercalari, singole o disposte in coppie. Il loro diametro variava da 4,8 a 8,6 (media: 6,9) (n = 50) μ m. Queste caratteristiche morfologiche coincidono con quelle riportate per *Fusarium oxysporum* (Leslie e Summerell, 2006).

L'identificazione morfologica del parassita isolato da *S. heliosa* veniva confermata dalle analisi molecolari. Queste erano condotte estraendo il DNA di uno degli isolati



Figura 1 - Sintomi di marciume ed avvizzimento del fusto causati da *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* su *Sulcorebutia heliosa* allevata in vaso.

Figure 1 - Symptoms of stem rot and wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* on potted plant of *Sulcorebutia heliosa*.

(DB18GIU36) coltivato in substrato liquido PDB (Potato, Dextrose, Broth). Successivamente, era condotta una prima reazione di PCR, utilizzando i primers EF1/EF2 (O'Donnell *et al.*, 1998) che amplificano il gene che codifica il fattore di elongazione 1 α (TEF). Dal successivo sequenziamento si otteneva una sequenza di 677 paia di basi (GenBank accession number MK050503) che, analizzata con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997), identificava come *F. oxysporum* l'isolato da *S. heliosa*. Una successiva reazione di PCR utilizzava i primers CNS1/CNL12 (Appel e Gordon, 1995) che amplificano l'Intergenic Spacer Region (IGS). La sequenza ottenuta aveva 1202 paia di basi (GenBank accession number MK050504) e la sua analisi confermava l'identificazione di *F. oxysporum*, attribuendo l'isolato DB18GIU36 alla forma *specialis opuntiarum*.

Sulcorebutia rauschii

Sempre nel mese di giugno 2018, presso la stessa azienda agricola di Ventimiglia (IM), erano coltivate 1000 piante di *S. rauschii* di 2 anni. Le piante erano state riprodotte per seme e le condizioni di coltivazione erano le stesse precedentemente descritte per *S. heliosa*. In seguito alla comparsa della malattia, i fusti colpiti avvizzivano, collassavano e morivano (Figura 2). Sintomi di marciume erano presenti in alcuni tratti di radice e alla base del colletto. Era colpito circa il 5% delle piante in coltivazione. Numerosi frammenti di tessuto erano prelevati da colletto e base fusto e distribuiti su PDA per effettuare gli isolamenti. Da questi si ottenevano colonie fungine di aspetto molto simile a quelle ottenute da *S. heliosa* prima descritte. Allevato in purezza su CLA, il fungo produceva microconidi unicellulari, ovato-ellittici, di 4,5-8,9 \times 1,7-4,2 (media: 6,5 \times 2,8) (n = 50) μ m supportati da corte monofialidi. Sul medesimo terreno, dopo 27 giorni, il fungo produceva sporodochi di colore arancio chiaro, con numerosissimi macroconidi lievemente falcati, dotati di 3 (raramente 4) setti, cellula apicale ottusa e cellula basale a forma di piede. Le dimensioni dei macroconidi erano di 28,4-38,3 \times 3,4-4,3 (media: 34,1 \times 3,8) (n = 50) μ m. Su CLA il fungo produceva anche numerose clamidospore a parete liscia, terminali o intercalari, singole o in coppia (raramente a gruppi). Il loro diametro variava da 4,3 a 11,9 (media:



Figura 2 - Sintomi di avvizzimento causati da *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* su fusti di *Sulcorebutia rauschii* allevati in vaso.

Figure 2 - Symptoms of stem wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* on potted plants of *Sulcorebutia rauschii*.

7,2) (n = 50) μ m. Anche in questo caso le caratteristiche morfologiche osservate coincidono con quelle di *Fusarium oxysporum* (Leslie e Summerell, 2006).

Anche per il parassita isolato da *S. rauschii* l'identificazione morfologica era confermata dalle identificazioni molecolari che venivano condotte sull'isolato DB18GIU24, seguendo gli stessi protocolli descritti per *S. heliosa*. La sequenza ottenuta dall'analisi del gene TEF era di 682 paia di basi (GenBank accession number MK482732), mentre la sequenza ricavata dall'analisi IGS era di 936 paia di basi (GenBank accession number MK482733) ed entrambi confermavano l'identificazione degli isolati come *F. oxysporum* e li attribuivano alla forma *specialis opuntiarum*.

Test di patogenicità

Sulcorebutia heliosa

Per dimostrare la patogenicità di *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* proveniente da *S. heliosa* erano inoculate tre piante apparentemente sane di questa specie. Le piante avevano 12 mesi ed erano state ottenute per talea. L'inoculo consisteva in una sospensione conidica dell'isolato DB18GIU36, coltivato in beute contenenti PDB, poste in agitazione (90 r.p.m.), per 10 giorni, ad una temperatura variabile da 20 a 30°C, in alternanza di luce e buio (16/8h). Le radici delle piante da inoculare erano immerse nella sospensione conidica, utilizzata alla concentrazione di 4,3 \times 10⁷ CFU/ml, quindi subito trapiantate in vasetti contenenti un litro di terriccio disinfestato a vapore e, infine, sistemate in una serra, ad una temperatura variabile da 25 a 35°C. I testimoni consistevano in tre piante della stessa specie ed età, trattate in acqua sterile, che venivano mantenute nelle stesse condizioni ambientali. I primi sintomi di avvizzimento comparivano circa 30 giorni dopo l'inoculazione artificiale, solo sulle piante inoculate e da queste veniva reisolato lo stesso parassita inoculato. Seguiva la morte di tutte le piante inoculate.

Sulcorebutia rauschii

Nel caso di *S. rauschii*, l'inoculazione artificiale avveniva utilizzando l'isolato DB18GIU24. Questo era inoculato praticando ferite con spilli sterili (3 ferite per pianta), sui

fusti di tre piante apparentemente sane di *S. rauschii* di 14 mesi. Gli stessi spilli erano estratti, utilizzati per raccogliere alle loro estremità un po' di micelio e di conidi prelevati da colture del fungo, e subito reintrodotti nelle ferite (Talge & Stensvand, 2013). Tre piante testimone erano ferite con spilli privi di inoculo. Quindi, tutte le piante erano mantenute in serra, ad una temperatura oscillante da 20 a 26°C. Trascorsi 10 giorni, era possibile osservare lievi depressioni dei tessuti attorno alle ferite praticate sui fusti che, nei giorni successivi, divenivano più evidenti. Una sezione trasversale fatta in corrispondenza delle ferite metteva in evidenza i marciumi interni causati dall'introduzione degli aghi infetti e dai tessuti alterati veniva reisolato lo stesso parassita inoculato, soddisfacendo i postulati di Koch. Le piante testimone non presentavano alcun sintomo.

Conclusioni

La presenza di *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* su Cactaceae è nota da tempo, su ospiti diversi, come *Zygocactus* e *Rhipsalidopsis* in Germania (Gerlach, 1972) e *Opuntia ficus-indica* in Brasile (Souza de *et al.*, 2010). Nel nostro Paese questo parassita è stato segnalato su *Echinocactus grusonii* (Polizzi e Vitale, 2004) e *Schlumbergera truncata* (Lops *et al.*, 2013). Inoltre, sono piuttosto recenti le segnalazioni, avvenute in Liguria, di *F. oxysporum* su piante succulenti appartenenti alle Cactaceae, quali *Cereus peruvianus monstrosus* (Garibaldi *et al.*, 2011), *Cereus marginatus* var. *crystata* (Garibaldi *et al.*, 2014), *C. peruvianus florida* (Garibaldi *et al.*, 2015b), *Mammillaria zeilmanniana* (Garibaldi *et al.*, 2016a) e *Astrophytum myriostigma* (Garibaldi *et al.*, 2016b). Questi parassiti, così come *F. oxysporum* isolato da *Euphorbia mammillaris* var. *variegata* (Euphorbiaceae) (Garibaldi *et al.*, 2015a) sono stati tutti attribuiti alla forma *specialis opuntiarum* (Bertetti *et al.*, 2017). Poiché in bibliografia scientifica non risulta nessuna segnalazione di *F. oxysporum* né su *S. heliosa* né su *S. rauschii*, queste risultano essere prime segnalazioni, sia in Italia, sia nel resto del mondo.

La prevenzione di *F. oxysporum* gioca un ruolo fondamentale nella difesa da questo parassita e deve essere attuata a partire dall'utilizzo di materiale propagativo sano. Altri suggerimenti riguardano la gestione oculata delle irrigazioni e delle concimazioni (in particolare quelle azotate). La creazione di ferite deve essere impedita o, almeno ridotta al minimo, ponendo particolare attenzione alle fasi di taleggio. Lo stoccaggio a debita distanza dal luogo di coltivazione del substrato culturale impiegato per semina, taleggio e trapianto, rende più difficile la diffusione del microrganismo nel caso esso venga introdotto in azienda. Qualora ciò accada, è necessario eliminare le piante colpite alla comparsa dei primi sintomi, per impedire il trasferimento di microconidi, macroconidi, frammenti di micelio o clamidospore ai vasi attigui, attraverso schizzi d'acqua infetta. Il pericolo è piuttosto alto nel caso di elevata densità culturale e se numerose specie potenzialmente suscettibili al parassita sono coltivate nella medesima azienda. Nel caso di attacchi di *F. oxysporum*, occorre anche rimuovere e tenere in osservazione i vasi attorno alle piante colpite, così come eliminare il substrato di coltivazione contaminato, oppure, disinfestarlo (mediante l'impiego del vapore, della solarizzazione o del Dazomet) prima del suo riutilizzo. Anche i contenitori (vasi, alveoli, ecc.), i teli pacciamanti, le stuoie ed i bancali utilizzati per la coltivazione di piante

che sono risultate infette debbono essere opportunamente disinfestati. Sarà opportuno coltivare su bancali o parcelle diverse (possibilmente in un altro ambiente di coltivazione) i nuovi semenzali e le piante ottenute dai nuovi taleggi. In lotta preventiva, andrebbero saggiati alcuni prodotti commerciali a base di *Trichoderma* spp., così come alcuni substrati culturali contenenti compost e/o corteccia di conifera non compostata. Questi ultimi potrebbero fornire al substrato caratteristiche di repressività nei confronti di *F. oxysporum*. Sempre in fase di lotta preventiva, l'efficacia del tiofanate metile andrebbe saggiata con trattamenti alla pianta e al substrato di coltivazione, soprattutto subito dopo le operazioni di taleggio.

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.
- Appel D. J., Gordon T. R. (1995) - Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Experimental Mycology* 19, 120-128.
- Bertetti D., Ortu G., Gullino M. L., Garibaldi A. (2017) - Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* on new hosts of the Cactaceae and Euphorbiaceae families. *Journal of Plant Pathology*, 99 (2), 347-354.
- Fisher N. L., Burgess L. W., Toussoun T. A., Nelson P. E. (1982) - Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, 72, 151-153.
- Garibaldi A., Pensa P., Bertetti D., Poli A., Gullino M. L. (2011) - First report of basal stem rot of Apple Cactus (*Cereus peruvianus monstrosus*) caused by *Fusarium oxysporum* in Italy. *Plant Disease*, 95, 877.
- Garibaldi A., Pensa P., Bertetti D., Ortu G., Gullino M. L. (2014) - First report of dry and soft rot of *Cereus marginatus* var. *crystata* caused by *Fusarium oxysporum* in Italy. *Plant Disease*, 98, 1441.
- Garibaldi A., Bertetti D., Pensa P., Ortu G., Gullino M. L. (2015a) - First Report of *Fusarium oxysporum* Causing Wilt on *Euphorbia mammillaris* var. *variegata* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 97 (4 Supplement), S68.
- Garibaldi A., Bertetti D., Pensa P., Ortu G., Gullino M. L. (2015b) - First Report of *Fusarium oxysporum* on *Cereus peruvianus florida* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 97 (Supplement), S70.
- Garibaldi A., Bertetti D., Pensa P., Ortu G., Gullino M. L. (2016a) - First Report of stem rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* on *Mammillaria zeilmanniana* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 98 (1), 172.
- Garibaldi A., Bertetti D., Pensa P., Ortu G., Gullino M. L. (2016b) - First Report of *Fusarium oxysporum* Causing Wilt on *Astrophytum myriostigma* in Italy. *Plant Disease*, 100, 215.
- Gerlach W. (1972) - *Fusarium* rot and other fungal diseases of horticulturally important cacti in Germany. *Phytopathologische Zeitschrift*, 74, 197-217.
- Leslie J. F., Summerell B. A. (2006) – The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa, USA, 388 pp.
- Lops F., Cibelli F., Raimondo M. L., Carlucci A. (2013) – First report of stem wilt and root rot of *Schlumbergera*

- truncata* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* in southern Italy. Plant Disease, 97, 846.
- O'Donnell K., Kistler H. C., Cigelnik E., Ploetz R. C. (1998) - Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Science USA, 95, 2044-2049.
- Polizzi G., Vitale A. (2004) – First report of basal stem rot of golden barrel cactus caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* in Italy. Plant Disease, 88, 85.
- Souza de A. E. F., Nascimento L. C., Araújo E., Lopes E. B., Souto F. M. (2010) - Occurrence and identification of the etiologic agents of plant diseases in cactus (*Opuntia ficus-indica* Mill.) in the semi-arid region of Paraíba. Biomas, 23, 3, 11-20.
- Talgø V., Stensvand A. (2013) - A simple and effective inoculation method for *Phytophthora* and fungal species on woody plants. OEPP/EPPO Bulletin 43 (2), 276-279.