RICERCA

Attacchi di *Stagonosporopsis trachelii* su *Campanula rapunculoides* in Italia

Domenico Bertetti* - Slavica Matić* - Incoronata Luongo - Maria Lodovica Gullino*,** - Angelo Garibaldi***

**Centro di Competenza per l'Innovazione in campo agro-ambientale AGROINNOVA – Università degli Studi di Torino - Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO).*

***DiSAFA, Università degli Studi di Torino - Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO).*

Riassunto

Durante il mese di settembre 2019, alcune piante di *Campanula rapunculoides* coltivate in vaso, presso un giardino privato in provincia di Biella e, in seguito, in una serra del Centro Agroinnova, situata in Grugliasco (TO), mostravano le alterazioni fogliari descritte in questa nota ed attribuite ad attacchi di *Stagonosporopsis trachelii*. Il parassita fungino agente della malattia era identificato in base alle sue caratteristiche morfologiche e tramite l'analisi della sequenza ITS (Internal Transcribed Spacer) e le analisi molecolari effettuate per i geni *act* (actina) e *tub2* (beta-tubulina) condotte su uno degli isolati. Viene riportata la bibliografia scientifica di *S. trachelii* inerente ad attacchi su specie appartenenti al genere *Campanula* e, infine, vengono fornite alcune indicazioni per prevenire e contenere la diffusione di questo parassita sul nuovo ospite. Questa è la prima volta che *S. trachelii* viene riportata su *C. rapunculoides* in Italia, così come nel resto d'Europa.

Parole chiave: piante ornamentali; campanula serpeggiante; campanula falso raponzolo; *Phoma trachelii*; *Ascochyta bohemica*.

Summary

First report of* Stagonosporopsis trachelii *on* Campanula rapunculoides *in Italy

During September 2019, some potted plants of Campanula rapunculoides *growing in a private garden located in Biella province (northern Italy) and later also in a greenhouse belonging to the Centre of Competence Agroinnova located in Grugliasco (Torino province, northern Italy), showed the leaf spots described in this note. The fungal causal agent of the disease was isolated from affected tissues and identified as* Stagonosporopsis trachelii *by the morphological characteristics observed* in vitro *and by the ITS (Internal Transcribed Spacer) analysis and the molecular analyses with primers for* tub2 *(beta-tubulin) and* act *(actin) genes. Moreover, the main reports of* S. trachelii *on hosts belonging to the genus* Campanula *are listed. Finally, some strategies to prevent and to control the pathogen on the new host are discussed. This is the first report of* S. trachelii *on* C. rapunculoides *in Italy, as well as in Europe.*

***Key words**: ornamentals; creeping bellflower;* Phoma trachelii; Ascochyta bohemica.

Introduzione

Tra le specie appartenenti al genere *Campanula* spontaneamente diffuse nella flora del nostro Paese (Pignatti, 1982), *Campanula rapunculoides* L. (anche nota con i nomi volgari di campanula serpeggiante e campanula falso raponzolo) possiede buone caratteristiche ornamentali che la rendono adatta per la produzione di fiore reciso e per la realizzazione di bordure miste (Scariot e Devecchi, 2010). In questa nota è descritta una malattia osservata, di recente, su piante di questa specie, coltivate in due luoghi del Piemonte.

Sintomi riscontrati ed identificazione del parassita

Durante il mese di settembre 2019, circa 20 piante di *C. rapunculoides* di 5-6 mesi di età, coltivate in vasi di plastica (diam. 17 cm) presso un giardino privato in provincia di Biella (BI), presentavano le alterazioni di seguito descritte. In ottobre, uguali sintomi comparivano anche su piante della stessa specie, coltivate presso una serra di Agroinnova, in Grugliasco (TO). Inizialmente, le foglie colpite recavano necrosi marroni irregolarmente circolari, di 3-6 mm di diametro che, successivamente, si estendevano a buona parte del lembo (Figura 1). Le necrosi erano accompagnate da clorosi fogliari e causavano il disseccamento delle

Figura 1 - Necrosi fogliari causate da *Stagonosporopsis trachelii* su *Campanula rapunculoides*.
Figure 1 - Leaf spots caused by Stagonosporopsis trachelii *on* Campanula rapunculoides.

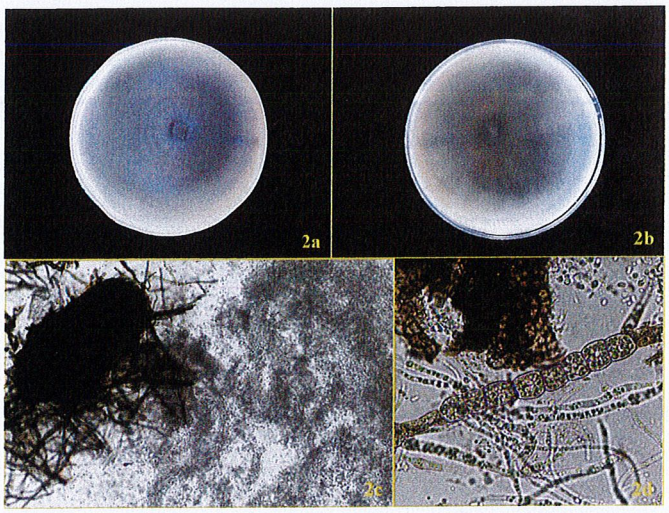

Figura 2 - *Stagonosporopsis trachelii* isolata da foglie di *Campanula rapunculoides* e coltivata su substrato OA (Oat, Agar): lato superiore della colonia (2a); lato inferiore della colonia (2b); picnidi e conidi (2c); clamidospore (2d).
Figure 2 - Stagonosporopsis trachelii *isolated from affected leaves of* Campanula rapunculoides *and grown on OA (Oat, Agar) medium: front of the colony (2a); reverse side of the colony (2b); pycnidia and conidia (2c); chlamydospores (2d).*

foglie colpite. Gli isolamenti erano effettuati da foglie sintomatiche che venivano accuratamente lavate in acqua sterile. Numerosi frammenti di tessuto erano prelevati dai margini delle necrosi e distribuiti su substrato PDA (Potato Dextrose Agar) a cui era aggiunto solfato di streptomicina (25 mg/l). Da essi si sviluppavano numerose colonie fungine che, giunte a maturità, assumevano colore verde olivaceo chiaro. Gli stessi isolati, coltivati in purezza su terreno OA (Oat, Agar) (Narayanasamy, 2011), formavano colonie prima di colore verde chiaro, poi verde olivaceo, a partire dalla parte centrale (Figure 2a, 2b) che, dopo circa 22 giorni di coltivazione ad una temperatura variabile da 21 a 24°C, in alternanza luce/buio (10h/14h), producevano picnidi di forma sferoidale, a volte confluenti, con diametri variabili da 166 a 296 (media: 217) µm. I picnidi liberavano numerosi conidi che apparivano unicellulari, di forma ellittica, con dimensioni di 2,8 – 8,2 × 1,1 – 2,4 (media: 3,7 × 1,6) µm (Figura 2c). Sulle colture più vecchie era possibile osservare clamidospore di 7,7 – 21,0 × 6,9-12,4 (media: 12,2 × 9,5) µm, asettate, intercalari, brune, globose o ellissoidi, disposte in catenelle (Figura 2d). Queste caratteristiche morfologiche erano simili a quelle riportate per *Stagonosporopsis trachelii* (Allesch.) Aveskamp, Gruyter & Verkley (Zhang *et al.*, 2019).
Uno degli isolati ottenuti (DB19OTT01) era coltivato su PDA per estrarre il DNA dal suo micelio, utilizzando il Nucleospin Plant kit (Macherey Nagel). In seguito, sul DNA estratto veniva effettuata una reazione di PCR, con i primers ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990), *tub2* (Woudenberg *et al.*, 2009) e *act* (Carbone e Kohn, 1999). Dal sequenziamento ottenuto, si acquisivano tre sequenze di 525 (ITS), 333 (*tub2*) e 216 (*act*) paia di basi (Gene Bank accession numbers MN732904, MT013364, MT013365, rispettivamente). Queste erano analizzate con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) (E = 0) e identificavano l'isolato da *C. rapunculoides* come *Stagonosporopsis trachelii* (Allesch.) Aveskamp, Gruyter & Verkley (Sin.: *Phoma trachelii* Allesch. e *Ascochyta bohemica* Kabát & Bubák.). L'identificazione molecolare ottenuta coincide con quanto riportato per *P. trachelii* (Boerema, 2004).

Inoculazione artificiale e riproduzione dei sintomi
Per riprodurre i sintomi osservati e descritti su *C. rapunculoides*, l'isolato DB19OTT01 era coltivato in purezza su OA ed inoculato su tre piante apparentemente sane, di circa 6 mesi, dello stesso ospite. Le foglie delle piante inoculate erano irrorate con una sospensione conidica, alla concentrazione di 1×10^5 CFU/ml. Tre piante testimone erano irrorate con sola acqua sterile. Tutte le piante erano subito chiuse in camera umida (mantenuta per 5 giorni) ed allevate in serra, dove la temperatura variava da 19 a 28°C. Circa 5 giorni dopo l'inoculazione artificiale, avveniva la comparsa delle prime necrosi fogliari. Successivamente, queste si ampliavano, riproducendo i sintomi descritti. Da esse veniva reisolato lo stesso parassita inoculato, soddisfacendo i postulati di Koch. Le piante testimone restavano invece asintomatiche.

Conclusioni
Phoma trachelii, poi ricondotta a *Stagonosporopsis trachelii* da Aveskamp *et al.* (2010), venne segnalata su *Campanula medium*, in Danimarca (Neergaard, 1949) e su *C. trachelium*, in Polonia (Mulenko *et al.*, 2008), mentre, in Italia, *Phoma* sp. è stata identificata quale agente di necrosi fogliari su *C. lactiflora* (Garibaldi *et al.*, 2010). Su ospiti del genere *Campanula* vengono anche riportate *Phoma herbarum* (Kinsey, 2002a) e *Phoma leveillei* (Kinsey, 2002b). *Ascochyta bohemica*, anch'essa considerata sinonimo di *S. trachelii*, fu identificata su numerosi ospiti appartenenti a specie diverse del genere *Campanula*: su *C. medium*, in Argentina (Lindquist, 1941); su *C. betulaefolia*, *C. raineri* e *C. medium*, in Inghilterra (Moore, 1940; Moore, 1947); su *C. isophylla* in Germania (Sauthoff, 1962); su *C. medium*, *C. alliariifolia*, *C. grossey* e *C. pyramidalis*, nella ex Unione Sovietica (Mel'nik, 1973); su *C. americana*, *Campanula* sp. (Farr *et al.*, 1989) e *C. rapunculoides* (Greene, 1948), negli Stati Uniti. Lo stesso parassita venne segnalato anche nel nostro Paese, su *C. isophylla* (Garibaldi e Gullino, 1973). *Stagonosporopsis trachelii* è stata segnalata su *C. isophylla*, in Olanda e Svezia (Aveskamp *et al.* 2010) e, più recentemente, su *C. medium* (Garibaldi *et al.*, 2015) e *C. trachelium* (Garibaldi *et al.*, 2017), entrambi in Italia. Infine, è opportuno citare che questo parassita, finora identificato solo su Campanulaceae (Farr e Rossman, 2019), è stato recentemente riportato su *Scrophularia ningpoensis*, famiglia Scrophulariaceae, in Cina (Zhang *et al.*, 2019). *S. trachelii* viene qui segnalata per la prima volta su *C. rapunculoides* nel nostro Paese, così come nel resto d'Europa.
L'utilizzo di irrigazione per micro-portata a goccia, la buona aerazione degli ambienti di coltivazione, il corretto sesto di impianto in fase di coltivazione e di messa a dimora in giardino, le concimazioni equilibrate costituiscono le

misure di base per una corretta prevenzione. Sempre in fase preventiva, occorrerebbe saggiare l'efficacia dei prodotti rameici registrati su floricole e ornamentali.

Ringraziamenti

Lavoro finanziato con fondi dell'Università di Torino (progetto ex 60% "Sviluppo e applicazione di tecniche di diagnostica fitopatologica applicate alla filiera agroalimentare").

Lavori citati

Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997) – Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programme. Nucleic Acids Research, 25, 3389-3402.

Aveskamp M. M., de Gruyter J., Woudenberg J. H. C., Verkley G. J. M., Crous P. W. (2010) – Highlights of the *Didymellaceae*: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. Studies in Mycology, 65, 1-60.

Boerema G. H., de Gruyter J., Noordeloos M. E., Hamers M. E. C. (2004) - *Phoma* Identification Manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI Publishing, Wallingford, UK, 448 pp.

Carbone I., Kohn L. M. (1999) - A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia, 91, 553-556.

Farr D. F., Bills G. F., Chamuris G. P., Rossman A. Y. (1989) - Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press, St. Paul, Minnesota, Stati Uniti, 1252 pp.

Farr D. F., Rossman A. Y. (2019) - Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved November 12, 2019, https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/

Garibaldi A., Bertetti D., Pellegrino C., Gullino M. L. (2010) - First report of leaf spot of milky bellflower (*Campanula lactiflora*) caused by a *Phoma* sp. in Italy. Plant Disease, 94, 638.

Garibaldi A., Bertetti D., Ortu G., Gullino M. L. (2015) - A Leaf Spot caused by *Stagonosporopsis trachelii* on *Campanula medium* in Italy. Journal of Plant Pathology, 97 (3), 546.

Garibaldi A., Bertetti D., Matić S., Gullino M. L. (2017) - A Leaf Spot caused by *Stagonosporopsis trachelii* on *Campanula trachelium* in Italy. Journal of Plant Pathology, 99 (2), 540.

Garibaldi A., Gullino G. (1973) – Malattie nuove o poco note delle piante da fiore e ornamentali in Italia. Notiziario sulle Malattie delle Piante, 88/89, 53-71.

Greene H. C. (1948) - Notes on Wisconsin parasitic fungi. X. American Midland Naturalist 39, 444-456.

Kinsey G. C. (2002a) - *Phoma herbarum*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 151, Sheet 1501.

Kinsey G. C. (2002b) - *Phoma leveillei*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 151, Sheet 1502.

Lindquist J. C. (1941) – New micromycetes for the Argentine flora. Darwiniana, B. Aires, 5, 241-247.

Mel'nik V. A. (1973) – Comparative morphological and cultural studies on the causal agents of ascochytoses of bellflower and delphinium. Mikologiya I Fitopatologiya, 7 (2), 142-143.

Moore W. C. (1940) – New and interesting plant diseases. Transactions of the British Mycological Society, 24 (1), 59-63.

Moore W. C. (1947) – British fungi. Transactions of the British Mycological Society, 31 (1-2), 86-91.

Mulenko W., Majewski T., Ruszkiewicz-Michalska M. (2008) - A Preliminary Checklist of Micromycetes in Poland. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences 9, 752.

Narayanasamy P. (2011) - Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Fungal Pathogens, Vol.1. Springer, Dordrecht, 291 pp.

Neergaard P. (1950) – Fourteenth annual report from the J. E. Ohlsen phytopathological laboratory 1st August, 1948 to 31st July, 1949.

Pignatti S. (1982) - Flora d'Italia, 3 voll. Edagricole, Bologna.

Sauthoff W. (1962) – *Ascochyta bohemica* Kab. et Bub. als Erreger einer Blattfleckenkrankheit an *Campanula isophylla* Moretti. Phytopathologische Zeitschrift 45, 160–168.

Scariot V., DeVecchi M. (2010) - *Campanula* spp. In: Specie spontanee in colture florovivaistiche produttive. Revflor, 310 pp.

Zhang C., Qian Y., Zheng X., Zhou Y., Xiong Q. (2019) - *Stagonosporopsis trachelii* causes leaf spot on Ningpo Figwort (*Scrophularia ningpoensis*) in China. Australasian Plant Disease Notes, 14: 12. https://doi.org/10.1007/s13314-019-0343-8

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. (1990) - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications, Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. Editors, Academic Press, San Diego, California, USA, 315-322.

Woudenberg J. H. C., Aveskamp M. M., Gruyter de J., Spiers A. G., Crous P. W. (2009) - Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. Persoonia 22, 56-62.