

Attacchi di *Botrytis cinerea* su *Helleborus niger* in Italia

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).

**Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DiSAFA) - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO).

Riassunto

Nel mese di gennaio 2021, alcune piante di *Helleborus niger* allevate in vaso, in un giardino privato situato a Santa Margherita Ligure (GE), presentavano sintomi di marciume sugli steli florali, sui piccioli e sui tepali, da cui veniva isolata *Botrytis cinerea*. Vengono descritti i sintomi osservati, le osservazioni effettuate e le analisi compiute in laboratorio. Il parassita era identificato in base alle caratteristiche morfologiche osservate su colture *in vitro* e mediante l'analisi della sequenza ITS (Internal Transcribed Spacer). Questa è la prima segnalazione di *B. cinerea* su *H. niger* in Italia ed in Europa.

Parole chiave: ornamentali; rosa di Natale; muffa grigia.

Summary

First report of *Botrytis cinerea* on *Helleborus niger* observed in Italy.

During January 2021, symptoms of grey mould were observed on flower stems, petioles and tepals of some plants of *Helleborus niger* grown in a private garden located in Santa Margherita Ligure, (Genova province, Northern Italy). Symptoms, observations on the microscope and the analyses carried out on affected samples are described. The morphological characteristics of the fungus isolated from the infected tissues permitted to identify the causal agent as *Botrytis cinerea*. The ITS (Internal Transcribed Spacer) analysis confirmed the identification. This is the first report of *B. cinerea* on *H. niger* in Italy as well as in Europe.

Key words: ornamentals; Christmas carol; grey mould.

Introduzione

Helleborus niger, meglio noto come Rosa di Natale, appartiene alla famiglia delle Ranunculaceae. Come altre specie appartenenti al genere *Helleborus*, il suo impiego è piuttosto versatile e varia da pianta in vaso fiorito, a fiore reciso, a specie ornamentale da giardino. Le caratteristiche ecologiche di questa specie non la rendono adatta alla coltivazione in ambiente mediterraneo e, per questo motivo, essa è poco coltivata nel nostro Paese. Tuttavia, l'estetica della pianta, la sua fioritura nei periodi invernali e la contenuta richiesta di manodopera durante la coltivazione, rendono questa specie interessante per la produzione italiana. A tal fine, in Liguria è stato condotto uno studio con lo scopo di valutare l'adattabilità di alcuni genotipi al clima mediterraneo (A.A. V.V., 2013).



Figura 1 - Attacchi di *Botrytis cinerea* su steli florali e piccioli di *Helleborus niger* con produzione di micelio grigiastro.
Figure 1 - Symptoms of grey mould caused by *Botrytis cinerea* on flower stems and petioles of *Helleborus niger*.

Sintomi riscontrati ed identificazione del parassita

Nel corso del mese di gennaio 2021, alcune piante di *H. niger* appartenenti alla collezione di un amatore e coltivate in un giardino privato situato a Santa Margherita Ligure (GE), manifestavano i sintomi di seguito riportati. Le



Figura 2 - Necrosi causata da *Botrytis cinerea* su tepalo di *Helleborus niger*.
Figure 2 - Necrosis caused by *Botrytis cinerea* on a tepal of *Helleborus niger*.

piante erano allevate in vasi di plastica nera (Diam. 15 cm), mantenuti all'esterno e, periodicamente, erano irrigate tramite aspersione manuale. I sintomi consistevano in imbrunimenti e marciumi a partire dalla base degli steli fiorali e dei piccioli che collassavano e venivano colonizzati da un micelio aereo grigiastro che si diffondeva sugli organi colpiti (Figura 1). L'infezione interessava anche le infiorescenze, i cui tepali disseccavano (Figura 2) e, anch'essi, erano ricoperti dalla efflorescenza grigiastra del parassita. Le piante colpite perdevano completamente la loro valenza estetica. Gli isolamenti erano effettuati da numerosi steli e tepali infetti che venivano preventivamente disinfettati in una soluzione di ipoclorito di sodio (1%) per 30 secondi e, successivamente, risciacquati in acqua sterile. Numerosi frammenti di tessuto erano prelevati dal margine delle alterazioni ed erano distribuiti su terreno PDA (Potato Dextrose Agar). Dagli isolamenti, mantenuti ad una temperatura variabile da 20 a 25°C, si sviluppavano le colonie di un fungo caratterizzato da micelio grigiastro che, dopo circa 10 giorni, produceva rami conidiofori ramificati che supportavano numerosissimi conidi non settati, ovoidali, grigiastri, aventi le dimensioni di 7,9-12,1 × 5,2-9,2 (media: 10,3 × 7,8) µm. Lo stesso micelio produceva anche sclerozi scuri, sferoidali, di 1,0-1,5 × 0,5-1,3 (media: 1,1 × 0,9) mm. In base a queste caratteristiche e alle osservazioni dei sintomi precedentemente descritti, il fungo isolato dalle piante di *H. niger* veniva identificato come *Botrytis cinerea* (Ellis, 1971). Per confermare questa identificazione, uno degli isolati (21-1-O1) era coltivato *in vitro*, su PDA, e il suo DNA veniva estratto utilizzando l'E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek, Darmstadt, Germany). Successivamente, sul DNA estratto era condotta una reazione di PCR con i primers ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990). Il sequenziamento dell'amplificazione ottenuta consentiva di ottenere una sequenza di 516 paia di basi (Gene Bank accession number MZ417544) che era analizzata con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) (E = 0). L'analisi della sequenza mostrava il 100% di identità con *B. cinerea*, confermando l'identificazione morfologica.

Inoculazione artificiale e riproduzione dei sintomi

Per riprodurre i sintomi della malattia prima descritti, erano inoculate artificialmente tre piante apparentemente sane di *H. niger*, allevate in vaso. L'inoculazione avveniva irrorando le piante con una sospensione di conidi e micelio di *B. cinerea* prelevati dalle colonie di uno degli isolati (21-1-O1), allevato su PDA per 20 giorni, alla temperatura di 20-24°C. La sospensione veniva irrorata alla concentrazione finale di 5 × 10⁴ CFU/ml, ed erano distribuiti circa 20 ml di sospensione su ciascuna pianta. Tre piante di *H. niger* irrorate con acqua sterile erano utilizzate come testimoni. Tutte le piante erano subito chiuse in una camera umida, mantenuta per 8 giorni, e sistemate in esterno, sotto ombraio, ad una temperatura variabile da 17 a 26°C. Trascorsi circa

6 giorni, le prime necrosi comparivano sui tepali e, nei giorni successivi, sulle foglie e sugli steli delle sole piante inoculate. Alle necrosi seguivano le fruttificazioni del fungo. Dai tessuti colpiti veniva reisolato lo stesso parassita inoculato, soddisfacendo i postulati di Koch.

Conclusioni

In bibliografia scientifica non esistono segnalazioni ufficiali di *B. cinerea* su *H. niger*, ad eccezione di una sola nota riportata negli Stati Uniti (Anonymous, 1960). Pertanto, questa è la prima volta che *B. cinerea* viene descritta ed identificata su *H. niger* in Italia, così come in Europa.

La prevenzione nei confronti di *B. cinerea* ricopre un ruolo fondamentale anche nella difesa di *H. niger*: il contenimento dell'umidità nell'ambiente di coltivazione (attraverso la buona ventilazione dei locali, la disposizione dei vasi in densità non elevate, l'impiego di irrigazione per microportata a goccia) riduce la persistenza di umidità fogliare, fortemente favorevole alle infezioni. Le concimazioni (soprattutto quelle azotate) vanno effettuate in dosi non elevate. Per quanto riguarda la lotta chimica, andrebbe verificata l'efficacia dei principi attivi antibotritici ammessi per le colture floricole ed ornamentali quali i rameici, folpet, le miscele di pyraclostrobin + boscalid e di ciprodinil + fludioxonil, verificando l'insorgenza di eventuali fenomeni di fitotossicità. Nell'ambito della lotta biologica, andrebbe saggiata l'efficacia dei formulati a base di *Bacillus subtilis*.

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 programme. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Anonymous (1960) - Index of Plant Diseases in the United States. U.S.D.A. Agriculture Handbook, 165, 1-531.
- A.A.V.V. (2013) - Quaderni tecnici n° 1 - Progetto Innorna. Istituto Regionale per la Floricoltura, Sanremo (IM), Italia, 93 pp.
- Ellis M. B. (1971) - Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England, 608 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.