



# TRE ESEMPI DI DIFFUSIONE IN ITALIA DI NEMATODI ESOTICI ATTRAVERSO PIANTE ORNAMENTALI

Nicola Trisciuzzi<sup>1</sup>, Nicola Vovlas<sup>2</sup>, Alberto Troccoli<sup>2</sup>, Elena Fanelli<sup>2</sup>, Francesca De Luca<sup>2</sup>, Pablo Castillo<sup>3</sup>

Centro di Ricerca, Sperimentazione e Formazione in Agricoltura (CRSFA) "Basile Caramia" Via Cisternino, 281, Locorotondo, BA, Italia

Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPP), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), U.O.S. di Bari, Via G. Amendola 122/D, 70126 Bari, Italia

Istituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Apdo. 4084, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, ceiA3, 14080 Córdoba, Spagna



## RIASSUNTO

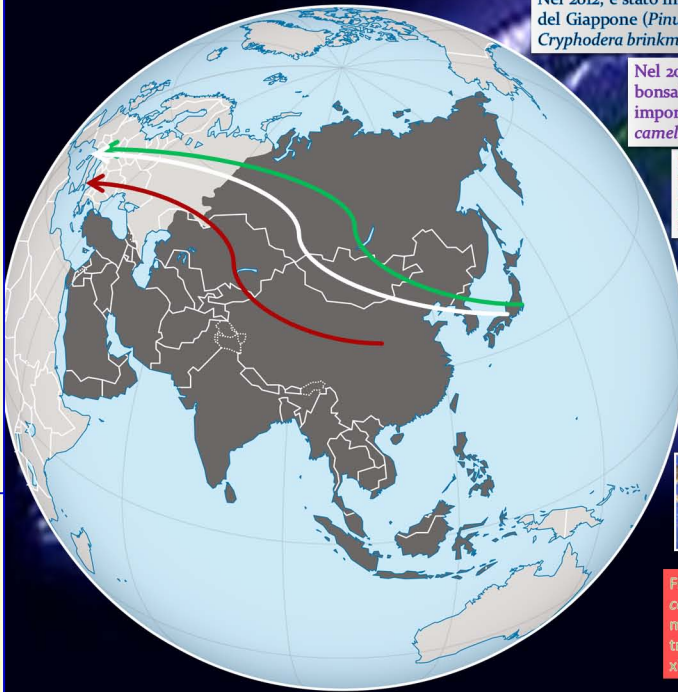
La globalizzazione economica commerciale comprende anche il settore ortoflorovivaistico, settore che mediante mezzi di trasporto, materiale vegetale, ecc., si spostano velocemente da un continente all'altro, trasportando con sé, patogeni che nel nuovo ambiente trovano facilmente il modo per diffondersi, mancando per alcuni di essi gli antagonisti naturali, e, l'incremento del commercio dei bonsai dall'estremo oriente, è un esempio concreto di tale attività. In Europa, le regole per l'ingresso del materiale vegetale sono impartite dall'EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Negli ultimi cinque anni, la collaborazione tra i diversi Istituti di ricerca e il Laboratorio Fitopatologico del CRSFA "Basile Caramia", ha portato alla intercettazione su piante di bonsai di diverse specie di nematodi fitoparassiti. Nel presente contributo verranno riportati e discussi tre esempi di intercettazione (su piante di bonsai), le metodologie opportune per la corretta identificazione delle specie e verranno fornite indicazioni sulle procedure di risanamento, devitalizzazione del parassita e recupero del materiale.

## PAROLE CHIAVE

*Cryphodera brinkmani*, *Meloidogyne camelliae*, *Longidorus asiaticus* n.sp., Specie aliene, Intercettazione, caratterizzazione, morfologia, nematodi fitoparassiti, patogenicità, autoclavaggio

## INTRODUZIONE

Il commercio internazionale è da tempo riconosciuto quale importante causa di diffusione, in un nuovo habitat, di patogeni delle piante e parassiti sconosciuti. Tali nuovi arrivi possono, nel tempo, alterare la produttività e funzionalità degli ecosistemi agricoli. Infatti l'importazione di alberi bonsai legnosi e pini dalla Cina e dal Giappone ha svolto un ruolo importante nella diffusione di nuovi nematodi in Europa e Stati Uniti. Nel vivaismo, in particolare, l'uso di materiale di propagazione infetto o l'introduzione per fini ornamentali di specie esotiche favorisce l'introduzione nei nuovi habitat di nematodi e parassiti sconosciuti. I nuovi nematodi inducono danni severi tanto alle piante ornamentali legnose che li ospitano, quanto nelle altre colture che colpiscono, i sintomi più comuni sono arresto della crescita generale, bassa vigoria, clorosi, necrosi, defogliazione, e disseccamenti su piccoli ramoscelli che rendono il rilevamento mediante ispezione visiva difficoltoso. La prima rilevazione in Italia del nematode non cistico della famiglia eteroderidae *Cryphodera brinkmani* è stata effettuata sulle radici dei bonsai pino bianco giapponese (*Pinus parviflora*) colpite da parassiti; gli alberi erano stati importati dal Giappone, inducono anche la formazione di una cellula gigante uninucleata. Durante la primavera del 2013, il servizio Fitosanitario della Regione Toscana ha intercettato un severo attacco di *Meloidogyne* sp alle radici di bonsai di Camelia giapponese importate dall'area di Saitana (Giappone). Il terreno risultò pesantemente infestato (146 uova + secondo stadio giovanile (J<sub>2</sub>) / ml di terreno) il che suggeriva una forte interazione del nematode con la specie importata. Nel 2014 è stata individuata il nematode *Longidorus asiaticus* n.sp. su bonsai di *Lagerstroemia indica* (L.) Pers., importate dalla Cina.



Nel 2012, è stato intercettato per la prima volta su radici di pino bianco del Giappone (*Pinus parviflora*) provenienti dal Giappone, il nematode *Cryphodera brinkmani*.

Nel 2013, è stato intercettato in Italia su radici di piante di bonsai di Camelia giapponese (*Camellia sasanqua*) importate dal Giappone, il nematode *Meloidogyne camelliae*.

Nel 2014, è stata identificata su piante di bonsai di Mirto crespo (*Lagerstroemia indica*) importate in Italia dalla Cina, una nuova specie di nematode fitoparassita denominata *Longidorus asiaticus* n. sp.

Per tutte e tre le specie è stato condotto un approccio polifasico che prevede la caratterizzazione morfologica, molecolare e filogenetica con altre specie strettamente connesse.

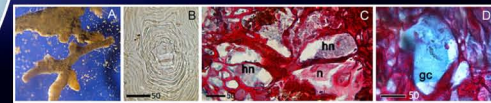


Fig. 2. a. radici di *Camellia sasanqua* infette da *Meloidogyne camelliae* b. Cisti e struttura del cono vulvare di *H. cruciferae* b. microfotografia di campione perineale di femmina c. sezione trasversale di cellula gigante d. cellula gigante (gc) inserita in tessuto xilematico

### *Cryphodera brinkmani* (Fig.1)

Materiale utilizzato: suolo infestato e radici di *Pinus parviflora*

Metodo estrazione: centrifugazione (Coolen 1979)

Metodo osservazione: i nematodi utilizzati per questo studio sono stati delicatamente uccisi con il calore, fissati in una soluzione al 4% di formaldeide + l'1% di acido propionico, e processati con glicerolo in accordo con il metodo di Seinhorst's (Hooper 1986). Le fotografie sono state effettuate con il sistema Leica DFC 425 montato su microscopio ottico Leitz Wetzlar, adoperando la specie di nematode montata temporaneamente su Agar Acqua (Troccoli 2002)

Morfologia e caratteristiche morfometriche della popolazione intercettata su questo nuovo ospite per *C. brinkmani* erano conformi con la descrizione originale, fatta eccezione per alcune piccole differenze sulla morfologia maschile. I dati molecolari integrativi per questa specie sono stati ottenuti utilizzando le regioni di espansione D2-D3 di 28S rDNA, ITS1-rDNA, parziale 18S rDNA, e la proteina-codificanti del gene mitocondriale, citocromo ossidasi sub unità I c (COI). osservazioni istologiche delle radici ospiti di *P. parviflora* infestati da *C. brinkmani* hanno indicato che le femmine di nematodi inducono alterazioni anatomiche simili a quelle riportate per *C. kalesari*, costituiti dalla formazione in un'unica singola cellula gigante (cellule nutrice) con nucleo ipertrofico, nucleoli prominenti, ecc.. Questi risultati sono in linea con i risultati dell'analisi filogenetica e indicano una stretta relazione nelle risposte indotte ai vegetali da femmine di *Cryphodera* geneticamente correlati con *Meloidodera* spp..

### *Meloidogyne camelliae* (Fig.2)

Materiale utilizzato: suolo infestato e radici di *Camellia sasanqua*

Metodo estrazione: centrifugazione (Coolen 1979)

Le analisi morfologiche e morfometriche di alcuni tratti della popolazione intercettata di *M. camelliae* erano in accordo con quelli dell'originale descrizione delle specie, ad eccezione di alcune minori differenze per il secondo stadio giovanile (lunghezza stiletto e C Ratio, spicole e gubernaculuminales), che può essere il risultato della variabilità intraspecifica. I dati dell' integrativa molecolare per questa specie sono stati ottenuti utilizzando D2-D3 segmenti di espansione di 28S rDNA, ITS1-rDNA, e della proteina di codifica del gene mitocondriale COI. Le relazioni filogenetiche di questa specie con altri rappresentanti di *Meloidogyne* spp. utilizzando D2-D3 segmenti di espansione e ITS1 inseriscono *M. camelliae* r insieme a *M. artiellia* e *M. baetica*. Osservazioni istologiche di radici di *C. sasanqua* infestata da *M. camelliae* rivelano lievi gonfiori nei siti di alimentazione principale, con la maggior parte delle femmine che depongono le uova sporgenti dalla radice. Le alterazioni anatomiche ai siti di alimentazione sono costituiti da 3-8 cellule giganti/femmina, ipertrofiche, polinucleate, ma non è stata indotta di iperplasia a differenza di quello che si verifica comunemente per la maggior parte membri del genere.

### *Longidorus asiaticus* n.sp. (Fig.3 e Fig.4)

Materiale utilizzato: suolo infestato di *Lagerstroemia indica*

Metodo estrazione: centrifugazione (Coolen 1979) e setacciamento e decantazione di Cobb's (Flegg 1967)

Metodo osservazione: i nematodi utilizzati per questo studio sono stati delicatamente uccisi con il calore, fissati in una soluzione al 4% di formaldeide + l'2% di glicerolo, e processati con glicerolo puro in accordo con il metodo di Seinhorst's (Hooper 1986). Le fotografie sono state effettuate con microscopio ottico Zeiss III.

Il nuovo nematode è caratterizzato da una piccola dimensione del corpo (2.74-3.52mm), una labbro arrotondato di circa 12 micron di larghezza e continuo con il contorno del corpo, odontostilo di ca 85 micron, anello di guida dello stiletto a circa 37 micron dalla parte anteriore, vulva con posizione quasi equatoriale (48-54 %), coda corta, circa 2/3 della sua larghezza, dorsale convessa - conoide, con parte finale arrotondata, con un c ratio circa 0.7. Il maschio non è stato diagnosticato. Diagnosi Integrativa è stato completata molecolarmente, utilizzando segmenti di espansione D2 - D3 di 28S rDNA, ITS- rDNA, e parziali 18S - rDNA. Le relazioni filogenetiche di questa specie con altri *Longidorus* spp. utilizzando segmenti di espansione D2 - D3, ITS e parziale 18S rDNA, ha indicato che *L. asiaticus* n. sp. è raggruppato insieme con *L. hangzhouensis*, *Longidorus* sp. JH-2014, e *L. camelliae*: tutti hanno in condivisione una comune origine geografica Asiatica

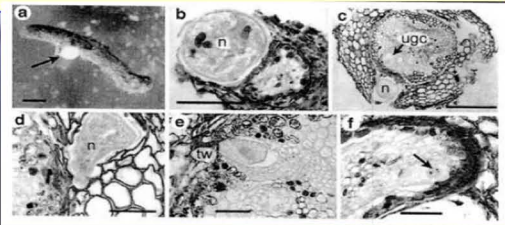


Fig. 1. habitat del parassita e alterazioni anatomiche causate da *Cryphodera brinkmani* in radici *Pinus parviflora*. a. segmento di radice con porzione posteriore del corpo di una femmina bianca (arrotondata) b. c. Sezione trasversale del corpo di una femmina (n) inserito nel parenchima corticale e cellula gigante uninucleata nella stele e circondata da elementi vascolari d. sezione di radice con nematode (n) con testa circondata e compressa da cellule pericliche e endodermiche con pareti sottili in corrispondenza della cellula gigante uninucleata (non visibile) e. sezione trasversale di radice con parete sottile (tw) nel punto di alimentazione del nematode alla cellula gigante uninucleata ricca di citoplasma denso f. sezione di radice longitudinale con cellula gigante e nucleo ipertrofico e nucleoli prominenti.

L'intercettazione di tali nematodi in piante di bonsai, conferma la necessità di implementare i controlli durante le importazioni ma anche durante le esportazioni di piante, nonché di incrementare i programmi di certificazione finalizzati alla produzione di bonsai esenti anche da nematodi pericolosi



Il ritrovamento di tali specie è stato prontamente segnalato ai Servizi Fitosanitari interessati (SFR della Toscana per *C. brinkmani* e *M. camelliae* e al SFR della Puglia per il ritrovamento di *L. asiaticus* n.sp.). Il materiale residuo è stato opportunamente distrutto mediante autoclavaggio.

## Bibliografia

- Coolen, W.A. (1979). Methods for extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. In F. Lamberti & C.E. Taylor (Eds.), *Root-knot nematodes (Meloidogyne species). Systematics, Biology and Control* (pp. 317-329). New York: Academic.
- Hooper, D.J. (1986). Handling, fixing, staining and mounting nematodes. In J. Southey (Ed.), *Ministry of Agriculture and Food* (6th ed., pp. 59-80). London: Her Majesty's Stationary Office.
- Troccoli, A. (2002). Aspetti pratici e comparativi di alcune metodologie tradizionali applicate all'identificazione dei nematodi da quarantena. *Nematologia mediterranea*. 30. 107-110.

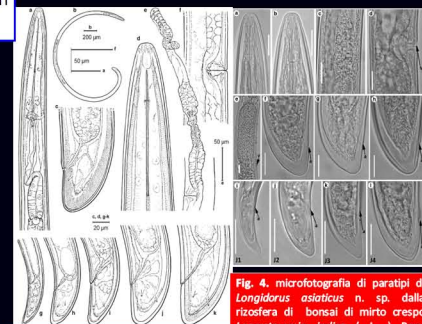


Fig. 3. disegni tecnici di *Longidorus asiaticus* n. sp. Paratyphes dalla rizosfera di bonsai di mirto crespo *Lagerstroemia indica* (L.) Pers. importati dalla Cina in Italia meridionale (a-c). Particolare del bulbo basale d. Particolare della vulva e. Particolare dell'utero con un uovo f-h regioni coda femminile. I rispettivamente primo, secondo, terzo e quarto stadio della coda giovanile. Abbreviazioni: a. ano, v. vulva. (ingrandimento = 20 µm)

Fig. 4. microfotografia di paratyphes di *Longidorus asiaticus* n. sp. dalla rizosfera di bonsai di mirto crespo *Lagerstroemia indica* (L.) Pers. importati dalla Cina in Italia meridionale (a-c). Particolare del bulbo basale d. Particolare della vulva e. Particolare dell'utero con un uovo f-h regioni coda femminile. I rispettivamente primo, secondo, terzo e quarto stadio della coda giovanile. Abbreviazioni: a. ano, v. vulva. (ingrandimento = 20 µm)