



# NEWSLETTER

N° 4 - Luglio 2023

**Bollettino periodico d'informazione per il progetto Prometeo cofinanziato dall'Unione Europea nell'ambito del Programma ENI di Cooperazione Transfrontaliera (CT) "Italia-Tunisia" 2014-2020**

Il Programma ENI CT "Italia-Tunisia" 2014-2020 è un programma bilaterale di cooperazione transfrontaliera, cofinanziato dall'Unione Europea nell'ambito dello Strumento Europeo di Vicinato (ENI). Con una dotazione finanziaria di 33,3 milioni di euro, il programma, la cui gestione congiunta è stata affidata all'Ufficio di Programmazione della Regione Siciliana, si propone di promuovere uno sviluppo economico, sociale e territoriale giusto, equo e sostenibile, al fine di favorire l'integrazione transfrontaliera e valorizzare i territori e le risorse dei due Paesi partecipanti. <https://www.italietunisie.eu/>

## Sommario della Newsletter:

Edizione speciale .....	p.1
Antracnosi del mandorlo ...	p.2
Disseccamento del mandorlo .....	p.7
Macchia nera degli agrumi .....	p.9
Mal secco degli agrumi .....	p.12
Deperimento dell'olivo .....	p.17

## Edizione speciale: i protocolli scientifici di Patologia vegetale del progetto Prometeo

Anche questo numero speciale della Newsletter periodica di Prometeo riveste un carattere prettamente scientifico e viene interamente dedicato alla pubblicazione dei primi protocolli scientifici di Patologia Vegetale, frutto delle attività di ricerca e di confronto tra esperti scientifici e *stakeholder* del progetto Prometeo, con l'obiettivo di creare una rete transfrontaliera di collaborazione tra ricercatori, aziende e altri attori italiani e tunisini per favorire lo sviluppo di soluzioni tecniche innovative e sostenibili per la protezione delle colture arboree mediterranee contro agenti patogeni, da quarantena o parassiti emergenti, che ne minacciano la redditività e la sopravvivenza.

Questi risultati saranno utili per orientare le politiche agricole, rafforzare i servizi fitosanitari, aumentare l'efficienza produttiva,

la competitività e la sostenibilità di questi settori e migliorare gli standard di qualità nella sicurezza alimentare.



Buona lettura!

## Almond anthracnose - Anthracnose de l'amande - Antracnosi del mandorlo *Colletotrichum* spp.

L'antracnosi del mandorlo (AM) causata da *Colletotrichum* spp. è stata descritta come una delle malattie più importanti di questa coltura nelle principali regioni di produzione di mandorle nel mondo, inclusi California, Australia, Spagna e Italia. Attualmente, l'AM è considerata una malattia riemergente nei paesi del bacino del Mediterraneo a causa dello spostamento delle piantagioni dalle aree di coltivazione originarie verso altre con condizioni climatiche, edafiche ed orografiche favorevoli alla coltivazione e alla resa. Il patogeno colpisce principalmente i frutti ai primi stadi di maturazione, causando lesioni depresse, rotonde e arancioni o marroni con abbondante gomma. I frutti colpiti possono cadere prematuramente e portare al disseccamento dei rami, provocando significative perdite economiche negli anni di epidemie (López-Moral et al., 2020).

### Diagnosi

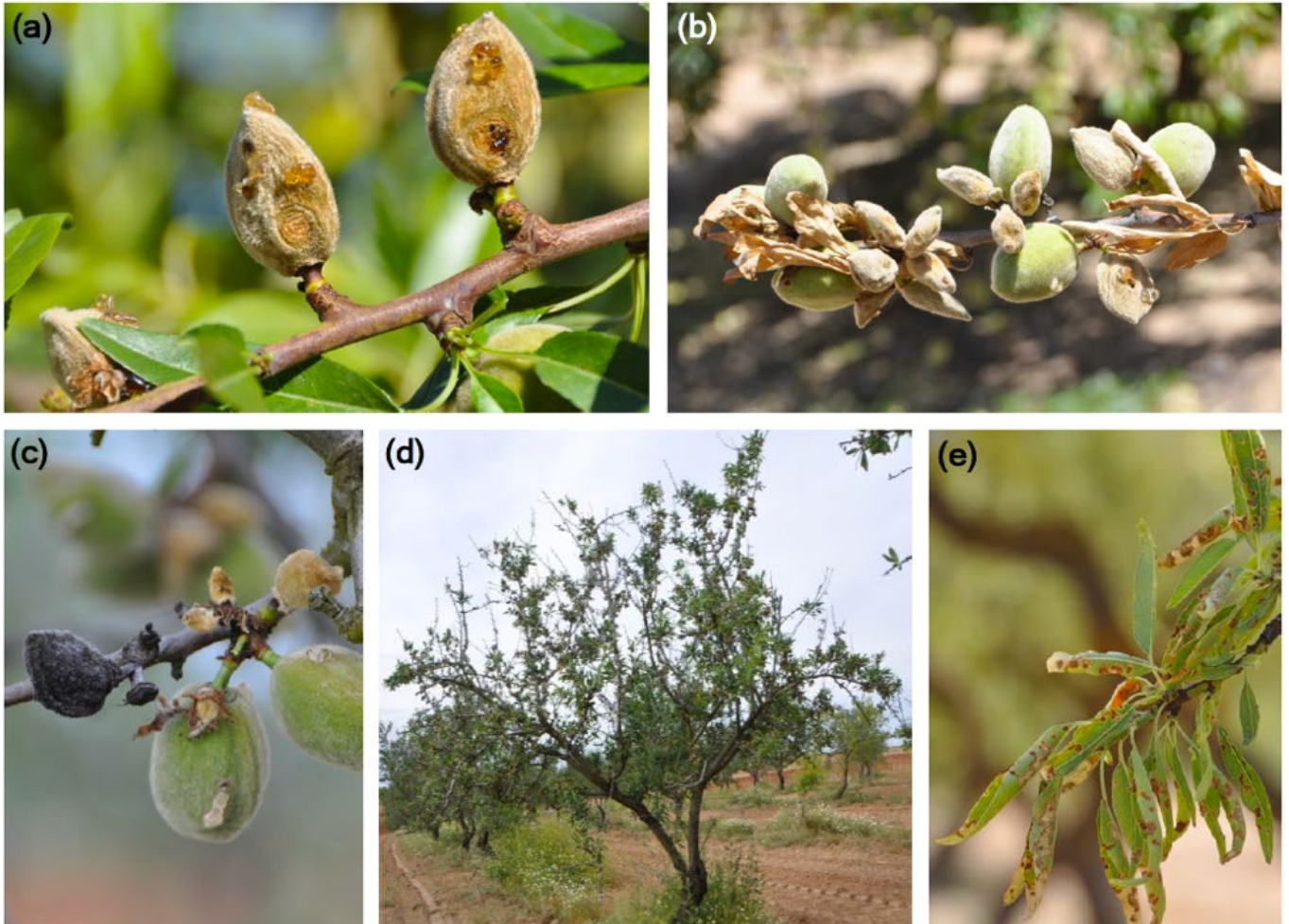
#### In campo - sintomi e segni

Il patogeno colpisce principalmente il frutto del mandorlo, ma anche i fiori, le foglie e i tessuti legnosi possono essere colpiti. I fiori infetti appassiscono, spesso con goccioline arancioni di conidi sulla corolla floreale (Palacio-Bielsa et al., 2017). Tuttavia, i sintomi più caratteristici della malattia si osservano nei frutti verdi. I frutti infetti presentano lesioni depresse, rotonde e arancioni o marroni con un diametro di 5-12 mm che si sviluppano sulla superficie del frutto in primavera-estate e producono abbondante gomma (**Figura 1a**).

La diagnosi della malattia è difficile quando sono ancora presenti le lesioni iniziali poiché il colore delle zone colpite non differisce chiaramente dall'epidermide asintomatica. Quando i sintomi progrediscono, viene prodotto abbondante micelio biancastro e masse arancioni di conidi sulla superficie dei frutti infetti. Successivamente, i frutti mummificano (**Figura 1b**) e cadono prematuramente a terra (Förster et al., 1999; López-Moral et al., 2017; Palacio-Bielsa et al., 2017; Peres et al., 2005).

I frutti mummificati che rimangono nella chioma degli alberi durante l'autunno e l'inverno saranno la principale fonte di inoculo per le infezioni dell'anno successivo (**Figura 1c**). Sebbene il patogeno causi principalmente il marciume dei frutti, è stato osservato anche una sindrome secondaria consistente in necrosi fogliare, defogliazione, appassimento dei germogli e disseccamento dei rami in alberi seriamente colpiti (**Figura 1d**) (Adaskaveg et al., 2017; Förster et al., 1999; López-Moral et al., 2017). Le foglie mostrano necrosi che inizia dagli apici e dai margini e si estende all'intera lamina fogliare (**Figura 1e**) (Palazón et al., 1979).

Questa sindrome secondaria sembra essere causata dalla traslocazione delle tossine prodotte dal patogeno nei frutti colpiti che rimangono sull'albero. Il patogeno può essere isolato dai tessuti infetti del frutto. Tuttavia, non può essere isolato dalle foglie necrotiche e dal legno dei germogli e dei rami che mostrano appassimento e disseccamento, probabilmente perché questa sindrome è causata direttamente dalle fitotossine, ma il patogeno non è più presente nei tessuti (Adaskaveg et al., 2017; Förster et al., 1999; López-Moral et al., 2017).



**Figura 1.** Sintomi caratteristici dell'antracnosi del mandorlo causata da *Colletotrichum* spp. (a) lesioni depresse, affondate, rotonde e arancioni su mandorle verdi; (b) ramo con frutti mummificati e foglie necrotiche; (c) frutti mummificati causati dall'infezione dell'anno precedente e che rimangono nella chioma dell'albero; (d) defogliazione e disseccamento dei germogli e dei rami come conseguenza delle tossine prodotte dal patogeno; (e) lesioni necrotiche irregolari negli apici e nei margini delle foglie (López-Moral et al., 2020).

### In laboratorio - isolamento e caratteristiche delle colture

Isolamento da frutti sintomatici. I frutti colpiti vengono disinfettati in superficie con candeggina commerciale (Cl a 50 g litro<sup>-1</sup>) al 10% (vol/vol) in acqua sterile per 1 minuto e lasciati asciugare all'aria su carta filtro sterile per 30 minuti. I tessuti colpiti vengono tagliati con un bisturi sterile e posti su piastre petri contenenti agar-patata-destrosio (PDA) (Difco Laboratories) con streptomina (PDA+S). Quando i tessuti dei frutti colpiti mostrano una abbondante sporulazione del patogeno, le masse di conidi vengono rimosse con un ago sterile e trasferite in piatti di Petri su PDA+S. Le piastre di Petri vengono incubate a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo diurno di 12 ore di luce fluorescente ( $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) per 5 giorni, e frammenti di micelio vengono prelevati da queste colonie in attivo accrescimento e trasferiti su PDA in modo da conservare gli isolati, ottenuti con il procedimento descritto, in collezione.

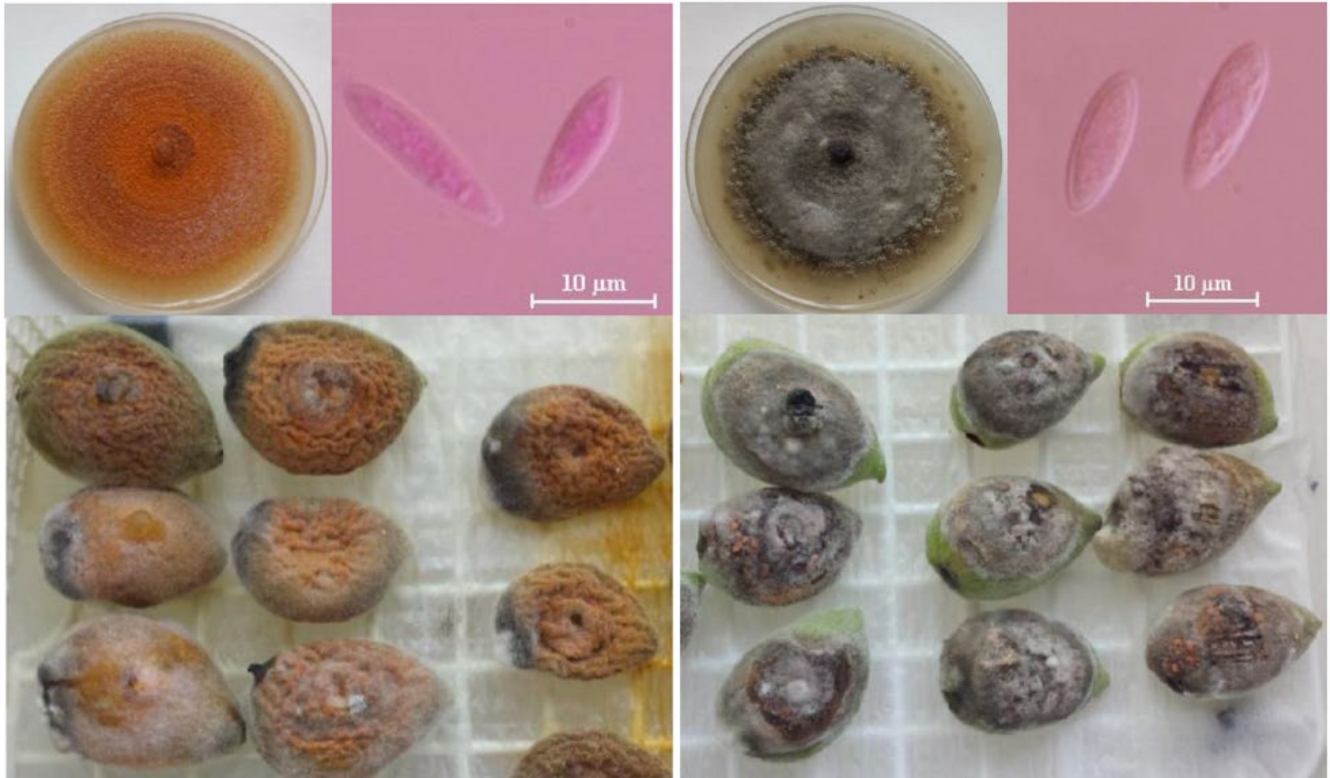
In generale, le colonie fungine di *Colletotrichum* spp. associate all'AM mostrano una crescita radiale con cerchi concentrici e abbondante micelio aereo su PDA quando vengono incubate a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo diurno di 12 ore. Il colore delle colonie varia dal grigio chiaro al grigio scuro per gli isolati di *C. godetiae* (sottopopolazione grigia); e dal salmone al rosa-arancione per gli isolati di *C. acutatum* s.s. (Figura 2) o *C. fioriniae* (sottopopolazioni rosa-arancione) (Förster et al., 1999; Freeman et al., 1998; López-Moral et al., 2017). Il tasso di crescita miceliale varia da 3,0 a 6,0 mm/giorno su PDA a  $25^\circ\text{C}$  (Förster et al., 1999; López-Moral et al., 2017).

Nonostante la morfologia dei conidi possa variare con la specie di *Colletotrichum*, la morfologia dei conidi degli isolati di *Colletotrichum* da mandorlo non è utile per distinguere le specie. In generale, tutte le specie di *Colletotrichum* associate all'AM mostrano conidi unicellulari e

trasparenti con due estremità appuntite. Curiosamente, i conidi di *C. godetiae* da mandorlo mostrano una morfologia simile a quelli di *C. acutatum* (due estremità appuntite in entrambi i casi), mentre i conidi di *C. godetiae* ottenuti da altri ospiti come l'olivo di solito mostrano una singola estremità appuntita (López-Moral et al., 2017) (**Figura 2**). Tuttavia, queste differenze morfologiche dei conidi di isolati di *C. godetiae* da diversi ospiti non si traducono in differenze genetiche, come è stato osservato sequenziando sei regioni genomiche (López-Moral et al., 2017).

### *Colletotrichum acutatum* s.s.

### *Colletotrichum godetiae*



**Figura 2.** Colonie e conidi di *Colletotrichum acutatum* s.s. (isolato Col-506; sottopopolazione rosa-arancione) e di *C. godetiae* (isolato Col-522; sottopopolazione grigia) identificati come agenti causali dell'antracnosi del mandorlo. Colonie coltivate su PDA e su frutti di mandorla inoculati a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo di 12 ore per 7 e 14 giorni, rispettivamente. Barre di scala: (conidi)  $10 \mu\text{m}$  (López-Moral et al., 2020).

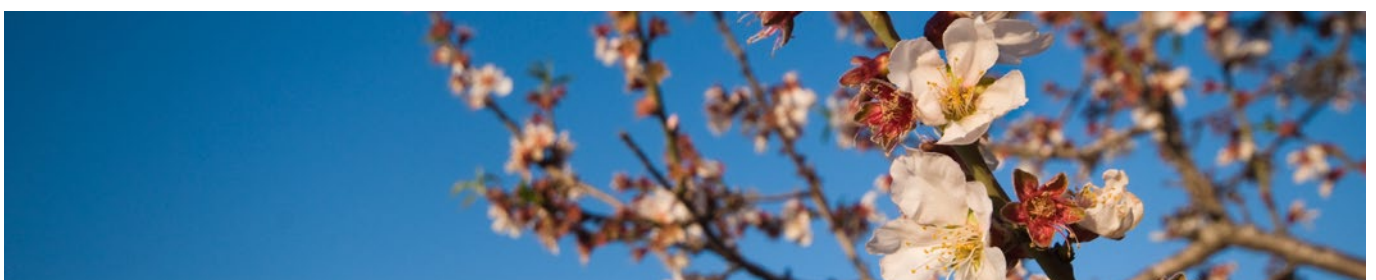
## In laboratorio - identificazione molecolare

### Estrazione del DNA

Per il DNA genomico, viene utilizzato il micelio fungino e i conidi da colture ottenute da un singolo conidio cresciute su PDA a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo di 12 ore per 7 giorni. Il DNA totale viene estratto utilizzando un kit commerciale seguendo le istruzioni del produttore. La concentrazione e la purezza del DNA estratto vengono determinate con uno spettrofotometro MaestroNano (MaestroGen) (López-Moral et al., 2017).

### PCR convenzionale

Vengono amplificate e sequenziate sei regioni genomiche, tra cui il gene ribosomiale nucleare 5.8S con due spazi interni trascritti (ITS), un introne di 200 bp della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e sequenze parziali della chitina sintasi 1 (CHS-1), dell'istone 3 (HIS3), dell'actina (ACT) e del  $\beta$ -tubulina (TUB2). Le coppie di primer utilizzate per ciascuna regione genomica, nonché le loro sequenze, sono mostrate nella **Tabella 2**.



**Tabella 2.** Primer utilizzati per amplificare le sei regioni genomiche studiate mediante analisi del DNA

Primer <sup>y</sup>	Primer pairs	Genomic sequence (5'-3')	Size (bp) <sup>z</sup>	Reference
ITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	540	White et al. 1990
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	...	...
TUB2	BT2A	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	429	Glass and Donaldson 1995
	BT2B	ACCCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC	...	...
ACT	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	246	Carbone and Kohn 1999
	ACT783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	...	...
CHS-1	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG	282	Carbone and Kohn 1999
	CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTC	...	...
HIS3	CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	382	Crous et al. 2004
	CYLH3R	AGCTGGATGTCCCTTGGAAGT	...	...
GAPDH	GDF1	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	250	Guerber et al. 2003
	GDF1	GGGTGGAGTCGTAAGTACTGAGCATGT	...	...

<sup>y</sup> ITS = internal transcribed spacer, TUB2 =  $\beta$ -tubulin, ACT = actin, CHS-1 = chitin synthase 1, HIS3 = histone 3, and GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

<sup>z</sup> Expected polymerase chain reaction product.

### PCR in tempo reale (TaqMan®) per la diagnosi di *Colletotrichum* spp., *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* da colture e materiale vegetale.

La diagnosi, basata sulla PCR in tempo reale, fornisce un risultato rapido, sensibile ed accurato in 1-2 giorni, consentendo uno screening ad alta capacità e a basso costo dei campioni. Questi metodi consentono anche la rilevazione dei patogeni dal materiale vegetale sintomatico o asintomatico artificialmente infettato. I metodi descritti potrebbero essere utili per lo studio dell'epidemiologia di questi patogeni in campo e nei vivaî. Inoltre, i metodi potrebbero essere utilizzati in futuri monitoraggi delle popolazioni fungine o in studi riguardanti la biologia e le strategie di infezione di *Colletotrichum* spp. (Garrido et al., 2009)

Sono stati progettati tre test specifici (primer e sonde TaqMan®) per la rilevazione e la discriminazione di *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *Colletotrichum* spp., utilizzando il software primer express™ (PE Biosystems).

Le sonde sono progettate con 5' FAM (6-carbossifluoresceina) come reporter e 3' TAMRA (tetra-metilrodamina) come quencher; tutti i primer e le sonde sono sintetizzati da MWG Biotech (Tabella 3).

**Tabella 3.** Primer e sonde utilizzati nei test TaqMan® per la diagnosi di *Colletotrichum* spp., *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

Target	Primer/Probe	Orientation	Assay	Sequence 5'-3'	Target region (nucleotides)	EMBL accession
<i>Colletotrichum acutatum</i>	ACUT-F1	Forward	TaqMan®	CGG AGG AAA CCA AAC TCT ATT TAC A	122-146	EF694675
	ACUT-R1	Reverse		CCA GAA CCA AGA GAT CCG TTG	192-212	EF694675
	ACUT-PB	Probe		CGT CTC TTC TGA GTG GCA CAA GCA AAT AAT TAA A	150-183	EF694675
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GLOE-F1	Forward	TaqMan®	GGC GGG TAG GGT CYC CG <sup>a</sup>	52-68	AJ536226
	GLOE-R2	Reverse		ACT CAG AAG AAA CGT CGT TAA ATC AG	128-153	AJ536226
	GLOE-PB	Probe		CTC CCG GCC TCC CGC CYC <sup>b</sup>	74-91	AJ536226
<i>Colletotrichum</i> spp.	COL GEN-F1	Forward	TaqMan®	TGC CTG TTC GAG CGT CAT T	320-338	EF694675
	COL GEN-R2	Reverse		CTA CGC AAA GGA GGC TCC G	413-431	EF694675
	COL GEN-PB	Probe		AAC CCT CAA GCW CYG CTT GGY KTT GG <sup>a</sup>	341-366	EF694675

I primer e le sonde TaqMan® specifici per *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* (Tabella 3) sono stati progettati all'interno dell'area più divergente della regione ITS1 delle specie fungine allineate. L'allineamento di sequenze multiple tra 307 sequenze appartenenti a 21 specie di *Colletotrichum* e le sequenze di altri patogeni vegetali correlati ha permesso di progettare primer e una sonda TaqMan® specifici per il genere *Colletotrichum* all'interno delle sequenze divergenti della regione ITS2 del gene r RNA (Garrido et al., 2009).

## Gestione

Il controllo della malattia deve basarsi su un programma di gestione integrata delle malattie (GIM) che preveda la prevenzione delle infezioni. La prevenzione è particolarmente importante nell'AM poiché le specie di *Colletotrichum* si stabiliscono lentamente nel frutteto nel corso di diversi anni, manifestandosi quando le condizioni ambientali sono favorevoli all'insorgenza della malattia. Una volta comparsi i sintomi della malattia, il controllo dell'AM è difficile se la pressione dell'inoculo in campo è elevata. Pertanto, per far fronte alle infezioni da *Colletotrichum* è necessario prendere in considerazione misure preventive che includano pratiche culturali, resistenza delle cultivar e controllo biologico. I trattamenti fungicidi dovrebbero essere utilizzati solo per prevenire perdite economiche in anni di epidemie, quando le misure preventive non sono sufficienti a controllare la malattia o i frutteti con una storia di malattia suggeriscono la necessità di trattamenti preventivi. Tutte queste strategie di gestione e un aggiornamento sulle ricerche riguardanti questo argomento sono descritti in López-Moral et al., 2020.



## Bibliografia

1. Adaskaveg, J.E.; Gubler, W.D.; Duncan, R.; Stapleton, J.J.; Holtz, B.A.; Trouillas, F.P. UC IPM Pest Management Guidelines: Almond UC ANR, 2017. Publication 3431.
2. Förster, H.; Adaskaveg, J.E. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. *Phytopathology* 1999, 89, 1056-1065.
3. Freeman, S.; Katan, T.; Shabi, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Dis.* 1998, 82, 596-605.
4. Garrido, C.; Carbú, M.; Fernández-Acero, F.J.; Boonham, N.; Colyer, A.; Cantoral, J.M.; Budge, G., 2009. Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathol.* 58, 43-51.
5. López-Moral, A.; Agustí-Brisach, C.; Lovera, M.; Arquero, O.; Trapero, A. Almond Anthracnose: Current Knowledge and Future Perspectives. *Plants* 2020, 9, 945.
6. López-Moral, A.; Raya-Ortega, M.C.; Agustí-Brisach, C.; Roca, L.F.; Lovera, M.; Luque, F.; Arquero, O.; Trapero, A. Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing almond anthracnose in Spain. *Plant Dis.* 2017, 101, 2034-2045.
7. Palacio-Bielsa, A.; Cambra, M.; Martínez, C.; Olmos, A.; Pallás, V.; López, M.M.; Adaskaveg, J.E.; Förster, H.; Cambra, M.A.; Duval, H.; et al. Almond Diseases, In Almonds. Botany, Production and Uses; Socias-Company, R., Gradziel, T.M., Eds.; CAB International: Boston, MA, USA, 2017; pp. 321-374.
8. Palazón, I.J.; Palazón, C.F. Estudios sobre *Gloeosporium amygdalium* Brizi en los almendros españoles. *Anuario INIA Serv. Prot. Veg.* 1979, 11, 29-43.
9. Peres, N.A.; Timmer, L.W.; Adaskaveg, J.E.; Correl, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* 2005, 89, 784-796.

# Almond dieback - Dépérissement de l'amande - Disseccamento del mandorlo *Neoscytalidium dimidiatum*

Il disseccamento del mandorlo causato da *Neoscytalidium dimidiatum* (famiglia: *Botryosphaeriaceae*), è un cancro del tronco che provoca un grave declino e il disseccamento degli alberi di mandorlo (*Prunus dulcis* (Mill) D. A. Webb); la sindrome è diffusa in California (Nouri et al., 2018); recentemente, è stata segnalata anche in molti frutteti in Tunisia, con un'incidenza fino al 20% delle piante colpite.

I cancri del tronco e delle branche del mandorlo sono una preoccupazione importante per l'industria delle mandorle, poiché possono colpire alberi giovani e diventare fisiopatie prevalenti con l'avanzare dell'età dei frutteti. I patogeni delle malattie del tronco generalmente attaccano le parti legnose dell'ospite, causando sintomi come cancri, disseccamento e sintomi interni, tra cui necrosi a forma di cuneo e decolorazione dei tessuti vascolari (Gramaje et al. 2012). Tra i più comuni cancri del mandorlo ci sono quelli causati da funghi della famiglia delle *Botryosphaeriaceae* (English et al. 1966, Olmo et al. 2016). La maggior parte delle specie all'interno della famiglia delle *Botryosphaeriaceae* ha una distribuzione mondiale e si rinvencono su una vasta gamma di ospiti; questa specie possono avere attitudine saprofita, parassita ed endofita (Slippers e Wingfield 2007).

## Diagnosi

### In campo - sintomi e segni

I sintomi sono non specifici. Comprendono la necrosi delle gemme con bruciature delle foglie, il disseccamento delle branche, il declino e la morte degli alberi. Le sezioni trasversali delle branche degli alberi infetti che mostrano necrosi e decolorazioni vascolari marroni sono riportate nella figura 1.



**Figura 1.** Disseccamento e appassimento delle branche degli alberi di mandorlo in Tunisia.

### In laboratorio - isolamento, caratteristiche delle colture e identificazione molecolare del patogeno

L'isolamento del patogeno può essere effettuato direttamente dai tessuti necrotici. Per l'isolamento, frammenti (4-5 mm) di legno necrotico devono essere sterilizzati in superficie (soluzione di NaClO al 1% per 2 minuti, etanolo al 70% per 30 secondi), lavati due volte con acqua distillata sterile, piastrati su agar di farina d'avena (OMA) e incubati a 25 °C per sette giorni. Dopo l'incubazione, le colonie di *N. dimidiatum* su OMA sono caratterizzate da un micelio aereo denso

e lanuginoso che diventa gradualmente grigio scuro fino al verde oliva. Questo tipo di colonie produce artroconidi; sono tipicamente di colore marrone scuro, a parete spessa, monocellulari, di 6,3 a 14,2 × 2 a 4,5 µm e ovali a rettangolari.

L'identità del patogeno è confermata tramite PCR tradizionale che mira ad amplificare l'*Internal Transcriber Spacer region* (ITS1-5.8S-ITS2); l'amplificazione può essere effettuata utilizzando i primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTCCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990).



## Bibliografia

1. English, H., Davis, J. R., and De Vay, J. E. 1966. Dothiorella canker, a new disease of almond trees in California. *Phytopathology* 56:146.
2. Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E., Olmo, D., Mostert, L., Damm, U., and Armengol, J. 2012. Fungal trunk pathogens associated with wooddecay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia* 28:1-13.
3. Nouri, M.T., Lawrence, D.P., Yaghmour, M.A., Michailides, T.J., Trouillas, F.P., 2018. *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker, shoot blight and fruit rot of almond in California. *Plant Disease* 102, 1638-1647.
4. Olmo, D., Armengol, J., Le'on, M., and Gramaje, D. 2016. Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from almond trees on the Island of Mallorca (Spain). *Plant Dis.* 100:2483-2491
5. Slippers, B., and Wingfield, M. J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: Diversity, ecology and impact. *Fungal Biol. Rev.* 21:90-106
6. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (San Diego, CA: Academic Press Inc), 315-322.



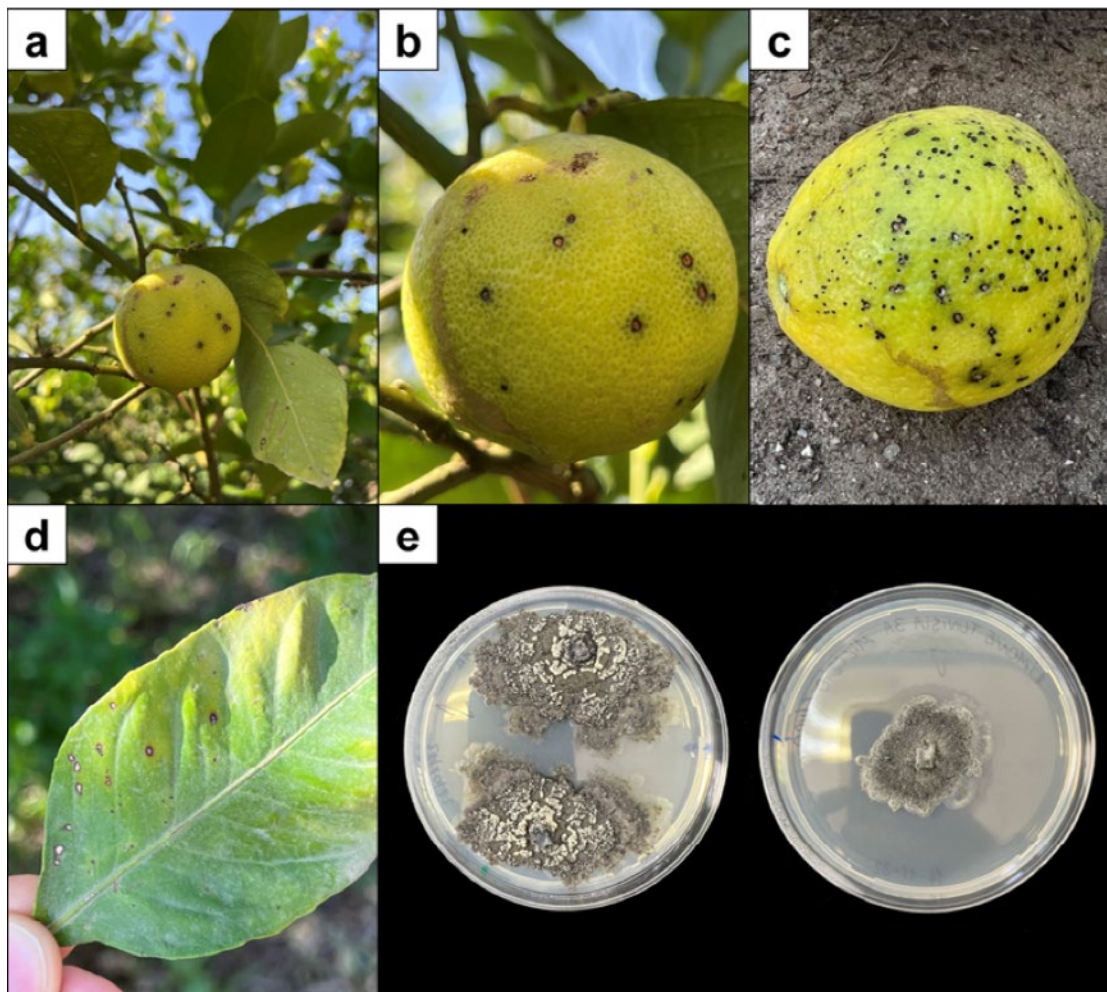
## Citrus Black Spot - Tache noire des agrume - Macchia nera degli agrumi *Phyllosticta citricarpa*

La Macchia Nera degli Agrumi (Citrus Black Spot, CBS) è una malattia che colpisce la maggior parte delle specie di agrumi, causando decadimento delle foglie e dei frutti (Baldassari et al., 2008; EFSA, 2014; EPPO, 2020; Kotzé, 1981; Paul et al., 2005). Il CBS è presente in Asia, Australia, Sud Africa e Sud America e recentemente è stata segnalata in Tunisia (Boughalleb-M'Hamdi et al., 2020).

L'agente causale della malattia è *Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa*), un patogeno da quarantena elencato nell'Allegato II Parte A del Regolamento di esecuzione della Commissione (UE) 2019/20724. Il Regolamento delegato della Commissione (UE) 2019/17025 ha anche elencato *P. citricarpa* come una delle specie nocive prioritarie. Questo patogeno incluso nell'elenco A1 dell'Organizzazione europea e mediterranea per la protezione delle piante (EPPO, 2020). *Phyllosticta citricarpa* è un organismo da quarantena anche negli Stati Uniti (Schirmacher et al., 2019).

La diffusione del patogeno responsabile del CBS avviene tramite spore (**Figura 1e**), comprese sia ascospore trasportate dal vento e prodotte all'interno di pseudotecii (ascocarpi, vedere dopo) che conidi trasportati dall'acqua e prodotti all'interno picnidii (vedere dopo) (Guarnaccia et al., 2017).

Le ascospore sono considerate la fonte primaria di inoculo nel ciclo della malattia della CBS, mentre i conidi, trasportati dall'acqua piovana, sono responsabili principalmente della dispersione a corto raggio del patogeno (Guarnaccia et al., 2017; Spósito et al., 2011). Condizioni favorevoli alla maturazione di pseudotecii e ascospore sono i cicli di bagnatura e asciugatura delle foglie combinati con le fluttuazioni termiche da temperate a calde (Fourie et al., 2013; Guarnaccia et al., 2017; Hu et al., 2013).



**Figura 1** a, b e c, macchie nere causate da *Phyllosticta citricarpa* sulla buccia di frutti di limone maturi provenienti da un frutteto commerciale (Tunisi, Tunisia); d, lesioni caratterizzate da macchie nere sulle foglie di limone; e, colture sporigene di sette giorni di età di *Phyllosticta citricarpa* su PDA.

## Diagnosi

### In campo - sintomi e segni

La Macchia Nera degli Agrumi (Citrus Black Spot, CBS) è associata a diversi sintomi sui frutti (Guarnaccia et al., 2019; Kotzé, 1981). I più comuni sono le macchie nere (*hard spot*) (**Figura 1a e b**), caratterizzate da lesioni necrotiche affondate, di colore marrone chiaro con un bordo rialzato di colore marrone rossastro scuro, spesso contenenti picnidi (EPPO, 2020; Guarnaccia et al., 2017, 2019). Altri sintomi sono: (i) macchie virulente, che sono lesioni necrotiche affondate senza bordi definiti, principalmente sui frutti maturi; (ii) melanosi false, costituite da piccole pustole nere di solito a forma di lacrima; (iii) macchie scure, screpolate o chiazzate (Guarnaccia et al., 2019).

I sintomi sulle foglie e sui ramoscelli sono raramente riscontrati su piante di arancio, mandarino e altre specie di agrumi commerciali, ma sono frequentemente segnalati su limone. Appaiono come lesioni necrotiche affondate, rotonde e di piccole dimensioni con un alone giallo (**Figura 1d**) (Guarnaccia et al., 2019; Kotzé, 1981).

La temperatura è un fattore cruciale per lo sviluppo della malattia. I rapidi incrementi di temperatura, tipicamente da 20° a 27°C, quando i frutti sono maturi, stimolano la comparsa dei sintomi della Macchia Nera degli Agrumi e portano alla formazione di un numero significativo di lesioni sui frutti (Guarnaccia et al., 2019; Lee e Huang, 1973). L'elevata intensità luminosa può facilitare ulteriormente lo sviluppo delle lesioni sui frutti, quindi il lato della chioma maggiormente esposto alla luce del sole mostra tipicamente più sintomi (Guarnaccia et al., 2019). L'età avanzata e lo stress fisiologico sembrano inoltre facilitare lo sviluppo del CBS (Guarnaccia et al., 2019; Kotzé, 1981).

In campo, una diagnosi precisa di *P. citricarpa* è complicata dal fatto che le macchie necrotiche sono sintomi generici che possono essere causati da altre specie del genere *Phyllosticta* (Guarnaccia et al., 2019; EFSA, 2014; EPPO, 2020) e persino da altri ascomiceti (ad esempio, *Septoria citri* e *Cytosporina citriperda*)

### In laboratorio - isolamento e caratteristiche delle colture

L'isolamento dalle lesioni sui frutti e sulle foglie infette procede nel seguente modo. Il materiale vegetale infetto deve essere disinfettato con carta bibula imbevuta di etanolo al 96% o al 70%. Poi, le lesioni vengono escisse (con un tira-tappi o un bisturi), trasferite su terreno agar di decotto di ciliegia (CHA) o agar di estratto di malto cloramfenicolo (MALTCHL), o su agar di patate glucosato (PDA) arricchito con streptomina solfato (250 mg/L) e incubato a 22-23°C per 48-72 ore. Dopo l'incubazione, le ife in crescita vengono trasferite su piastre di PDA e lasciate crescere a 22-23°C per 10-12 giorni. Successivamente, gli isolati finali dovrebbero essere ottenuti mediante coltura monoconidica.

Su PDA, le colonie di *P. paracitricarpa* sono piatte, abbastanza regolari e crescono lentamente, inizialmente con micelio bianco-grigio che diventa gradualmente verdastro fino a verde scuro, con ife bianche al margine; inoltre, hanno margini irregolari delimitati da una zona traslucida molto più ampia di micelio sommerso incolore (**Figura 1e**). Il centro della colonia è scuro con micelio aereo grigio-glaucoso, spesso con numerosi piccoli ciuffi. Il retro della colonia è molto scuro al centro e circondato da aree di color seppia grigia e bionda (Baayen et al., 2002). Dopo 7-8 giorni iniziano a svilupparsi gli stromi, mentre i picnidi maturi con i conidi vengono generalmente prodotti entro 10-14 giorni.

A causa delle ampie somiglianze morfologiche con specie del genere *Phyllosticta* (ad esempio, *Phyllosticta citriasiana*, *Phyllosticta paracapitalensis* e *Phyllosticta paracitricarpa*) (Guarnaccia et al., 2019), l'identificazione *in vitro* di *P. citricarpa* non può portare all'identificazione esatta del patogeno.

### In laboratorio - rilevazione molecolare

L'identificazione di *P. citricarpa* può essere effettuata mediante il sequenziamento del gene *tefl*, che consentirà un'identificazione inequivocabile di *P. citricarpa* e soprattutto la sua distinzione da *P. paracitricarpa* (EPPO, 2020; Guarnaccia et al., 2017).

Recentemente, è stato sviluppato un protocollo di PCR in tempo reale che mira all'amplificazione di una porzione del gene *tefl* e consente l'identificazione precisa di *P. citricarpa* da materiale infetto (Zajc et al., 2022).

### Estrazione del DNA

Il prerequisito per l'applicazione della PCR è l'estrazione del DNA dal materiale vegetale o dalla

coltura pura. A questo scopo possono essere utilizzati kit commerciali.

### PCR convenzionale e sequenziamento

Il protocollo PCR convenzionale per la rilevazione di *P. citricarpa* mira all'amplificazione della regione *tefl* utilizzando i primer forward EF1-728F - 5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3' e reverse EF2 - 5'-GGA (G / A) GTACCAGT (G / C) ATCATGTT-3' (Guarnaccia et al., 2017). L'amplificazione PCR può essere effettuata utilizzando kit commerciali seguendo le istruzioni del produttore. L'identificazione della specie mediante il prodotto PCR ottenuto deve essere effettuata mediante l'analisi bioinformatica della sequenza correlata.

### PCR in tempo reale

Uno dei protocolli più promettenti di PCR in tempo reale per la rilevazione di *P. citricarpa* è stato sviluppato da Zajc et al. (2022). Il metodo mira ad amplificare una porzione del gene *tefl* e consiste dell'impiego della coppia di primer Pc-TEFI-F (GAAGGTCAGTTGCCTCACACTTT), Pc-TEFI-R (GTCATATAACCGAGCGCCAAA) e la sonda specifica TaqMan Pc-TEFI-Probe (VIC-TTGC-GCCTCCACTTG-MGBNFQ); quest'ultima è contrassegnata con un reporter VIC 5' e un binder di solco minore non fluorescente (MGB) 3'.

### Gestione

Diverse misure di controllo chimico e culturale sono utilizzate per la gestione del CBS (Guarnaccia et al., 2017). La più efficace comprende l'applicazione di fungicidi durante il periodo di suscettibilità del frutto. I principali fungicidi utilizzati sono gli strobilurine (inibitori della quinone esterna, QoI), i ditiocarbammati e il rame fisso (attività multisito) e il carbammato di metil benzimidazolo (Guarnaccia et al., 2017).

Oltre al controllo chimico, sono comunemente utilizzate misure di controllo culturale, come la rimozione della lettiera fogliare con macchine, l'accelerazione della decomposizione della lettiera fogliare con urea, solfato di ammonio, bagassa di canna da zucchero, la pacciamatura con piante che crescono tra le file di frutteti per coprire la lettiera fogliare, la potatura dei rami morti e l'irrigazione e la nutrizione bilanciata per ridurre la quantità di inoculo di *P. citricarpa* (Guarnaccia et al., 2017).

### Bibliografia

- Baayen RP, Bonants PJM, Verkley G, Carroll GC, van der Aa HA, de Weerd M et al. (2002) Non-pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *Guignardia mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology* 92, 464-477.
- Baldassari RB, Wickert E, De Goes A (2008) Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from Citrus spp. *Eur J Plant Pathol* 120:103-110.
- Boughalleb-M'Hamdi N, Fathallah A, Benfradj N, Ben Mahmoud S, Bel Hadj Ali A, Medhioub L, Jaouadi I, Huber J, Jeandel C, loos R (2020) First report of Citrus Black Spot disease caused by *Phyllosticta citricarpa* on Citrus limon and *C. sinensis* in Tunisia. *New Dis Rep* 41:8
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health) (2014) Scientific Opinion on the risk of *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) for the EU territory with identification and evaluation of risk reduction options. *EFSA J* 12: 3557.
- EPPO (2020) PM 7/017 (3) *Phyllosticta citricarpa* (formerly *Guignardia citricarpa*). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 50: 440-461. <https://doi.org/10.1111/epp.12700>
- Fourie P, Schutte T, Serfontein S, Swart F (2013) Modeling the effect of temperature and wetness on *Guignardia pseudothecium* maturation and ascospore release in citrus orchards. *Phytopathology* 103(3):281-292. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-11-0194>
- Guarnaccia V, Gehrman T, Silva-Junior GJ, Fourie PH, Haridas S, Vu D, Spatafora J, Martin FM, Robert V, Grigoriev IV, Groenewald JZ, Crous PW (2019) *Phyllosticta citricarpa* and sister species of global importance to Citrus. *Mol Plant Pathol* 20(12):1619-1635. <https://doi.org/10.1111/MPP.12861>
- Guarnaccia V, Groenewald JZ, Li H, Glienke C, Carstens E, Hattingh V, Fourie PH, Crous PW (2017) First report of *Phyllosticta citricarpa* and description of two new species, *P. paracapitalensis* and *P. paracitricarpa*, from citrus in Europe. *Stud Mycol* 87:161-185. <https://doi.org/10.1016/J.SIMYCO.2017.05.003>
- Hu J, Johnson EG, Wang NY, Davoglio T, Dewdney MM (2013) qPCR quantification of pathogenic *Guignardia citricarpa* and nonpathogenic *G. mangiferae* in citrus. *Plant* 98(1):112-120. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0465-RE>
- Kotzé JM (1981) Epidemiology and control of Citrus Black Spot in South Africa. *Plant Dis* 65(12):945-950.
- Lee YS and Huang CS (1973) Effect of climatic factors on the development and discharge of ascospores of the citrus black spot fungus. *Journal of Taiwan Agricultural Research* 22, 135-144.
- Paul I, Van Jaarsveld AS, Korsten L, Hattingh V (2005) The potential global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by *Guignardia citricarpa* (Kiely): Likelihood of disease establishment in the European Union. *Crop Prot* 24(4):297-308.
- Schirmacher AM, Tomlinson JA, Barnes AV (2019) Species-specific real-time PCR for diagnosis of *Phyllosticta citricarpa* on Citrus species. *EPPO Bull* 49: 306-313.
- Spósito MB, Amorim L, Bassanezi RB, Yamamoto PT, Felipe MR, Czeremainski ABC (2011) Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the Citrus Black Spot epidemic in Brazil. *Crop Prot* 30(12):1546-1552. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2011.08.007>
- Zajc J, Kogej Zwitter Z, Fišer S, Gostinčar C, Vicent A, Domenech AG et al (2023) Highly specific qPCR and amplicon sequencing method for detection of quarantine citrus pathogen *Phyllosticta citricarpa* applicable for air samples. *Plant Path*, 72(3), 548-563.

# Mal secco of citrus - Mal secco des agrumes - Mal secco degli agrumi *Plenodomus tracheiphilus*

Il mal secco degli agrumi è una malattia tracheomicotica causata da *Plenodomus tracheiphilus* (in passato conosciuto come *Phoma tracheiphila*), un fungo mitosporico classificato dall'Organizzazione Europea e Mediterranea per la Protezione delle Piante (EPPO) come una specie di quarantena di tipo A2. Ad oggi, il mal secco è presente nei paesi produttori di agrumi dell'area mediterranea e del Mar Nero, ad eccezione di Spagna, Portogallo e Marocco (EPPO, 2015).

Tra le specie di agrumi colpite, il limone (*Citrus × limon*) è l'ospite principale del patogeno, sebbene la malattia sia comune anche su cedro, bergamotto, lime, arancia amara e limone rugoso (Nigro et al., 2015).

Il patogeno si diffonde attraverso la dispersione di spore (conidi), che in campo vengono prodotte all'interno di picnidi (vedi dopo) e da ife che crescono su legno esposto o detriti, inclusi rami, foglie e frutti. In condizioni naturali, l'inoculo può essere disperso dal vento e dalla pioggia. Il patogeno può anche essere trasmesso ad altri alberi attraverso strumenti di potatura contaminati. I rami e le foglie che giacciono sul terreno sono una fonte di inoculo per l'infezione attraverso le radici ferite. Le foglie infette dal fungo cadono a terra durante l'autunno e la primavera, e il fungo all'interno del tessuto fogliare è in grado di sporulare a temperature comprese tra 10 e 25°C (Migheli et al., 2009).

## Diagnosi

### In campo - sintomi e segni

Il Mal Secco induce una vasta gamma di sintomi specifici e non specifici che possono manifestarsi singolarmente o contemporaneamente (Migheli et al., 2009) (**Figura 1**).

Il primo sintomo di solito appare sulle foglie dei germogli più alti, che mostrano una lieve decolorazione delle vene primarie e secondarie (**Figura 1i**); poi, le foglie perdono il loro splendore, diventano gialle, appassiscono e cadono, principalmente senza i piccioli, che persistono sui germogli. I germogli appaiono spesso clorotici nella parte apicale mantenendo un colore verde normale nella parte basale (**Figura 1d ed e**); a volte diventano marroni.

I germogli appena infettati mostrano una decolorazione gialla o rosa-salmone fino a rossastra del legno, che si verifica anche nel legno dei rami principali e secondari così come nel tronco, dove la crescita del patogeno sta progredendo (Figura 1g ed h). Nel tempo, la pianta subisce un progressivo disseccamento basipeto dei germogli, dei rami e del tronco, che porta alla morte dell'intera pianta (**Figura 1a-c**) (Abbate et al., 2019; Migheli et al., 2009; Nigro et al., 2011; Russo et al., 2020).

Oltre alla forma più comune di mal secco, si possono distinguere due diverse forme della malattia: 'mal fulminante', una forma rapida e fatale della malattia apparentemente causata dall'infezione delle radici; e 'mal nero', conseguenza di un'infezione cronica dell'albero che porta a un annerimento del durame.

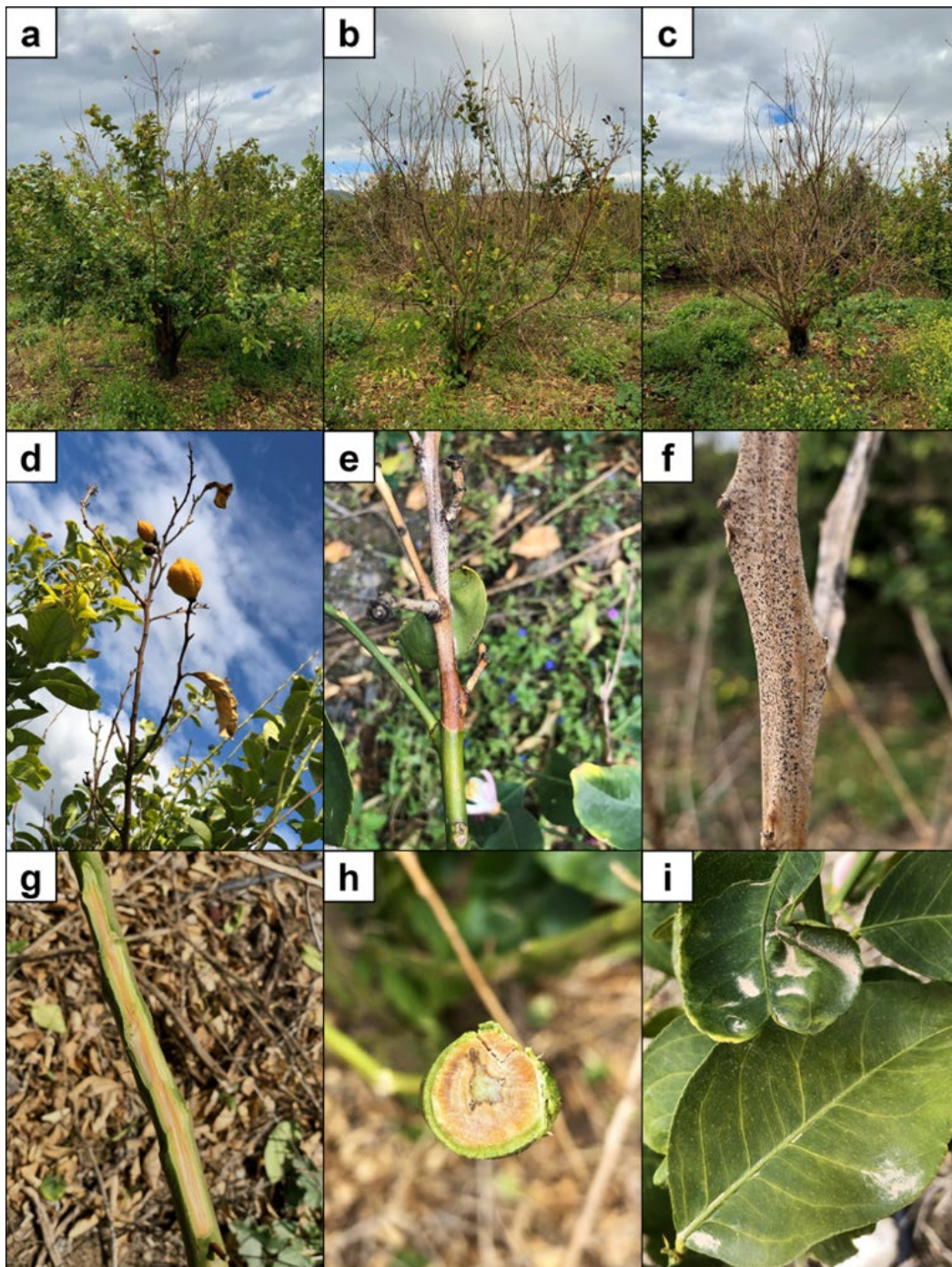
Un ulteriore tratto specifico della malattia del Mal Secco è la presenza, sulla superficie del tessuto infetto, di segni del patogeno (Gentile et al., 2000; Migheli et al., 2009). Questi sono rappresentati da picnidi, strutture di resistenza che possono comparire, a partire dalla fine dell'autunno, in germogli o polloni che si stanno disseccando da 1 a 2 anni. La loro presenza provoca il distacco dell'epidermide dai tessuti sottostanti, seguito dalla penetrazione dell'aria, con la comparsa di lunghe strisce grigio-argento sugli organi affetti (Nigro et al., 2011). La rottura dell'epidermide rende possibile osservare i picnidi come macchie nere direttamente a occhio nudo o con una lente a basso ingrandimento (Nigro et al., 2011).

### In laboratorio - isolamento e caratteristiche delle colture

Il fungo può essere isolato posizionando pezzi di tessuti infetti prelevati dal legno decolorato di rametti vivi o dalle foglie sintomatiche su Patata Destrosio Agar (PDA) (EPPO, 2015).

Isolamento da rametti sintomatici. Per prima cosa, i rametti vengono sottoposti a scortecciatura; quindi, il tessuto xilematico infetto viene separato dal resto e tagliato in piccoli pezzi (3,0-4,0 mm di diametro); quindi, viene eseguita una sterilizzazione superficiale del materiale infetto per immersione in NaOCl al 1% (1 minuto - m), risciacquo in acqua distillata sterilizzata (sdw) (1 minuto - m), immersione in etanolo al 70% e risciacquo finale in acqua distillata sterilizzata (sdw) (1 minuto - m). I pezzi sterilizzati vengono tamponati con carta assorbente, seminati su piastre di PDA contenenti solfato di streptomina (250 mg/L) e incubati a 22-23°C per 48 ore. Dopo l'incubazione, le ife in crescita vengono trasferite su piastre di PDA e lasciate crescere a 22-23°C per 10-12 giorni. Quindi, l'isolato finale viene ottenuto mediante coltura monoconidica.

Isolamento da foglie sintomatiche. Le nervature fogliari vengono separate dal resto della lamina e tagliate in piccoli pezzi (2-3 mm); quindi, si procede con le seguenti fasi di isolamento (steriliz-

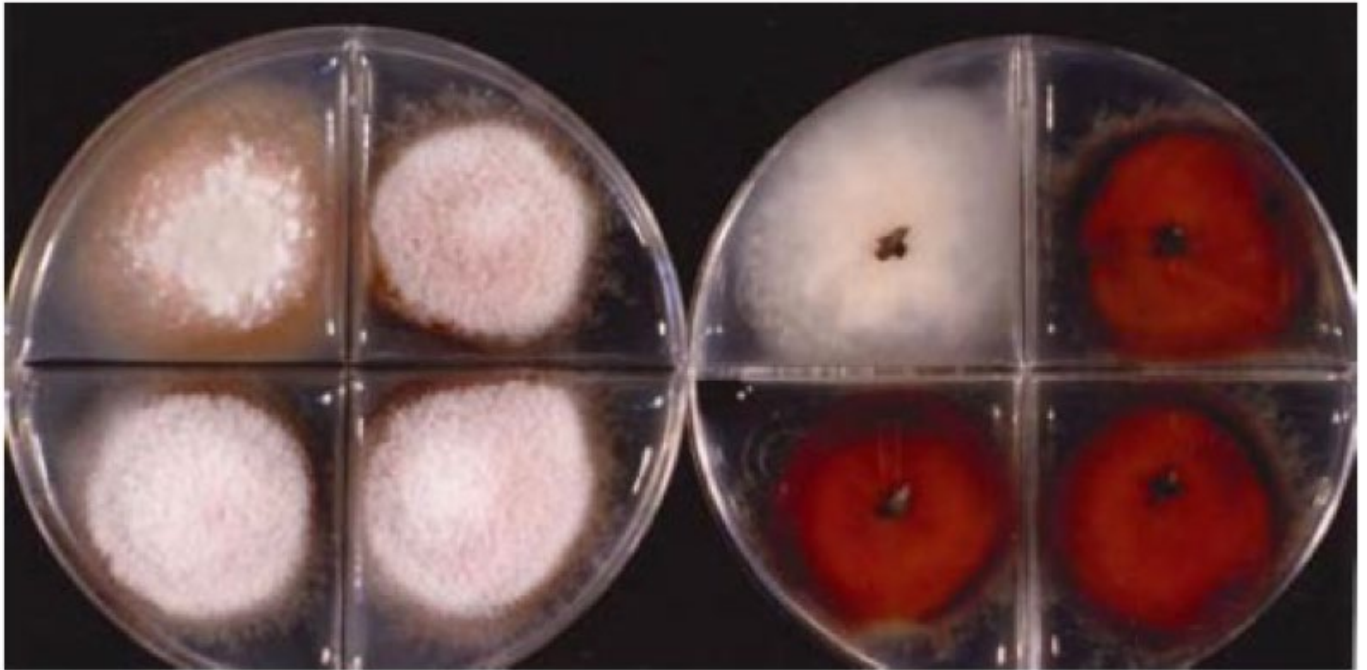


**Figura 1** a, b e c, progressione (da sinistra a destra) della gravità di appassimento e defogliazione dei rami in un giovane albero di limone affetto da Mal Secco in un frutteto commerciale in Sicilia (Italia); d ed e, caduta delle foglie e defogliazione dei rami apicali; f ramo appassito di limone con picnidi sparsi di *Plenodomus tracheiphilus*; sezioni longitudinale (g) e trasversale (h) su un ramo di limone con il tipico scolorimento arancione-rossastro del legno; i, scolorimento e clorosi delle nervature fogliari in un albero di limone affetto da Mal Secco.

zazione, semina, incubazione) come sopra descritto.

In coltura pura *Plenodomus tracheiphilus* presenta caratteristiche morfologiche e micro-strutture peculiari. In dettaglio, su PDA il patogeno mostra un micelio inizialmente trasparente, che diventa marrone o rosso-rosato dopo alcuni giorni. Su PDA, la temperatura ottimale per la crescita è di  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e il tasso di crescita è di 3,8-6,0 mm al giorno a questa temperatura. Varianti cromogene e non cromogene sono state distinte in coltura e si è scoperto che in natura esistono ceppi che differiscono per virulenza (**Figura 2**) (Magnano di San Lio et al., 1992).

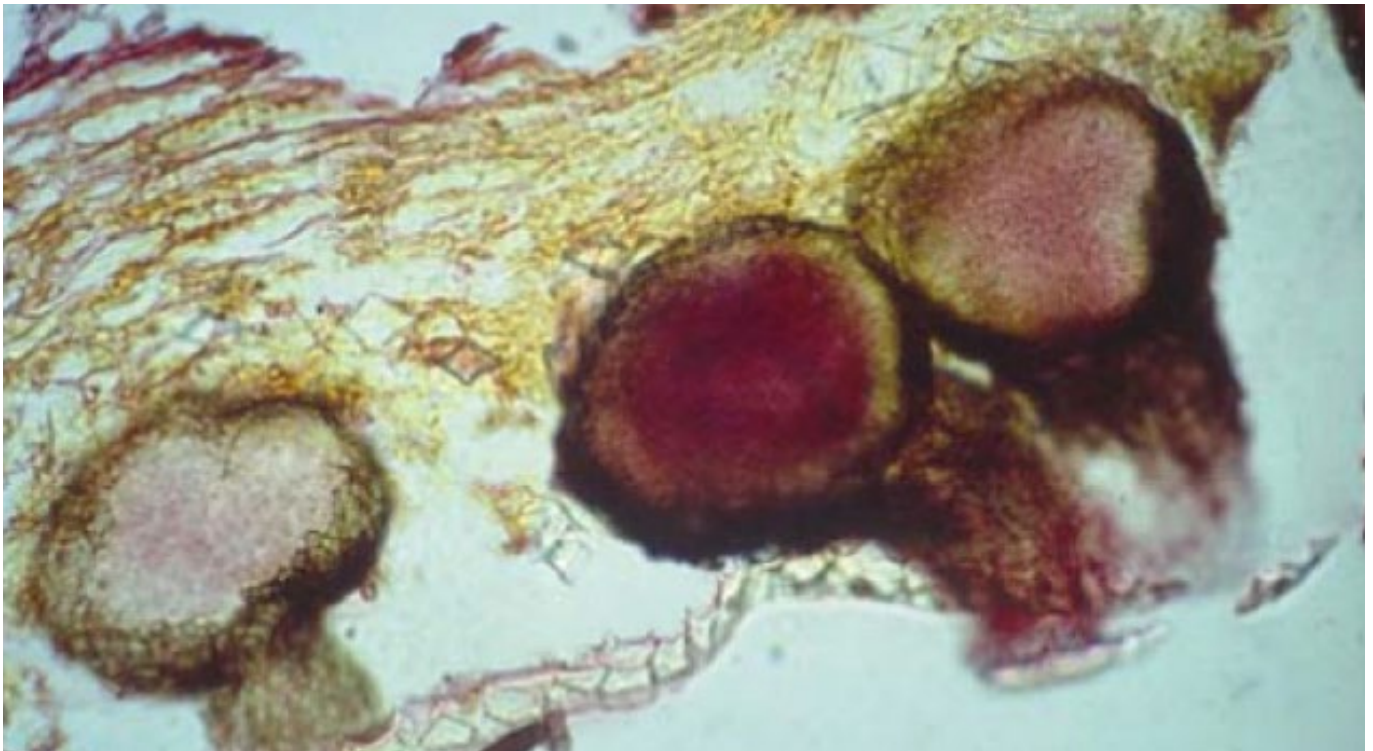
La riproduzione asessuata di *P. tracheiphilus* avviene tramite conidi; questi sono prodotti sia all'apice delle ife conidiogene (**Figura 3**) (indicate come fialidi; fialoconidi di diametro 1,5-3,0 x 3,0-8,0  $\mu\text{m}$ ) sia all'interno di picnidi (**Figura 4**); questi ultimi sono strutture di resistenza piccole, nere e globose che presentano una cavità interna coperta da piccoli conidi trasparenti (diametro 0,5-1,5 x 2,0-4,0  $\mu\text{m}$ ) che vengono espulsi attraverso ostioli in cirri biancastri (EPPO, 2015).



**Figura 2** colture monoconidiche di ceppi cromogeni di *Plenodomus tracheiphilus*. Sulla sinistra e sulla destra sono rispettivamente mostrati il lato anteriore e posteriore della piastra di Petri. Si noti una variante albina in alto a sinistra.



**Figura 3** fialoconidi e fialidi di *Plenodomus tracheiphilus* su ife libere prodotte in coltura.



**Figura 4** sezione di un ramo appassito di limone che mostra picnidi di *Plenodomus tracheiphilus* immersi nella corteccia sotto l'epidermide. Si noti il collo dei picnidi che emerge attraverso l'epidermide.

La produzione di fialidi e fialoconidi può essere osservata in colture di 10-12 giorni cresciute su PDA, mentre lo sviluppo *in vitro* di picnidi può essere stimolato da un'incubazione di 12-24 ore, in camera umida, di pezzi di rametto sintomatici di mal secco (EPPO, 2015).

#### **In laboratorio - rilevazione molecolare**

Attualmente, i metodi maggiormente consolidati per la rilevazione molecolare di *P. tracheiphilus* in materiale vegetale sospetto, nonché per confermare l'isolamento del patogeno in coltura pura, si basano tutti su tecniche PCR (EPPO, 2015).

#### **Estrazione del DNA**

Il prerequisito per l'applicazione della PCR è l'estrazione del DNA dal materiale vegetale o dalla coltura pura. A questo scopo, è possibile seguire protocolli specifici di laboratorio (Balmas et al., 2005) o utilizzare kit commerciali.

#### **PCR convenzionale**

Il protocollo di PCR convenzionale suggerito per la rilevazione di *P. tracheiphilus* è stato sviluppato da Balmas et al. (2005). Il metodo mira ad amplificare due regioni polimorfiche della regione dell'ITS (internal transcribed spacer) ed è basato sull'impiego dei primer Pt-FOR2: 5'-GGATGGGCGCCAGCCTTC-3' e Pt-REV2: 5'-GCACAAGGGCAGTGGACAAA-3', specifici per *P. tracheiphilus*. La PCR può essere effettuata utilizzando kit commerciali seguendo le istruzioni del produttore. I prodotti di PCR ottenuti (se presenti) possono essere separati su gel di agarosio al 1,5% in tampone di corsa TAE e visualizzati sotto una luce UV.

#### **PCR in tempo reale**

Il protocollo di PCR in tempo reale più utilizzato per la rilevazione di *P. tracheiphilus* è stato sviluppato da Demontis et al. (2008). Il metodo mira ad amplificare la regione ITS del rRNA nucleare e può essere applicato utilizzando le tecnologie SYBR® Green I o TaqMan®. Le sequenze dei primer e della sonda sono le seguenti: Phomafor: 5'-GCT GCG TCT GTC TCT TCT GA-3', Phomarev: 5'-GTG TCC TAC AGG CAG GCAA-3', Phomaprobe: 5'-FAM CCA CCA AGG AAA CAA AGG GTG CG BHQ-3'. La PCR può essere effettuata utilizzando kit commerciali seguendo le istruzioni del produttore. Il grafico di amplificazione della PCR è monitorato in tempo reale dal sistema di rilevamento.

## Gestione

Attualmente, non esiste un singolo metodo efficace per il controllo del Mal Secco. Le strategie comuni di controllo si basano sull'applicazione di buone pratiche agronomiche, tra cui la riduzione dell'inoculo fungino mediante la potatura di rami sintomatici, in particolare germogli appassiti che portano picnidi, e la rimozione tempestiva dei polloni del portainnesto. Vengono anche effettuate nebulizzazioni con fungicidi a base di rame autorizzati, specialmente su piante giovani provenienti da vivai (Abbate et al., 2019). Al fine di ridurre la contaminazione ambientale da fungicidi, un nuovo polimero superassorbente (SAP) si è dimostrato efficiente come mezzo per il rilascio controllato di rame nel trattamento dei tagli di potatura di rami di limone affetti dal mal secco (El boumlasy et al., 2022). Altre strategie ecologicamente sicure per la gestione del Mal Secco sono state perseguite attraverso la selezione di accessioni tolleranti all'infezione (Migheli et al., 2009). In base a ciò, sulla costa ionica della Sicilia (Italia), la varietà tradizionale 'Femminello' è stata nel passato sostituita con le cultivar 'Monachello' e 'Interdonato', due ibridi spontanei tra limone e cedro. Quest'ultima specie è altamente resistente ma produce frutti di qualità inferiore e con una minore resa (Catalano et al., 2021; Migheli et al. 2009).



## Bibliografia

1. Abbate L, Mercati F, Fatta Del Bosco S (2019) An overview on citrus Mal Secco disease: approaches and strategies to select tolerant genotypes in *C. limon*. *Crop Breed Genet Genom* 1:e190018. <https://doi.org/10.20900/cbagg20190018>
2. Balmas V, Scherm B, Ghignone S, Salem AOM, Cacciola SO & Migheli Q (2005) Characterization of *Phoma tracheiphila* by RAPDPCR, microsatellite-primed PCR and ITS rDNA sequencing and development of specific primers for in planta PCR detection. *Eur J Plant Pathol* 111, 235–247.
3. Demontis MA, Cacciola SO, Orru M, Balmas VC, Maserti E, Mascia L et al. (2008) Development of real-time PCR based on SYBR® Green I and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of *Phoma tracheiphila* in infected Citrus. *Eur J Plant Pathol* 120, 339–351.
4. El Boumlasy S, La Spada F, Pane A, Licciardello A, Debdoubi A, Tuccitto N, Cacciola SO, (2022) A super absorbent polymer containing copper to control *Plenodomus tracheiphilus* the causative agent of Mal Secco disease of lemon. *Front Microbiol* 13:987056. doi:10.3389/fmicb.2022.987056
5. EPPO (2015) PM7/048 (3) *Plenodomus tracheiphilus* (formerly *Phoma tracheiphila*). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 46: 183-192. <https://doi.org/10.1111/epp.12218>
6. Gentile A, Deng ZN, Tribulato E, Albanese GR (2000) Evaluation of lemon somaclones for tolerance to Mal Secco disease by artificial inoculation. *Acta Hort* 535(535):259-263. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2000.535.32>
7. Magnano di San Lio G, Cacciola SO, Pane A & Grasso S (1992) Relationship between xylem colonization and symptom expression in mal secco infected sour orange seedlings. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 2, 873–876.
8. Migheli Q, Cacciola SO, Balmas V, Pane A, Ezra D, Magnano di San Lio G (2009) Mal Secco disease caused by *Phoma tracheiphila*: A potential threat to lemon production worldwide. *Plant Dis* 93(9):852–867.
9. Nigro F, Ippolito A, Salerno MG (2011) Mal Secco disease of citrus: A Journey through a century of research. *J Plant Pathol* 193(3):523–560.
10. Nigro F, Ippolito A, Salerno MG (2015) Searching for citrus rootstocks resistant to Mal Secco disease: A review. *Acta Hort* 1065:987–992.
11. Russo R, Caruso M, Arlotta C, Lo Piero AR, Nicolosi E, Di Silvestro S (2020) Identification of field tolerance and resistance to Mal Secco disease in a citrus germplasm collection in Sicily. *Agron* 10(11):1806. <https://doi.org/10.3390/AGRONY10111806>



## Olive tree dieback - Dépérissement de l'olivier - Deperimento dell'olivo *Pleurostoma richardsiae*

Il deperimento dell'olivo causato da *Pleurostoma richardsiae* (famiglia *Pleurostomataceae*) è un decadimento generalizzato della pianta d'olivo (*Olea europaea* L.) segnalato in Brasile, Croazia e Italia (Canale et al., 2019, Carlucci et al., 2013, Ivic et al., 2018); recentemente, questa sindrome è stata segnalata anche nel nord e nel centro della Tunisia.

La sindrome è caratterizzata da bruciature fogliari e caduta delle foglie, appassimento delle gemme apicali, secchezza dei rami e delle branche, e striature brune al di sotto della corteccia del fusto, delle branche e dei rami.

### Diagnosi

#### In campo - sintomi e segni

I sintomi sono non specifici. La sindrome inizia con bruciature fogliari e caduta delle foglie, appassimento delle gemme apicali, secchezza dei rami e delle branche, e striature brune sotto la corteccia del tronco, delle branche e dei rami simili a quelle prodotte dalla verticillosi (Canale et al., 2019; Carlucci et al., 2013) (**Figura 1**). Successivamente, le decolorazioni della corteccia evolvono in cancri.



**Figura 1** Caratteristiche dei sintomi di depressione associati a patogeni fungini negli olivi in Tunisia. Sintomi gravi di secchezza dei rami dell'olivo e decolorazione del legno che evolve in cancri.

#### In laboratorio - isolamento, caratteristiche delle colture e identificazione molecolare del patogeno

L'isolamento del patogeno può essere effettuato direttamente da tessuti necrotici. Per l'isolamento, frammenti (4-5 mm) di legno necrotico devono essere sterilizzati in superficie (soluzione di NaClO al 1% per 2 minuti, etanolo al 70% per 30 secondi), lavati due volte con acqua distillata sterile, piastrati

su agar di farina d'avena (OMA) e incubati a 25 °C per 21 giorni. Dopo l'incubazione, le colonie di *Pleurostoma richardsiae* su OMA sono caratterizzate da un aspetto lanuginoso biancastro al centro, con riduzione delle ife aeree che si estendono fino al margine della colonia grigia e leggermente irregolare. Questo tipo di colonie produce conidi sferici sottili a parete bruna e fialidi.

L'identità del patogeno viene confermata tramite PCR tradizionale mirata all'amplificazione dell'Internal Transcriber Spacer region (ITS1-5.8S-ITS2) e di una porzione della  $\beta$ -tubulina (BT2); le amplificazioni dei due geni possono essere effettuate utilizzando rispettivamente le copie di primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) e T1 (5'-AACATCCGTGAGATTGTAAGT-3') (O'Donnell et al., 1997) / Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (Glass et al., 1995).



## Bibliografia

1. Carlucci, A., Raimondo, M., Cibelli, F., Phillips, A., and Lops, F. 2013. *Pleurostomophora richardsiae*, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with a decline of olives in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*. 52:517-527.
2. Canale, M. C., Nunes Nesi, C., Falkenbach, B. R., Hunhoff Da Silva, C. A., and Brugnara, E. C. 2019. *Pleurostomophora richardsiae* associated with olive tree and grapevine decline in southern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea*. 58:201-205.
3. Glass, N.L., Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied Environmental Microbiology*. 61:1323-1330.
4. Ivic, D., Tomic, Z., & Godena, S. 2018. First report of *Pleurostomophora richardsiae* causing branch dieback and collar rot of olive in Istria, Croatia. *Plant Disease*. 102(12), 2648-2648.
5. O'Donnell K, Cigelnik E. 1997. Two different intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 7:103-116.
6. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (San Diego, CA: Academic Press Inc), 315-322.

# Informazioni generali su PROMETEO

## Beneficiario principale

Università degli Studi di Catania (UNICT)

## Partner

**P2:** Université de Tunis El Manar (UTM)

**P3:** Centre Technique des Agrumes (CTA)

**P4:** Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT)

**P5:** Agence Nationale de Promotion de la Recherche scientifique (ANPR)

**P6:** Comune di Palazzolo Acreide (PALAZZOLO)

**P7:** Centro di Ricerca per l'Innovazione e Diffusione della conoscenza (CERID)

**P8:** Expergreen S.R.L. (EXPERGREEN)

## IL PROGETTO PROMETEO IN CIFRE

Durata	<b>24 mesi</b>
Avvio del progetto	<b>29/10/2021</b>
Completamento	<b>28/10/2023</b>
Partner di progetto	<b>8</b>
Budget totale	<b>1.459.103,08 €</b>
Contributo UE	<b>1.291.659,13 €</b>

## LE ATTIVITÀ DEL PROGETTO PROMETEO

Numero eventi di diffusione e incontri tematici realizzati	<b>5</b>
Partecipanti coinvolti	<b>450+</b>
Sito web di progetto	<b>1</b>
Canali social	<b>4</b>

## I NOSTRI CONTATTI

**Sito del progetto:** <https://www.prometeo-italietunisie.eu>

**Indirizzo e-mail:** [info@prometeo-italietunisie.eu](mailto:info@prometeo-italietunisie.eu)

**Facebook:** <https://www.facebook.com/Prometeo.ItalieTunisie>

**Instagram:** [https://www.instagram.com/prometeo\\_italietunisie/](https://www.instagram.com/prometeo_italietunisie/)

**Twitter:** [https://twitter.com/prometeo\\_ItaTun](https://twitter.com/prometeo_ItaTun)

**Youtube:** <https://www.youtube.com/@prometeoitalietunisie4919>



Questo documento è stato creato e mantenuto con il supporto finanziario dell'Unione Europea nell'ambito del Programma ENI di Cooperazione Transfrontaliera (CT) "Italia-Tunisia" 2014-2020. Il suo contenuto è di esclusiva responsabilità del CERID e non riflette necessariamente le opinioni dell'Unione Europea e/o dell'Autorità di Gestione.