

Attacchi di *Alternaria alternata* su *Campanula medium* L. in Italia

Giovanna Gilardi* - Sara Franco Ortega* - Maria Lodovica Gullino*,** - Angelo Garibaldi*

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

** Dipartimento di Scienze Agrarie, forestali e Alimentari DISAFA - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

Riassunto

Durante l'estate 2015 sono state osservate alterazioni fogliari a carico di piante di *Campanula medium* L. in un giardino situato a 850 metri di altezza in provincia di Biella. I sintomi osservati a carico delle foglie, consistevano in aree necrotiche a sviluppo irregolare, spesso interessanti i margini delle foglie e a rapido sviluppo. Le foglie colpite gravemente disseccavano. Dagli isolamenti effettuati veniva ottenuto un fungo mostrante le caratteristiche di un *Alternaria* sp.. Tale osservazione veniva confermata mediante l'amplificazione della regione ITS1-5.8-ITS2 e del gene β tubulina 2 consentendo di identificare il patogeno come *Alternaria alternata*. Questa è la prima segnalazione di *A. alternata* su *C. medium* in Italia e nel mondo.

Parole chiave: ornamentali; necrosi fogliari; patogeni fogliari.

Abstract

Presence of *Alternaria alternata* on *Campanula medium* L. in Italy

In the summer 2015, Canterbury bells (*Campanula medium* L.) plants grown in a garden in northern Italy showed symptoms of a leaf spot. Affected plants showed black-brown leaf spot normally circular, usually surrounded by a yellow halo, frequently located on the tips and margins of leaves. At later stages, leaves may turn brown and die. A fungus showing the morphologically characteristic of *Alternaria* was consistently isolated from the leaf tissues of symptomatic plants. The pathogen was identified as *Alternaria alternata* by the PCR analysis of the beta-tubulin 2 gene (*TUB2*) between exons 2 and 6 performed with the primers T1 and β 2b. This is the first report of *A. alternata* on *C. medium* in Italy as well as in the world.

Key words: ornamental plants; leaf spot; Canterbury bells; foliar pathogens.

Introduzione

Tra le numerose specie di *Campanula*, diffusa allo stato spontaneo nella flora italiana (Pignatti, 1982) si trova la *C. medium*, apprezzata per la produzione di fiori di notevole dimensione e per l'aspetto gradevole, fattori che la rendono assai interessante per la coltivazione in giardino in aiuole e bordure e come produttrice di fiori recisi.

Su questa specie nel corso dell'estate 2015 è stata osservata in Piemonte una nuova malattia che viene descritta in questa nota.

Sintomi e identificazione

Nel corso dell'estate 2015, in un periodo caldo e relativamente umido, numerose piante (circa il 30% di un centinaio coltivate) di *C. medium* di uno o due anni di età allevate in vaso in un giardino situato a 850 metri di altezza nel biellese presentavano le alterazioni descritte qui di seguito. Le foglie delle piante presentavano ampie necrosi interessanti tutta la lamina fogliare



Figura 1 – Necrosi sulla lamina fogliare di piante di *Campanula medium* causate da *Alternaria alternata*.

Figure 1 – Black-brown leaf spots caused by *Alternaria alternata* on *Campanula medium*.

di colore nerastro delimitate da un contorno netto (Fig. 1). Tali alterazioni erano seguite da estesi disseccamenti fogliari che potevano portare a morte l'intera pianta (Fig. 2). La malattia era più grave nel caso di piante allevate in zone in ombra e nei periodi caratterizzati da piogge ripetute.

In laboratorio si è proceduto all'isolamento in purezza del patogeno a partire da numerose foglie con sintomi, precedentemente lavate per un minuto in acqua sterile addizionata con l'1% di ipoclorito di sodio e abbondantemente risciacquate. Dai margini delle aree necrotiche erano effettuati isolamenti utilizzando Potato Dextrose Agar (PDA) addizionato di solfato di streptomina (25 mg/l). Da essi si sviluppavano in modo costante colonie fungine caratterizzate da micelio in un primo tempo grigio chiaro e poi virante al grigio scuro. L'isolato monoconidico CM42 era propagato su PDA, alla temperatura di 20-22°C, in alternanza di luce/buio (12 ore di fotoperiodo) e dopo 7 giorni di accrescimento le colonie producevano conidi di color bruno scuro di forma



Figura 2 – Disseccamenti fogliari di piante di *Campanula medium* causate da *Alternaria alternata*.

Figure 2 – Leaf lesions on *Campanula medium* caused by *Alternaria alternata*.

variabile: tondeggianti, ovali, piriformi o clavati quelli con becco. I conidi in catenelle da 2-8 elementi, mostravano una parete liscia e risultavano settati, con 2-6 setti trasversali e da 0 a 4 setti longitudinali. Le misure condotte sui conidi evidenziavano una lunghezza compresa tra 17,7- 48,4 (media 24,4) μ m e larghezza di 6,8-8,9 (media 7,8) μ m; erano provvisti per la maggior parte di becco di colore più chiaro del corpo del conidio, generalmente tubolare di lunghezza 2,2-9,4 (media 6,2) μ m e risultavano simili a quelli osservati sulle piante malate di *C. medium*, con caratteristiche morfologiche di *Alternaria* sp. (Simmons, 2007). Il DNA dell'isolato di *Alternaria* ITS42 veniva estratto utilizzando il E.Z.N.A. Plant DNA Kit (Omega Bio-Tek). Sul DNA ottenuto veniva condotta una reazione di PCR utilizzando i primers ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) che amplificano la regione intergenica presente tra le sequenze codificanti per l'RNA ribosomale 28S e 18S, comprendente al suo interno la sequenza del rRNA 5,8S. Il prodotto di amplificazione veniva sequenziato ottenendo la sequenza di 484 paia di basi depositata con GenBank accession number KU512288. L'analisi con l'algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) confermava l'identificazione dell'isolato come *Alternaria* sp. (GenBank accession number KP245769). Per l'identificazione della specie a conferma delle caratteristiche morfologiche, è stata eseguita una reazione di PCR del gene beta-tubulin (*TUB2*) tra gli esoni 2 e 6, con il utilizzo dei primers T1 (O'Donnell e Cigelink, 1997) e β 2b (Glass e Donaldson, 1995). Il prodotto ottenuto è stato purificato e sequenziato e analizzato con il programma DNA Baser program (Heracle BioSoft SRL, Romania). L'analisi BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) delle 1005 paia di basi ha consentito di identificare il fungo con il 100% di similitudine a *Alternaria alternata* (Genbank accession number KJ396337.1). La sequenza è stata depositata in Genbank con il codice KU512287.

Inoculazione artificiali e riproduzioni dei sintomi

Per dimostrare la patogenicità, uno degli isolati di *A. alternata* ottenuto da *C. medium* era inoculato artificialmente su 3 piante apparentemente sane dell'ospite di circa 7 mesi di età. Le piante ottenute da seme erano allevate in vasi contenenti 5 litri di terriccio costituito da torba, pomice e argilla. L'inoculo era ottenuto da colture del fungo cresciute su PDA per circa 10 giorni. Una sospensione di frammenti di micelio e conidi prelevati dalle colture *in vitro* era diluita fino ad ottenere una concentrazione di 10^5

CFU/ml e irrorata sulla chioma delle piante. Tre piante testimoni erano trattate allo stesso modo impiegando acqua sterile. Dopo l'inoculazione, tutte le piante erano poste in camera umida, rimossa dopo 5 giorni, e mantenute all'esterno a temperature variante tra 15 e 22°C. Trascorsi 6 giorni dall'inoculazione comparivano sulle foglie inoculate necrosi dapprima localizzate e in seguito assai estese che interessavano ampie parti dei lembi fogliari ed erano molto simili a quelle osservate in natura. Per soddisfare i postulati di Koch da queste aree necrotiche era facilmente reisolato lo stesso parassita artificialmente inoculato. Le piante testimoni non inoculate rimanevano, invece, asintomatiche e dai reisolamenti effettuati da queste ultime non si otteneva alcuna colonia fungina.

Conclusioni

Tra i patogeni responsabili di alterazioni fogliari su *C. medium* sono riportati: un agente di mal bianco identificato come *Erysiphe orontii* in Ucraina (Braun 1995), *Coleosporium tussilaginis* agente di ruggine, *Septoria campanulae* e *Ramularia macrospora* in Polonia (Mulencko *et al.*, 2008), quest'ultima nota anche in Italia (Braun, 1998). A quanto ci risulta questa è, invece, la prima osservazione della presenza di *Alternaria alternata* su questa specie (Farr e Rossman, 2016).

Per prevenire gli attacchi di *Alternaria* su *Campanula medium* si può ricordare quanto detto recentemente a proposito degli attacchi di *Stagonosporopsis trachelii* sulla stessa specie (Bertetti, *et al.* 2015). In particolare si può consigliare di impiantare le piante di queste specie impiegando una corretta spaziatura per favorire una buona aereazione e di mettere a dimora queste piante in pieno sole sempre per ridurre la comparsa di condizioni di elevata umidità predisponenti agli attacchi di *Alternaria*. Sono consigliabili anche concimazioni equilibrate evitando gli eccessi di quelle azotate. In caso di attacchi violenti del parassita si può ricorrere all'impiego di fungicidi ad azione contro le alternariosi autorizzate su piante da fiore, come ad esempio boscalid e difenoconazolo.

Ringraziamenti

Lavoro svolto con un contributo del progetto Europeo Horizon 2020 (EMPHASIS), No 634179 "Effective Management of Pests and Harmful Alien Species - Integrated Solutions".

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.
- Bertetti D., Ortu G., Gullino M. L., Garibaldi A. (2015) - Attacchi di *Stagonosporopsis trachelii* su *Campanula medium* L. in Italia. *Protezione delle colture*, 8 (5), 13-15.
- Braun U. (1995) - The Powdery mildews (*Erysiphales*) of Europe. Gustav Fischer Verlag, 337 pagine.
- Braun U. (1998) - A Monograph of *Cercosporiella*, *Ramularia* and Allied Genera (Phytopathogenic Hyphomycetes). IHW-Verlag 2, 337.
- Farr D. F., Rossman A. Y. (2016) - Fungal Databases - Syst. Mycol. Microbiol. Lab. ARS, USDA. Retrieved from http://nt.ars-grin.gov/fungal_databases, 29 Gennaio 2016.
- 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 and Environmental Microbiology*, 61, 1323-1330.
- Mulencko W., Majewski T., Ruskiewicz-Michalska M. (2008) - A Preliminary Checklist of Micromycetes in Poland. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, 9, 752.
- O'Donnell K., Cigelink E. (1997) – Two divergent intergenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 103-116.
- Pignatti S. (1982) - Flora d'Italia. Vol 3. Edagricole, Bologna, 2302 pp.
- Simmons E. G. (2007) - *Alternaria: An Identification Manual*. APS PRESS, St Paul, MN, USA, 775 pages.
- White T. J., T. Bruns, 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. coord.). Academic Press, Inc., New York, NY, USA, 315-322.