

# Attacchi di *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* su *Mammillaria painteri* coltivata in Italia

Domenico Bertetti\* - Pietro Pensa\*\* - Slavica Matic\* - Maria Lodovica Gullino\*  
- Angelo Garibaldi\*

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

\*\*ANT-NET srl, Via Livorno 60, Torino.

## Riassunto

Durante l'estate 2018, su numerose piante di *Mammillaria painteri* allevate in una azienda floricola nei pressi di Vallecrosia (IM), veniva osservata una malattia, i cui sintomi sono descritti in questa nota. L'agente fungino causa delle alterazioni era identificato come *Fusarium oxysporum*, in base alle caratteristiche di microconidi, macroconidi e clamidospore del parassita, prodotti *in vitro*, su idoneo terreno di coltura. Le analisi condotte su uno degli isolati con i primers per i geni TEF (Translation Elongation Factor 1 $\alpha$ ) e RPB2 (DNA-directed RNA polymerase II second largest subunit) confermavano l'identificazione morfologica. Inoltre, l'analisi IGS (Intergenic Spacer Region), effettuata sullo stesso isolato, consentiva di attribuirlo alla forma *specialis opuntiarum* di *F. oxysporum*. Infine, sono forniti i criteri da seguire per mettere in atto una corretta strategia di prevenzione e di lotta nei confronti di *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* su *M. painteri*. La presenza del parassita è riportata su *M. painteri* per la prima volta in Italia e nel mondo e si aggiunge alle altre segnalazioni di *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* su specie succulente appartenenti alle Cactaceae, avvenute di recente nel nostro Paese, come documentato dalla bibliografia scientifica riportata.

**Parole chiave:** piante ornamentali; Cactaceae; succulente; tracheofusariosi.

## Summary

### First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* on *Mammillaria painteri* grown in Italy

In the summer 2018, several potted plants of *Mammillaria painteri* growing in a nursery located in Vallecrosia (Imperia province, northern Italy) showed symptoms of chlorosis, yellowing and blackish discoloration of stems. Internal stem tissues became soft and rotted. The fungal causal agent of the disease was isolated from affected stem tissues and it was identified as *Fusarium oxysporum* by microconidia, macroconidia and chlamidospores produced *in vitro*, on CLA (Carnation Leaf-Piece Agar) medium. The molecular analyses with primers for Translation Elongation Factor 1 $\alpha$  (TEF) and DNA-directed RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) were carried out on a single isolate and confirmed the morphological identification. Furthermore, the Intergenic Spacer Region (IGS) analysis permitted to attribute the isolate to the forma *specialis opuntiarum* of *F. oxysporum*. Finally, some strategies to prevent and to control the pathogen are discussed. *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* is reported on *M. painteri* for the first time in Italy and worldwide, increasing the list of new hosts

belonging to the Cactaceae on which it has been recently reported in Italy.

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

## Introduzione

*Mammillaria painteri*, famiglia Cactaceae, è una delle numerose specie succulente coltivate in Liguria e commercializzate come piante ornamentali in vaso. Produce piccoli fiori di colore bianco rosato. In questa nota vengono descritti i sintomi della malattia osservata su questa specie, per la prima volta nel nostro Paese.

## Sintomi osservati ed identificazione del parassita

Durante l'estate 2018, 1000 piante di *M. painteri* di circa 2 anni di età erano coltivate presso un'azienda floricola ligure, situata a Vallecrosia (IM). Le piante erano allevate in vasi di plastica (diam. 10 cm), di color coccio, contenenti terriccio di coltivazione torboso, con scheletro (pH ~ 6,5; E.C. ~ 500  $\mu$ S), sistemati su un bancale rialzato, in una serra di ferro/vetro. La densità di coltivazione era di 60 piante/m<sup>2</sup>. Le piante erano irrigate tramite aspersione manuale. Il fusto presentava clorosi, seguite da ingiallimenti, a cui faceva seguito l'imbrunimento dei tessuti che, infine, apparivano nerastri (Figura 1). I fusti, sezionati in corrispondenza delle alterazioni esterne, presentavano tessuti interni marcescenti. Era colpito circa l'80% delle piante coltivate. Numerosi pezzi di fusti sintomatici erano disinfettati in ipoclorito di sodio (1%), per 2 minuti, e sciacquati abbondantemente in acqua sterile. Successivamente, i campioni erano sezionati in corrispondenza delle alterazioni e, dal loro interno, venivano prelevati dei frammenti di tessuto al confine con i marciumi. I frammenti erano distribuiti su terreno PDA (Potato Dextrose Agar), ottenendo colonie fungine caratterizzate da micelio rosa pallido e da pigmenti rosati nel terreno di coltura. Allevate su substrato CLA (Carnation Leaf-Piece Agar) (Fisher *et al.*, 1982), le colonie producevano microconidi unicellulari, ovato-ellittici, supportati da corte monofialidi. Sullo stesso terreno, il fungo produceva sporodochi di colore arancio chiaro. Questi ultimi generavano numerosissimi macroconidi lievemente falciformi, con cellula basale a forma di piede e cellula apicale ottusa e dotati di 3 (raramente 4) setti. Le colonie formavano le clamidospore, a parete ruvida, intercalari o terminali, che apparivano singole, in coppia o riunite in catenelle. Le dimensioni dei microconidi erano di 4,4-8,6  $\times$  1,3-3,4 (media: 6,0  $\times$  2,3)  $\mu$ m (n = 50), mentre i macroconidi misuravano 26,5-44,6  $\times$  3,0-4,5 (media: 33,5  $\times$  3,6)  $\mu$ m (n = 50). Le dimensioni delle clamidospore erano

di 6,2-12,3 (media: 8,7)  $\mu\text{m}$  ( $n = 50$ ). Le caratteristiche morfologiche riscontrate dall'osservazione delle colonie fungine coincidono con quelle riportate per *Fusarium oxysporum* da Leslie e Summerell (2006).

All'identificazione morfologica del parassita isolato da *M. painteri* tramite le caratteristiche morfologiche seguivano le analisi molecolari condotte su uno degli isolati (DB18AGO01). Il DNA del microrganismo era estratto da una coltura coltivata su PDA, utilizzando l'E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek, Darmstadt, Germany). Seguivano le reazioni di PCR, in cui venivano impiegati diversi primers: EF1/EF2 (O'Donnell *et al.*, 1998) per il gene TEF (Translation Elongation Factor 1 $\alpha$ ), 5F2/ 7CR (O'Donnell *et al.*, 2007) per il gene RPB2 (DNA-directed RNA polymerase II second largest subunit) e, infine, CNS1/CNL12 (Appel e Gordon, 1995) che amplificano l'Intergenic Spacer Region (IGS). Le successive amplificazioni venivano purificate e sequenziate e si ottenevano tre sequenze di 676 (TEF), 975 (RPB2) e 914 (IGS) paia di basi (GenBank accession nos. MT450439, MT450441, MT450440 rispettivamente). Le analisi delle sequenze erano effettuate con l'algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997) e mostravano il 100% di similarità con *Fusarium oxysporum* per TEF, RPB2 ed IGS. Inoltre, l'analisi IGS consentiva di attribuire l'isolato alla forma *specialis opuntiarum* di *F. oxysporum*.

### Test di patogenicità

I sintomi osservati sulle piante infette erano riprodotti inoculando artificialmente 3 piante apparentemente sane di *M. painteri*, di circa 18 mesi di età, allevate in vaso. Veniva preparata una coltura dell'isolato DB18AGO01, coltivando il fungo per 5 giorni su PDA. La tecnica di inoculazione applicata era quella di Talgø e Stensvand (2013) e consisteva nel praticare 3 ferite su ciascun fusto inoculato in cui, successivamente, venivano inseriti 3 spilli (uno per ferita), precedentemente sterilizzati, con le estremità contaminate da frammenti di micelio prelevati dalla coltura *in vitro*. Tre piante testimone erano ferite e trattate con spilli privi di inoculo. Tutte le piante erano sistemate in una serra, dove la temperatura dell'ambiente variava da 21 a 30°C. La riproduzione dei sintomi avveniva circa 30 giorni dopo l'inoculazione artificiale, quando i primi ingiallimenti apparivano attorno ad alcune ferite praticate sui fusti inoculati. Nei giorni successivi, i sintomi divenivano più evidenti attorno alle ferite inoculate ed erano seguiti dal marciume dei tessuti interni che, infine, disseccavano (Figura 2). Dal margine dei tessuti alterati veniva reisolato lo stesso parassita inoculato, soddisfacendo i postulati di Koch.

### Conclusioni

In letteratura scientifica, *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* è un noto parassita di specie appartenenti alle Cactaceae (Gerlach, 1972; Souza de *et al.*, 2010) e, in Florida e in California, esso viene riportato quale agente di marciume del fusto su *Mammillaria zeilmanniana* (Alfieri *et al.*, 1984; French, 1989). In Italia, questo parassita è stato segnalato su numerose specie succulente (Polizzi e Vitale, 2004; Lops *et al.*, 2013; Bertetti *et al.*, 2017), a cui si sono recentemente aggiunte *Sulcorebutia heliosa* (Garibaldi *et al.*, 2019a) e *S. rauschii* (Garibaldi *et al.*, 2019b). Il parassita è qui riportato su *M. painteri* per la prima volta in Italia, così come nel resto del mondo.



Figura 1 - Sintomi causati da *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* su fusti di *Mammillaria painteri* allevata in vaso.

Figure 1 - Symptoms caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* on stems of *Mammillaria painteri*.

La prevenzione nei confronti di *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* su *M. painteri* parte dall'impiego di materiale propagativo sano. Occorre evitare la formazione di ferite, facile via di ingresso del parassita e gestire in modo oculato le irrigazioni e le concimazioni, evitando soprattutto gli eccessi di azoto. Il mantenimento del substrato colturale adibito a semina e trapianto in luoghi ben distanziati da quelli di coltivazione attenua i rischi di diffusione del microrganismo attraverso microconidi, macroconidi, frammenti di micelio e clamidospore, qualora il parassita faccia l'ingresso nella azienda. Se ciò accade, occorre riconoscere quanto prima la sua presenza ed eliminare ai primi sintomi le piante colpite. L'elevata densità colturale e la presenza in azienda di numerose specie suscettibili a *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* aumentano i rischi di diffusione del parassita da un vaso a quello attiguo, attraverso schizzi d'acqua infetta. I vasi posizionati attorno alle piante colpite dovranno essere rimossi e mantenuti separati, in osservazione, ed il terriccio di coltivazione contaminato dovrà essere eliminato oppure disinfestato (tramite vapore, solarizzazione o Dazomet). Inoltre, occorrerà disinfettare o sostituire i vasi, gli alveoli, disinfettare i teli pacciamanti, le stuoie e i bancali che erano



Figura 2 - Test di patogenicità: marciume dei fusti di piante di *Mammillaria painteri* artificialmente inoculate con *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* (sotto). Testimoni non inoculati (sopra).  
Figure 2 - Pathogenicity test: stem rot on plants of *Mammillaria painteri* artificially inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* (below). Control plants (above).

stati usati per coltivare le piante risultate infette ed iniziare la nuova coltivazione di specie suscettibili al parassita su bancali, se possibile, differenti, sistemati in un nuovo ambiente di coltivazione. Alcuni prodotti commerciali a base di *Trichoderma* spp. andrebbero saggiati in fase di lotta preventiva, così come alcuni substrati contenenti compost e/o corteccia di conifera non compostata che possono fornire al substrato caratteristiche di repressività nei confronti di *F. oxysporum*.

### Ringraziamenti

Lavoro finanziato con fondi dell'Università di Torino, RICERCA LOCALE 2019 "Sviluppo e applicazione di tecniche di diagnostica fitopatologica e di caratterizzazione delle popolazioni di patogeni emergenti collegate alla filiera agroalimentare".

### Lavori citati

- Alfieri Jr. S. A., Langdon K. R., Wehlburg C., Kimbrough J. W. (1984) - Index of Plant Diseases in Florida (Revised). Florida Department of Agriculture and Consumer Service, Division of the Plant Industry Bulletin, 11, 1-389.
- 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.
- French A. M. (1989) - California plant disease host index. California Dept. of Food and Agriculture, Division of Plant Industry, Sacramento, California, USA, 394 pp.
- Garibaldi A., Bertetti D., Pensa P., Matić S., Gullino M. L. (2019a) - First Report of stem rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* on *Sulcorebutia heliosa* in Italy. *Plant Disease*, 103, 2678.
- Garibaldi A., Bertetti D., Pensa P., Matić S., Gullino M. L. (2019b) - First report of stem wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* on *Sulcorebutia rauschii* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00466-5>
- 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., Cigielink 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.
- O'Donnell K., Sarver B. A., Brandt M., Chang D. C., Noble-Wang J., Park B. J., Sutton D. A., Benjamin L., Lindsley M., Padhye A., Geiser D. M., Ward T. J. (2007) - Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *Journal of clinical microbiology*, 45 (7), 2235-2248.
- 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. *Biotemas*, 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.