

Prima segnalazione in Italia di *Plectosphaerella cucumerina* su *Aquilegia flabellata*

Domenico Bertetti* - Giulia Tabone* - Incoronata Luongo** - Maria Lodovica Gullino* - Angelo Garibaldi*

*Centro di Competenza per l'Innovazione in campo agroambientale (AGROINNOVA) - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO).

Riassunto

Nel corso del mese di giugno 2020, numerose piante di *Aquilegia flabellata* allevate in un giardino privato in provincia di Biella (BI), recavano le alterazioni fogliari descritte in questa nota. Le caratteristiche morfologiche degli isolati fungini consentivano la loro attribuzione al genere *Plectosphaerella* e la successiva analisi della sequenza ITS (Internal Transcribed Spacer), li assegnava alla specie *P. cucumerina*. Vengono riportati i sintomi osservati, le analisi di laboratorio condotte per giungere all'identificazione del parassita e, infine, sono discussi alcuni criteri per prevenire e contrastare la diffusione di *P. cucumerina* su *A. flabellata*, specie su cui la presenza di questo microrganismo viene qui riscontrata per la prima volta in Italia, così come nel resto del mondo.

Parole chiave: piante ornamentali; colombina; *Fusarium tabacinum*.

Summary

Presence of *Plectosphaerella cucumerina* on *Aquilegia flabellata* grown in Piedmont (Northern Italy)

During the month of June 2020, brown spots and necrosis appeared on leaves of several plants of *Aquilegia flabellata* growing in a private garden in the Biella province (northern Italy). The morphological characteristics of the colonies isolated from affected leaves permitted to identify the fungal causal agent of the disease as belonging to the genus *Plectosphaerella*. The ITS (Internal Transcribed Spacer) analysis identified the pathogen as *P. cucumerina*. Symptoms observed on the affected plants are described and the analyses carried out to identify the pathogen are reported. Finally, some strategies to prevent and to control *P. cucumerina* on *A. flabellata* are discussed. This is the first report of *P. cucumerina* on *A. flabellata* in Italy, as well as worldwide.

Key words: ornamentals; fan columbine; *Fusarium tabacinum*.

Introduzione

Aquilegia flabellata è una specie erbacea, perennante, rustica, appartenente alla famiglia delle Ranunculaceae, adatta per bordure miste ed aiuole che, nel corso della primavera, produce fiori azzurri, caratterizzati da un vistoso sperone da cui l'epiteto specifico *flabellata*. In questa nota vengono descritti i sintomi causati da un parassita fungino su alcuni esemplari di *A. flabellata* coltivati in Piemonte.

Sintomi riscontrati ed identificazione del parassita

Durante il mese di giugno 2020, in un giardino privato



Figura 1 - Sintomi causati da *Plectosphaerella cucumerina* su foglia di *Aquilegia flabellata*.

Figure 1 - Symptoms caused by *Plectosphaerella cucumerina* on a leaf of *Aquilegia flabellata*.

situato in valle Cervo, circa 25 piante di *A. flabellata*, pari al 20% circa del numero complessivo coltivato, presentava i sintomi qui descritti. Le foglie recavano macchie puntiformi che, successivamente, si estendevano fino a circa 5-6 mm e formavano necrosi, a volte coalescenti, di colore marrone e di forma irregolare (Figura 1). Numerose foglie infette di *A. flabellata* erano trasferite in laboratorio per gli isolamenti. Le foglie erano sottoposte ad un accurato lavaggio in acqua sterile e poi immerse, per 30 secondi, in una soluzione contenente ipoclorito di sodio (1%) e nuovamente risciacquate. Quindi, molti frammenti di tessuto venivano prelevati dai margini delle necrosi e distribuiti in piastre Petri contenenti PDA (Potato, Dextrose, Agar), poi conservate alla temperatura di $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Trascorsi 9 giorni, sul terreno di coltura si sviluppavano numerose colonie fungine con crescita regolare, di colore arancio chiaro, costituito da un micelio che, osservato al microscopio ottico, appariva costituito da ife ialine che potevano assumere andamento circolare, dando origine a numerosi manicotti (Figura 2a). I conidi prodotti da queste colonie erano ellissoidali, non settati, guttulati, con estremità arrotondate (Figura 2b) e avevano dimensioni di $4,2-8,8 \times 1,8-3,2$ (media: $6,5 \times 2,4$) μm (L/W ratio 2,7; $n = 50$). I conidi erano supportati da fialidi rastremate, diritte, a volte sinuose, talvolta provviste di un setto alla base (Figura 2c), lunghe $5,1-22,6$ (media: $11,2$) μm ($n = 30$). Le caratteristiche morfologiche osservate consentivano di attribuire il fungo isolato da *A. flabellata* al genere *Plectosphaerella* (Carlucci *et al.*, 2012).

Per eseguire le analisi molecolari e confermare

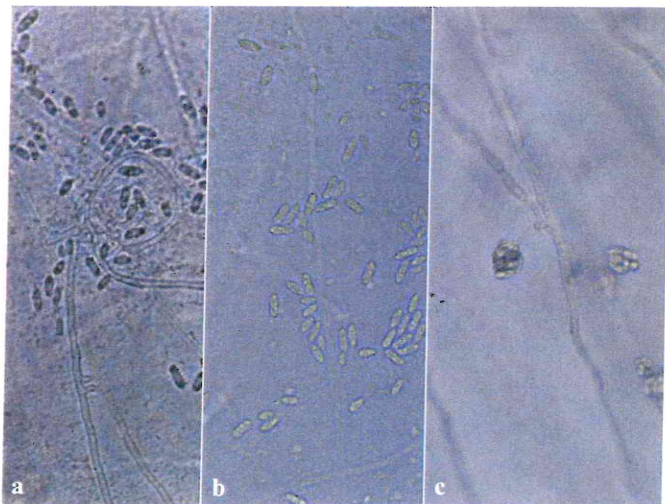


Figura 2 - Aspetti morfologici di *Plectosphaerella cucumerina* isolata da foglie di *Aquilegia flabellata* e coltivata su PDA. 2a. Ife con andamento circolare, formanti un manicotto. 2b. Conidi ellissoidali, non settati, guttulati, con estremità arrotondate. 2c. Fialidi rastremate.
 Figure 2 - Morphological aspects of *Plectosphaerella cucumerina* isolated from leaves of *Aquilegia flabellata* grown on PDA. 2a. Mycelium forming hyphal coils. 2b. Aseptate, guttulate, ellipsoidal with rounded apex conidia. 2c. Tapered phialides.

l'identificazione morfologica, venivano preparate le colture di tre isolati (siglati 20/14-1, 20/14-2, 20/14-3), utilizzando il terreno PDA. Il micelio di queste colture veniva raccolto per estrarre il DNA del fungo, tramite l'E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek, Darmstadt, Germany). Sul DNA estratto da ciascun isolato era effettuata una reazione di PCR impiegando i primers ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990). Il prodotto delle amplificazioni era sequenziato e si ottenevano tre sequenze, rispettivamente di 535, 543 e 556 paia di basi (Gene Bank accession numbers: MW205832; MW205833; MW205834). Le analisi di queste erano compiute con l'algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997) e mostravano tutte il 99,81% di similarità con *Plectosphaerella cucumerina* (Sin.: *Fusarium tabacinum*), in accordo con le caratteristiche morfologiche del fungo descritte prima.

Inoculazione artificiale e riproduzione dei sintomi

Per riprodurre gli stessi sintomi osservati, numerose piante apparentemente sane di *A. flabellata* di 5 mesi di età, nate da seme ed allevate in vasi di plastica contenenti una miscela di torba di sfagno, pomice, corteccia di pino e argilla (50:20:20:10), erano artificialmente inoculate con gli stessi isolati di *P. cucumerina* (20/14-1, 20/14-2, 20/14-3) utilizzati per l'identificazione molecolare prima descritta. Erano utilizzate 9 piante per ciascun isolato, distribuite in 3 vasi, ciascuno contenente 3 litri di terriccio. Gli inoculi erano ottenuti coltivando i funghi *in vitro*, in piastre Petri (Diam. 90 mm), contenenti terreno PDA. Dalle colonie si ottenevano le sospensioni conidiche che venivano diluite fino alla concentrazione finale di 5×10^5 CFU/ml. Quindi, le sospensioni conidiche ottenute erano irrorate sulle chiome delle piante sane (5 ml per pianta) che erano subito chiuse in camere umide e sistemate in ambiente esterno, alla temperatura variabile da 15 a 25°C. Nove piante della stessa specie ed età erano trattate con acqua sterile e mantenute nelle stesse condizioni come testimoni. Le camere umide

venivano mantenute per 7 giorni. Trascorsi 15 giorni dall'inoculazione, le prime necrosi puntiformi comparivano soltanto sulle piante inoculate con i tre ceppi utilizzati, mentre le piante testimone restavano asintomatiche. Successivamente, le necrosi si espandevano, riproducendo i sintomi osservati in campo e dalle foglie sintomatiche, inoculate con i tre isolati era possibile reisolare lo stesso fungo inoculato.

Conclusioni

In bibliografia scientifica, non sono riportate segnalazioni di *P. cucumerina* su *A. flabellata* né in Italia, né nel mondo, mentre invece sono numerose le segnalazioni, anche nel nostro Paese, di questo parassita su altre specie, soprattutto orticole, quali *Helianthus annuus* (Zazzerini e Tosi, 1987), *Diplotaxis tenuifolia* (Garibaldi *et al.*, 2012), *Cichorium endivia* (Garibaldi *et al.*, 2013), *Capsicum annuum* e *Cucumis melo* (Raimondo e Carlucci, 2018).

Plectosphaerella cucumerina è un parassita terricolo piuttosto polifago, in grado di causare marciumi a colletto, radici, frutti, alterazioni dell'apparato fogliare e di sopravvivere nel terreno per diversi anni, resistendo a condizioni di elevata umidità e saturazione idrica. La scelta di un luogo di coltivazione adatto alle esigenze ecologiche della specie e caratterizzato da terreno ben drenato e in grado di impedire ristagni idrici, l'adeguato distanziamento delle piante di *A. flabellata* al momento del trapianto e la conseguente buona aerazione delle chiome, l'impiego di sistemi di irrigazione ad ala gocciolante sono i criteri di base utili per prevenire e/o contenere *P. cucumerina* su aquilegia. Per quanto concerne la lotta chimica, occorrerebbe saggiare l'efficacia dei prodotti rameici che potrebbero essere impiegati in prevenzione, quando sussistono le condizioni ambientali (pioggia ed elevata umidità relativa) che favoriscono gli attacchi del parassita.

Ringraziamenti

Lavoro finanziato con fondi dell'Università di Torino (progetto ex 60% "Sviluppo e applicazione di tecniche di diagnostica fitopatologica applicate alla filiera agroalimentare").

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 programs. *Nucleic Acid Research*, 25, 3389-3402.
- Carlucci A., Raimondo M. L., Santos J., Phillips A. J. L. (2012) - *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia*, 28, 34-48.
- Garibaldi, A., Gilardi, G., Ortu, G., Gullino, M. L. (2012) - First Report of *Plectosphaerella cucumerina* on Greenhouse Cultured Wild Rocket (*Diplotaxis tenuifolia*) in Italy. *Plant Disease*, 96, 1825.
- Garibaldi, A., Gilardi, G., Ortu, G., Gullino, M. L. (2013) - First Report of a New Leaf Spot Caused by *Plectosphaerella cucumerina* on Field Grown Endive (*Cichorium endivia*) in Italy. *Plant Disease*, 97, 848.
- Raimondo M. L., Carlucci A. (2018) - Characterization and pathogenicity assessment of *Plectosphaerella* species

associated with stunting disease on tomato and pepper crops in Italy. *Plant Pathology*, 67 (3), 626-641.

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.

Zizzerini A., Tosi L. (1987) - New sunflower disease caused by *Fusarium tabacinum*. *Plant Disease*, 71, 1043-1044.