

## ***Botrytis cinerea***

**(Muffa grigia del girasole)**

### **Generalità e procedura di analisi delle sementi**

*Mauro Dal Prà, Alessandro Romano, Romana Bravi*



**Laboratorio CREA-DC sede di Lonigo**

**Patogeno:** *Botrytis cinerea* Pers. ex Pers. (Perfect state *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, syn. *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuckel.)

**Pianta ospite :** *Helianthus annus* L.

L'agente patogeno che causa la cosiddetta muffa grigia è rappresentato dal fungo *Botrytis cinerea* un ascomicete appartenente alla famiglia delle Sclerotinaceae diffuso generalmente nella sua forma asessuata o anamorfa. Esiste anche una forma sessuata, o teleomorfa, piuttosto rara in natura, che prende il nome di *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel.

Si tratta di un organismo ubiquitario e patogeno facoltativo presente su un elevato numero di ospiti che include la maggior parte delle piante ornamentali, specie fruttifere ed erbacee. Esso è inoltre in grado di colpire parti di pianta senescenti o in via di decomposizione.

Relativamente al girasole (*Helianthus annuus* L.), la fitopatia assume un'importanza rilevante per il comparto sementiero, in quanto, essendo anche trasmissibile per seme, potrebbe determinare sin dalle prime fasi dell'impianto una consistente perdita di produzione nelle colture originatesi da seme infetto destinate all'alimentazione umana e animale e alla produzione di olio.

## Epidemiologia

Il fungo sverna nel suolo sotto forma di sclerozi o come micelio su residui di piante infette. Gli sclerozi, che costituiscono l'inoculo primario, sono un mezzo di sopravvivenza per il fungo in quanto protetti da disseccamento, raggi UV e attacchi micobici grazie ad un involucro melaninico e alla presenza di glucani che avvolgono il micelio interno. Dalla germinazione degli sclerozi si forma il micelio, dal quale si originano conidi che rilasciati dai conidiofori potranno colonizzare sia tessuti morti sia parti viventi delle piante. I conidi sono diffusi dal vento e dagli schizzi d'acqua e, per riuscire a penetrare all'interno dell'ospite, necessitano della presenza di ferite o tessuti senescenti.

In girasole, oltre alle piante debilitate, i fiori senescenti sono gli organi più predisposti all'infezione. Data l'elevata varietà di piante ospiti sulle quali il fungo può svilupparsi, gli inoculi su girasole possono provenire da diverse altre specie coltivate o spontanee. Anche i semi rappresentano una sorgente primaria di inoculo.

La produzione e disseminazione dell'inoculo sono modulate dalle fluttuazioni di temperatura e umidità. Condizioni predisponenti le infezioni sono rappresentate da temperature pari a 15-25°C e umidità relativa del 90%, spesso accompagnata da una elevata piovosità. Nelle zone temperate queste condizioni si trovano, normalmente, a inizio primavera. In condizioni ottimali il fungo può ripetere diversi cicli, con rilascio di nuovi conidi ogni 5-7 giorni.

Raramente condizioni ambientali sfavorevoli possono indurre il ciclo sessuale con produzione di apoteci (corpi fruttiferi) portanti gli aschi con otto ascospore al loro interno. Al ritorno delle condizioni favorevoli, si tornerà nuovamente al ciclo asessuale, con produzione di conidi dagli sclerozi.

**pag. 1**

## Sintomi

I primi sintomi della muffa grigia su girasole appaiono come macchie rigonfiate nella parte inferiore della calatide. In caso di pioggia o elevata umidità atmosferica, queste lesioni tendono a essere ricoperte da conidi che conferiscono il caratteristico colore grigio (Figura 2). Possono anche essere presenti deformazioni a carico delle foglie. I tessuti infetti tenderanno nel tempo ad imbrunire, ad assumere una consistenza molle e infine disseccare.

In caso di infezioni precoci associate ad elevata umidità, il fungo può formare piccoli sclerozi di colore nero tra i semi e sulla superficie di essi (Figura 2). I semi infetti sono caratterizzati dalla presenza di micelio grigio sulla loro superficie e da lacerazioni sul pericarpo, che tenderà a separarsi dal seme ("mandorla"), il quale apparirà di colore bruno per la presenza del parassita. L'indice di acidità dei semi infetti assumerà valori più elevati rispetto a quello di semi sani. Particolari condizioni climatiche possono permettere al fungo di infettare i piccioli e diffondersi sugli steli con formazione di lesioni la cui lunghezza può anche arrivare a 10 cm.



Figura 2: Sintomi di muffa grigia su calatide di girasole



Figura 2: Sviluppo dell'infezione sui semi. Fonte: Biddle and Cattlin, 2007

## Difesa

Per il controllo della botrite su girasole, possono essere applicate appropriate tecniche colturali accoppiate a trattamenti fungicidi.

Dal momento che le spore si formano rapidamente sui tessuti delle piante infette, risulterà fondamentale l'eliminazione delle stesse. Al fine di non creare condizioni ambientali favorevoli al fungo, risulterà importante evitare la bagnatura delle piante tramite irrigazione, soprattutto prima della fioritura, o irrigare la mattina presto in modo da favorire l'asciugatura nelle ore successive. Una maggiore spaziatura tra le piante ridurrebbe l'umidità relativa all'interno della coltura.

Altre pratiche prevedono l'adozione di rotazioni culturali, l'eliminazione di piante di girasole selvatico, e la semina in suoli ben drenati. Sebbene siano disponibili ibridi resistenti alla muffa grigia, il patogeno tende a formare nuove razze in grado di infettare anche varietà resistenti. Il controllo chimico prevede l'uso di fungicidi ad alta persistenza. L'uso di seme certificato e trattato risulta di fondamentale importanza al fine di prevenire lo sviluppo del patogeno nella coltura già al momento della semina.

## **Aspetti normativi**

La direttiva 2002/57/CE del Consiglio del 13/06/2002, relativa alla commercializzazione delle sementi di piante oleaginose e da fibra, recepita in Italia dal DPR 08/10/1973 n. 1065 e successive modifiche e integrazioni, e modificata dalla direttiva di esecuzione (UE) 2020/177 della Commissione dell'11 febbraio 2020, include, tra gli Organismi Regolamentati Non da Quarantena (ORNQ), il fungo *Botrytis cinerea* de Bary (allegato II, parte I, punto 5). Il Decreto Legislativo n.20 del 2 febbraio 2021, (Norme per la produzione a scopo di commercializzazione e la commercializzazione di prodotti sementieri), in adeguamento della normativa nazionale al Regolamento (UE) 2016/2031 e Regolamento (UE) 2017/625, prevede una soglia di tolleranza per le sementi di girasole, relativa alla *Botrytis cinerea* de Bary (ORNQ), pari al 5% di semi infetti per tutte le categorie di sementi di girasole. Pertanto, ai fini della commercializzazione delle sementi di soia, è necessario verificare tramite specifiche analisi di laboratorio, la presenza del suddetto ORNQ per garantire il soddisfacimento dei requisiti fitosanitaria previsti dalla normativa vigente.

## **Analisi di laboratorio**

Il metodo di analisi si basa sul protocollo dell'International Seed Testing Association (ISTA) n. 7-003 "Detection of *Botrytis cinerea* in *Helianthus annuus* (sunflower) seed" del 2022. Il protocollo attualmente in vigore è la versione 2.3. Il protocollo modifica sostanzialmente le indicazioni contenute nella procedura di prova pubblicata in Gazzetta Ufficiale Italiana nel Decreto Ministeriale del 22 dicembre 1992. Le modifiche riguardano in particolar modo la riduzione dei tempi di incubazione e l'eliminazione dell'estratto di malto come substrato di crescita. Queste misure si sono rese necessarie al fine di limitare il proliferare di organismi saprofiti che potrebbe portare a problemi di sovrastima di *Botrytis cinerea*.

## **Preparazione campione di analisi**

L'analisi per la ricerca di *Botrytis cinerea* viene condotta su 400 semi prelevati in laboratorio dal campione medio finale di prelevamento, tramite rimescolamento dei semi e riduzione del campione stesso. Poiché i principali formulati utilizzati a livello industriale per la concia delle sementi di girasole

**pag. 3**

sono fungicidi ad azione specifica contro gli oomiceti ed in particolare *Plasmopora halstedii* (peronospora del girasole) e non è comprovata alcuna attività inibitoria nei confronti di *Botrytis cinerea*, è stato deciso di estendere la validità dell'analisi anche alla semente conciata. Il protocollo di lavoro non prevede una fase di sterilizzazione superficiale del seme, poiché tale trattamento potrebbe interferire con l'isolamento e l'identificazione di *Botrytis cinerea* e portare ad una sottostima della percentuale di semi infetti.

### Preparazione delle piastre

La prova viene condotta su carta, secondo una tecnica comunemente denominata "blotter test". A tal fine dischi di carta da filtro da 140 mm di diametro vengono prima sterilizzati in stufa a secco a 105°C e poi vengono posti sotto cappa sterile in piastre Petri sterili da 150 mm di diametro, nel numero di 1 filtro per ogni piastra. Sempre lavorando sotto cappa, ogni filtro viene imbibito con 10 ml di acqua bidistillata sterile (Figura 3). Particolare cura deve essere riposta nel rimuovere con una spatola sterile le bolle d'aria presenti sotto al filtro (Figura 4).

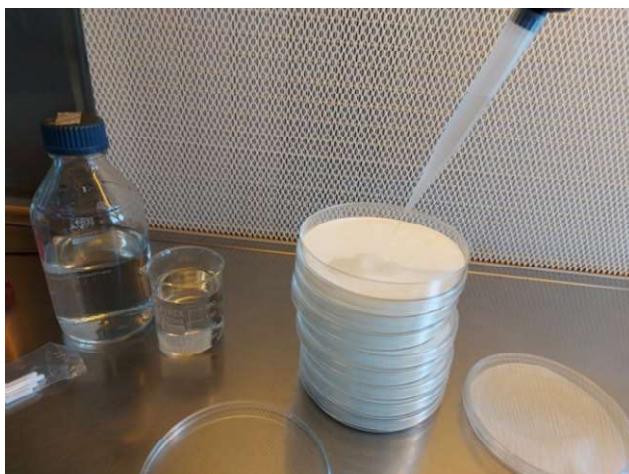


Figura 3: Preparazione piastre per il blotter test

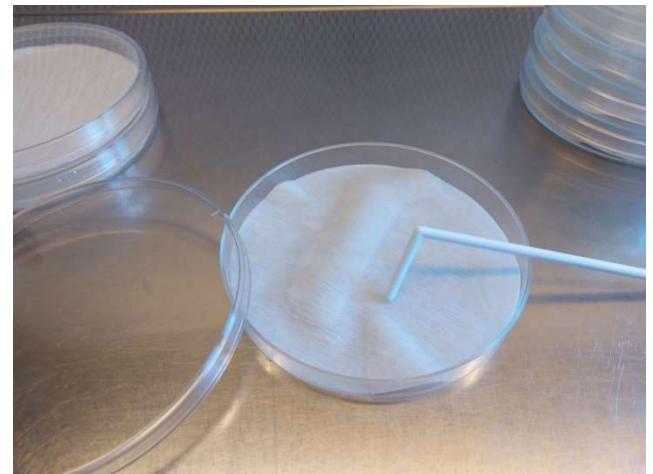


Figura 4: Rimozione delle bolle d'aria

### Semina in piastra ed incubazione

I semi di ogni campione vengono adagiati all'interno delle piastre Petri così preparate, in numero pari a 20 per piastra, avendo cura di mantenerli il più possibile distanziati tra loro (Figura 5). Le piastre, oltre ad essere singolarmente numerate, riportano anche il numero con cui il campione è stato registrato in laboratorio nonché la data indicante l'inizio dell'incubazione. Dopo aver posto i semi al loro interno, le piastre vengono disposte in pile da 10 e avvolte in pellicola trasparente in modo da prevenire un eventuale disseccamento. Le stesse vengono incubate al buio per 7 giorni a 20°C.



Figura 5: Semina su piastra Petri

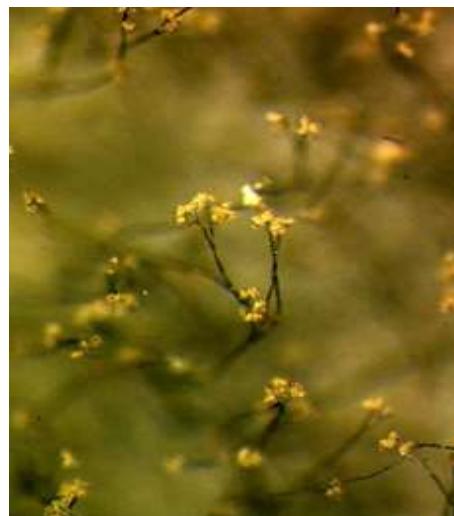


Figura 6: Ceppi di riferimento. (a) colonia che presenta abbondante produzione di conidi, (b) colonia che presenta produzione di sclerozi

### Valutazione morfologica del micelio fungino

Dopo 7 giorni di incubazione si osservano le piastre ad occhio nudo o con l'ausilio di uno stereomicroscopio. Per facilitare il riconoscimento del patogeno, sarà utile seminare anche un campione naturalmente infetto usato come riferimento, oppure utilizzare una coltura di riferimento mantenuta in piastra da 60 mm di diametro su terreno Potato Dextrose Agar (PDA) (Figura 6). Su terreno di coltura PDA le colonie di *Botrytis cinerea* possono talvolta produrre un micelio ricco di ife conidiofore (Figura 6a), mentre in altre occasioni possono produrre un micelio dove i conidi sono assenti ed abbondano invece gli sclerozi (Figura 6b). Proprio per questo motivo è consigliabile inoculare molte piastre con il ceppo di riferimento, in modo da essere sicuri che almeno una di queste presenti le ife conidiofore, considerate determinanti nel processo di identificazione.

I semi infetti presentano un marciume molle e sono ricoperti da un abbondante micelio grigio (Figura 7). Per il riconoscimento si rende necessaria la presenza di conidiazione, poiché spesso i marciumi molli possono essere dovuti anche alla presenza di saprofiti.

**Figura 7: Aspetto dei semi infetti****Figura 8: Visualizzazione allo stereomicroscopio delle ife conidiofore**

Quando osservate allo stereomicroscopio, le ife, di colore grigio scuro, presentano una tipica forma a nastro. I conidi sono disposti a grappoli sui conidiofori ramificati (Figura 8). I conidiofori possono essere normalmente individuati sulla superficie dei tegumenti, dei cotiledoni e delle radici. In genere la tipica conformazione delle ife conidiofore è sufficiente per giungere alla corretta identificazione dell'agente patogeno. Tuttavia, in determinate circostanze si può assistere, sui semi, alla proliferazione di saprofiti caratterizzati dall'abbondante produzione di conidi e/o dalla presenza di ife di colore scuro. In questi casi per evitare qualsiasi errore nell'identificazione delle colonie fungine, si rende necessaria l'osservazione al microscopio ottico. Durante l'osservazione su vetrino il micelio di *Botrytis cinerea* presenterà le caratteristiche ife a forma di nastro e i conidi ovoidali, ialini, formati da una singola cellula e di dimensioni pari a  $8-11 \times 6-19 \mu\text{m}$  (Figura 9).

Occasionalmente sulla superficie dei tegumenti, dei cotiledoni e delle radici può essere presente micelio di *Botrytis cinerea* non sporulante. In questo caso l'unico carattere distintivo è la presenza di ife con la tipica forma a nastro.

**Figura 9: Visualizzazione al microscopio ottico. a) ifa conidiofora. b) conidi ovoidali.**  
barra di scala = 20 um. **Fonte:** Ruvishika Shehali Jayawardena (2018)

## Espressione del risultato finale

I risultati di analisi vengono riportati su un'apposita scheda indicando il numero di semi infetti presenti all'interno di ogni piastra. La somma dei semi infetti di tutte le piastre del campione sul totale di 400 semi, espressa in valore percentuale, darà il valore finale. Alla luce delle attuali disposizioni legislative, un campione viene ritenuto positivo, e quindi non idoneo alla certificazione, quando il numero di semi infetti supera il 5%.

## Principali strumenti e materiale di laboratorio occorrenti

- Coltura di riferimento di *Botrytis cinerea* o campione riconosciuto come infetto
- Bottiglie Schott DuranTM da 500/1000 mL
- Carta da filtro da 140 mm di diametro
- Micropipetta a volume fisso da 10 mL con relativi puntali sterili
- Pinzette
- Piastre Petri monouso da 150 mm e da 60 mm di diametro
- Deionizzatore/distillatore acqua
- Autoclave
- Stufa a secco
- Frigorifero a 4°C
- Armadio termostatico a 20±2°C
- Cappa a flusso laminare orizzontale
- Sacchetti autoclavabili BioHazard per lo smaltimento delle piastre
- Stereomicroscopio
- Microscopio ottico

## Norme di laboratorio

Al fine di evitare contaminazioni incrociate tra i campioni di seme, nonché inquinamento da agenti esterni, sarà di fondamentale importanza provvedere alla disinfezione di tutte le superfici di lavoro e degli strumenti utilizzati tramite etanolo al 70%, sia prima che dopo la manipolazione del campione di seme, e utilizzare per ogni campione contenitori e materiali di consumo nuovi e/o sterilizzati in stufa a secco o in autoclave. La fase di preparazione delle capsule Petri rappresenta un punto critico relativamente al mantenimento della sterilità; risulterà fondamentale effettuare questa operazione nel più breve tempo possibile, lavorando sotto cappa sterile e con utilizzo di guanti da parte dell'operatore. Al termine di ogni sessione di lavoro, sarebbe opportuno sottoporre la cappa utilizzata a un trattamento con lampada UV germicida. Al termine delle analisi, dopo la lettura delle piastre, le stesse andranno smaltite in appositi raccoglitori previa inertizzazione in autoclave a 105 °C per 10 minuti.

## Preparazione terreno di coltura PDA

<b>Dosi per 800 mL di terreno</b>	
Potato Dextrose Agar (PDA)	31,2 g
H <sub>2</sub> O bidistillata	800 mL

- Per rinnovare il ceppo fungino di riferimento si è scelto di utilizzare il terreno di coltura PDA DIFCO™ commercializzato dalla ditta Becton Dickinson.
- Mettere in bottiglie Duran da 1 L la quantità prescritta di PDA in polvere assieme all'acqua bidistillata e agitare.
- Sterilizzare il terreno in autoclave a 121°C, 1 atm, per 20 minuti, in modo da avere una completa sterilizzazione.
- Una volta che il PDA è sciolto e sterilizzato, mantenere le bottiglie a temperatura ambiente per un tempo sufficiente ad arrivare a 50°C, al fine da poter procedere agevolmente con il riempimento delle capsule Petri e, nello stesso tempo, impedire la solidificazione dell'agar.
- Procedere con il riempimento delle capsule Petri (Ø 60 mm) versando circa 9 mL di PDA in ciascuna capsula, lasciando raffreddare per alcuni minuti prima di chiuderle e, preferibilmente, mantenendo le stesse a temperatura ambiente per 24 ore prima dell'uso o prima di essere conservate a 4-5°C. L'operazione deve essere eseguita sotto cappa sterile per limitare i rischi di contaminazione. In questa fase sarà importante non chiudere le piastre prima che il PDA sia adeguatamente raffreddato, così da evitare la formazione di condensa.

## Bibliografia

- Biddle, J.A. and Cattlin, N. 2007. Pests, Diseases and Disorders of Peas and Beans: A Colour Handbook, pp. 280. CRC press.
- Elad, Y.; Williamson, B.; Tudzynski, P. and Delen, N. (eds). 2007. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, pp. 428. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3>.
- EPPO Standards. Guidelines on Good Plant Protection Practice. Sunflower. 2000. European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris (France).
- Gazzetta ufficiale della Repubblica Italiana del 27 febbraio 2021. Decreto Legislativo n.20 del 2 febbraio 2021
- Gulya, T.J.; Mathew, F.; Harveson, R.; Markell, S. and Block, C. 2016. Diseases of Sunflower. In: McGovern R., Elmer W. (eds) *Handbook of Florists' Crops Diseases. Handbook of Plant Disease Management*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-32374-9\\_27-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32374-9_27-1).
- International Rules for Seed Testing. Validated Seed Health Testing Methods. 2022. 7-003: Detection of *Botrytis cinerea* in *Helianthus annuus* (sunflower) seed.
- Knodel, J. and Charlet, L. 2007. Pest Management. In: Sunflower Production. NDSU Extension Service. N.D. Agricultural Experiment Station. North Dakota State University.

Mancini, V.; Murolo, S. and Romanazzi G. 2015. Principali malattie del girasole. In: Giornata di studio “Le avversità parassitarie del girasole”. Osimo, 07 luglio 2015.

Tomioka, K. and Sato, T. 2011. Gray mold of yacon and sunflower caused by *Botrytis cinerea*. J Gen Plant Pathol, 77: 217-219.

Williamson, B.; Tudzynski, B.; Tudzynski, P. and van Kan, J. A. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Mol Plant Pathol., 8(5):561-80. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x. PMID: 20507522.

Jayawardena, R.; Zhang, W.; Li, XH.; Liu, M.; Hao, YY.; Zhao, WS.; Hyde, KD.; Liu, JH.; Yan, JY. 2018. Characterization of *Botrytis cinerea* causing grape bunch rot in Chinese Vineyards. Asian Journal of Mycology 1: 74-87. doi:10.5943/ajom/1/1/6.

#### **Immagini del frontespizio**

[https://www.pflanzenkrankheiten.ch/krankheiten-an-kulturpflanzen/sonnenblumen/botrytis-cinerea-sonnenblume#g\\_1\\_0](https://www.pflanzenkrankheiten.ch/krankheiten-an-kulturpflanzen/sonnenblumen/botrytis-cinerea-sonnenblume#g_1_0)

<https://www.vinoble.org/en/blog/botrytis-cinerea-noble-rot>

<https://agroflora.ru/seraya-gnil-tomata/>