ATTI *Giornate Fitopatologiche*, 2002, 2, 195-200

AUREOBASIDIUM PULLULANS ASSOCIATO A RUGGINOSITÀ DI MELE E PERE

C. BAZZI, G. SPONZA, L. TORTORETO, G. FILIPPINI, A. CANOVA
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali – Patologia Vegetale
Università degli Studi - Via F. Re 6-8, 40126 Bologna

RIASSUNTO

La rugginosità del tessuto epidermico di mele e pere, non di rado all'origine di notevoli perdite economiche per il frutticoltore, può essere attribuita a diversi fattori biotici ed abiotici. In questo studio, si è cercato di confermare il ruolo eziologico dell'ifomicete dematiaceo *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud nell'insorgenza di questa fitopatia, già oggetto di studio nello Stato di New York. Da campioni di frutti, raccolti in diverse aree frutticole italiane, sono stati isolati ceppi del fungo, successivamente identificati mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) ed analisi dei profili di restrizione dei prodotti ottenuti da amplificazione genica (PCR) di una regione variabile di DNA ribosomiale ("ribo-fingerprinting") comprendente lo spaziatore intergenico ITS-1, il gene 5,8S ed ITS-2. Le impronte fenotipiche e molecolari caratterizzanti i ceppi fungini isolati da epidermide rugginosa di mele e pere sono risultate indistinguibili da quelle di ceppi autentici di *A. pullulans* di diversa origine geografica usati come controllo. La capacità dei nostri isolati di causare rugginosità sui frutti è stata saggiata mediante inoculazioni sperimentali ripetute di alberi di melo in campo. Infine, si discutono brevemente i fattori ed i possibili meccanismi implicati nell'insorgenza di rugginosità.
Parole chiave: *Aureobasidium pullulans*, "ribo-fingerprinting", rugginosità, mele, pere.

SUMMARY

AUREOBASIDIUM PULLULANS ASSOCIATED WITH RUSSETING OF APPLE AND PEAR FRUITS

Russeting of apple and pear fruit epidermal tissue, which often results in substantial losses to growers, can be attributed to several biotic and abiotic factors. In this study, we tried to confirm the etiological role of the dematiaceous hyphomycete *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud in russet induction. This problem has been subject of previous studies in New York State. Strains of the fungus were isolated on semi-selective medium from fruit samples collected in different Italian fruit-growing areas, and were subsequently identified by means of Scanning Electron Microscopy (SEM) and analysis of restriction fragment profiles from the products of a PCR-amplified variable region of ribosomal DNA ("ribo-fingerprinting") including the intergenic spacer region ITS-1, the 5.8S gene and ITS-2. Phenotypic and molecular fingerprints characterizing the fungal strains isolated from russeted apple and pear fruits were indistinguishable from those of the authentic *A. pullulans* strains from different geographic origin used as controls. The ability of our fungal isolates in causing fruit russet was assayed by repeated experimental inoculations on apple trees in the field. Factors and possible mechanisms involved in the onset of russeting are briefly discussed.
Key words: *Aureobasidium pullulans*, ribo-fingerprinting, russeting, apples, pears.

INTRODUZIONE

La rugginosità può causare significativa riduzione della qualità di mele e pere con notevoli perdite economiche per il frutticoltore. L'osservazione microscopica delle aree rugginose sui

frutti mette in evidenza numerose screpolature confluenti nello strato cuticolare, con strati sottostanti di cellule epidermiche morte. In generale, l'incidenza e la gravità dell'alterazione variano a seconda del grado di suscettibilità delle cultivar (Cummins *et al.*, 1977) e la sua complessa eziologia viene per lo più attribuita a diversi fattori (Faust e Shear, 1972; Lindow, 1987; 1992): funghi agenti di mal bianco, insetti, traumi, fungicidi organici, altri fitofarmaci, urea, acido gibberellico, acido indolacetico (IAA) prodotto da batteri epifiti (Clark e Lindow, 1987). A ceppi di *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud, ifomicete dematiaceo appartenente al gruppo artificiale dei funghi Mitosporici (Hawksworth *et al.*, 1995) noti anche come Deuteromiceti o Funghi Imperfetti (Ulloa e Hanlin, 2000) e caratterizzato da fase anamorfica producente conidi per mezzo di ife fertili non organizzate in conidioma, è stato attribuito un ruolo preponderante nell'insorgenza della rugginosità dei frutti nello Stato di New York (Matteson Heidenreich *et al.*, 1997). Inoltre, in micologia medica, il fungo è annoverato tra gli agenti causali di feoifomicosi, micosi sottocutanea caratterizzata da ife nella fase di parassitismo tessutale in organismi con ridotte capacità difensive (opportunismo) (La Placa *et al.*, 2000).

Principali obiettivi di questo studio sono stati:

- rilevamento della presenza di popolazioni di *A. pullulans* su mele e pere rugginose provenienti da diverse aree frutticole italiane mediante isolamento diretto dei ceppi fungini su substrato semi-selettivo;
- identificazione delle colture pure per mezzo di impronte fenotipiche, molecolari e patogenetiche. In particolare, le impronte fenotipiche e molecolari sono state studiate rispettivamente mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) ed amplificazione genica (PCR) di una regione variabile di DNA ribosomiale comprendente lo spaziatore intergenico ITS-1, il gene 5,8S ed ITS-2 seguita da analisi dei profili di restrizione degli ampliconi ottenuti (Matteson Heidenreich *et al.*, 1997). Le impronte patogenetiche sono state studiate in campo mediante inoculazioni sperimentali su frutti pendenti di melo.

MATERIALI E METODI

Isolamento dei ceppi fungini

Sono stati effettuati da campioni di mele e pere di diversa origine (Tab. 1). Dai frutti lavati in acqua corrente, disinfettati superficialmente con etanolo 70% ed accuratamente sciacquati in H_2O distillata sterile, sono state prelevate asetticamente con bisturi areole di tessuto epidermico rugginoso e, poste in mortaio, sono state ridotte in poltiglia con piccolo volume di soluzione fisiologica sterile; lasciate decantare le particelle più grossolane per circa 10 min, il surnatante (100 µl) è stato inseminato su substrato PDA-Plus contenente 50 µg ml^{-1} di solfato di streptomicina, cloramfenicolo e tetraciclina (Matteson Heidenreich, 1997). Dalle piastre di isolamento, incubate a 27°C per 3-4 giorni, sono state scelte singole colonie morfologicamente simili ai ceppi autentici di *A. pullulans* ATCC 12536 e YT 16 (controlli) per la purificazione mediante due consecutivi passaggi su PDA.

Identificazione dei ceppi

a) Microscopia elettronica a scansione (SEM). Campioni, prelevati da aree di tessuto epidermico di mela con evidente rugginosità e da agar patata glucosato (PDA) colonizzato da micelio fungino, sono stati fissati con glutaraldeide 2,5%, progressivamente disidratati prima in etanolo 20%÷95% ed in etanolo assoluto, poi tramite disidratazione al punto critico in CO_2 (CPD); dopo montaggio su apposito supporto ("stub") con colla "silver glue", sono stati ricoperti con oro in metallizzatore ("Sputter Coater Device"). I preparati sono stati osservati a circa 7 KV di accelerazione, con microscopio elettronico a scansione mod. Philips SEM 515.

b) Estrazione del DNA genomico e "ribo-fingerprinting". Le colture di 24 ceppi fungini allevati in brodo patata glucosato (PDB, pH 6) a 25°C per 24 ore sono state centrifugate (10.000 x *g*, 5 min) in provette Eppendorf da 2 ml; dopo 2 lavaggi in H_2O distillata sterile, i pellet fungini sono stati risospesi in 600 µl di tampone di estrazione (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, pH 8), congelati per due volte in azoto liquido e riscaldati per 10 min a 70°C e messi ad incubare a 37°C per 1 h dopo l'aggiunta di 3 µl di proteinasi K (20 mg/ml). Il DNA gnomico é stato estratto mediante procedura "miniprep" con bromuro di cetiltrimetil ammonio (CTAB) (Wilson, 1989) modificata da un'estrazione con un volume di una miscela cloroformio:alcool isoamilico (24:1) effettuata prima della precipitazione finale con isopropanolo. Gli estratti di DNA sono stati lavati in 70% etanolo e risospesi in 30 µl di tampone TE. L'amplificazione (PCR) della regione di DNA ribosomiale comprendente lo spaziatore intergenico (ITS)-1, il gene 5,8S e ITS-2 è avvenuta con l'uso degli inneschi (2µM) di Matteson Heidenreich *et al.* (1997). I prodotti di amplificazione sono stati purificati mediante apparato filtrante da centrifuga "Amicon Microcon-PCR Centrifugal Filter Devices" (Millipore) e separatamente incubati (37°C, 4 h) con endonucleasi di restrizione *Alu*I e *Cfo*I (Promega). I frammenti ottenuti sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio (2,2%) in tampone TAE e fotografati su transilluminatore a luce UV dopo colorazione in bromuro di etidio.

c) Saggi in campo. Colture pure dei ceppi locali da melo IPV-BO 3531 e 3532 sono state allevate in beute contenenti PDB messe ad incubare in agitatore rotativo a 25°C per circa 36 ore. Dopo centrifugazione (10.000 x *g*, 15 min) i pellet fungini sono stati risospesi in H_2O deionizzata e, per le inoculazioni sperimentali, le sospensioni sono state usate ad una concentrazione di circa 10^7 CFU ml^{-1}. Le sospensioni di ciascun ceppo ed H_2O deionizzata (controllo) sono state accuratamente nebulizzate sette volte, ad intervalli settimanali, su due giovani alberi di melo "Golden", "Royal Gala" e "Red Jonathan", a partire dalla fase di orecchiette di topo sino a circa tre settimane dopo la caduta dei petali. Dopo la raccolta, avvenuta a fine agosto, a ciascun frutto è stato attribuito un punteggio da 0 a 4 sulla base della % stimata di superficie rugginosa (0 = 0÷3%; 1 = 4÷20%; 2 = 21÷45%; 3 = 46÷74%; 4 = ≥ 75%). La gravità dell'alterazione (G %) sull'insieme dei frutti dei due alberi di ciascuna cultivar è stata calcolata come segue: G = [Σ (punteggio x N. frutti con tale punteggio)/4 x N. totale di frutti] x 100 (Matteson Heidenreich *et al.*, 1997). Dal tessuto rugginoso di alcune mele sono stati effettuati isolamenti su PDA Plus ed i reisolati sono stati identificati mediante "ribo-fingerprinting".

RISULTATI

Isolamento ed identificazione dei ceppi fungini

Da 27 campioni di mele e pere di diversa origine (Tab. 1), sono stati isolati 21 ceppi fungini, 19 dei quali, formanti colonie morfologicamente molto simili ai ceppi di *A. pullulans* usati come controllo. Dopo incubazione sul substrato semi-selettivo PDA-Plus, tali colonie hanno raggiunto in 4 giorni un diametro medio di 6-7 mm, producendo masse conidiche mucose ricoprenti in gran parte un micelio di colore bianco-cremeo con sfumature rosa-chiaro; in alcuni casi, con il passare dei giorni, il colore ha assunto tonalità grigia-nerastra. Altre colonie lucenti, di colore rosa e simili a lieviti, a volte presenti nelle piastre di isolamento, non sono state oggetto di ulteriori indagini. Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione (SEM) dei preparati da tessuto vegetale e da coltura pura in substrato agarizzato hanno messo in evidenza propaguli fungini del tutto simili per forma e dimensione a quelli di controllo (Fig. 1).

Tab.1 – Isolati fungini da mele e pere affette da rugginosità e ceppi autentici di *A. pullulans* (controlli, in grassetto).

Ceppi IPV-BO	
3530	Mele "Rosa Romana"(Querciola-BO)
3531	Mele "Golden" (Alto Adige-BZ)
3532	Mele "Golden" (Alto Adige-BZ)
3998	Pere "Decana del Comizio" (FE)
4038	Mele "Staiman" (Alto Adige-BZ)
4052	Pere "Conference" (Molinella-BO)
4153	Mele "Renetta" (Raspadore-BO)
4154	Mele "Rosa Romana" (Fiocchi-BO)
4164	Pere "Abate Fétel" (Ducentola-FE)
4178	Pere "Calebasse Tierlemon" (Magliano-FO)
4179	Pere "Reimer Red" (Magliano-FO)
4180	Pere "Ercole d'Este" (Magliano-FO)

Ceppi IPV-BO	
4181	Pere "Dermen" (Magliano-FO)
4182	Pere "Mora di Pirovano" (MaglianoFO)
4183	Pere "Butirra Hardy" (Magliano-FO)
4184	Pere "Del Savor" (Magliano-FO)
4186	Pere "Pirovano IP286" (Magliano-FO)
4187	Pere "Super Eliot" (Magliano-FO)
4188	Pere "Abate Fétel" (Magliano-FO)
4189	Pere "Bosc Kobakia" (Magliano-FO)
4190	Mele "Golden" (TN)
ATCC 12536	U.S.A.
YT16	Mele "Cortland" (Geneva, NY, U.S.A.)

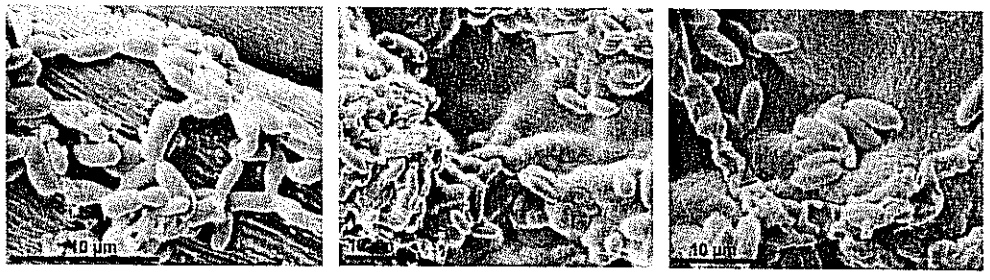


Fig. 1 – Microfotografie al SEM di un pelo dell'epidermide rugginosa di mela "Golden" colonizzato da *A. pullulans* (a sinistra); propaguli dei ceppi ATCC 12536 (al centro) e IPV-BO 3532 (a destra) cresciuti in coltura pura su PDA per 5 giorni.

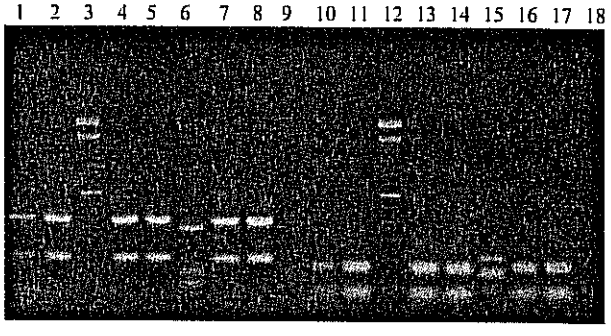


Fig. 2 – Profili di restrizione dei prodotti di amplificazione della regione di DNA ribosomiale bersaglio di alcuni ceppi fungini dopo digestione con endonucleasi *Alu*I (corsie 1÷8) e *Cfo*I (corsie 10÷17). I profili *Alu*I dei ceppi da melo (IPV-BO 4153, IPV-BO 4154: corsie 4, 5) e da pero (IPV-BO 4187, IPV-BO 3998: corsie 7, 8) hanno generato bande di circa 200 e 400 bp indistinguibili da quelle dei controlli di *A. pullulans* ATCC 12536 e YT16 (corsie 1, 2); i profili *Cfo*I degli stessi ceppi da melo e da pero (corsie 13, 14, 16, 17) hanno generato, come i ceppi di controllo (corsie 10, 11) bande di circa 100 e 200 bp. Il ceppo IPV-BO 4190 (corsie 6, 15) mostra invece profili di restrizione completamente diversi. Corsie 3, 12 : marcatore 100 bp DNA ladder (Gibco BRL); Corsie 9, 18 =controllo negativo (H_2O).

I profili di restrizione dei prodotti ottenuti da amplificazione genica (PCR) ("ribofingerprinting") caratterizzanti i ceppi fungini isolati da epidermide rugginosa di mele e pere sono risultate indistinguibili da quelle di ceppi autentici di *A. pullulans* usati come controllo (Fig. 2); solo 2 dei 21 ceppi analizzati (IPV-BO 3530 e IPV-BO 4190) ha originato profili palesemente differenti.

Nei saggi in campo, il livello di gravità (G) dell'alterazione è variato da 21%÷49% rispettivamente su mele "Red Jonathan" e "Golden" inoculate con i ceppi IPV-BO 3531 e IPV-BO 3532, superando palesemente quello sui controlli trattati con H_2O (5%÷17%); nessuna differenza è stata invece osservata su mele "Royal Gala" risultate, in tutti i casi, pressoché esenti da rugginosità. Dai frutti inoculati con epidermide rugginosa, è stato possibile reisolare *A. pullulans*.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il substrato semi-selettivo PDA Plus, usato per gli isolamenti diretti dai campioni di mele e pere di diversa origine, ha permesso di rilevare la presenza di popolazioni di *A. pullulans* associate ad evidente rugginosità dei frutti (frequenza di isolamento: circa 70%). Occasionalmente, è stata osservata la contemporanea crescita di colonie simili a lieviti non identificati. Nel presente lavoro, l'attenzione è stata rivolta solo alle colonie del primo organismo, spesso predominante in coltura pura e riconoscibile se messo a confronto con colture autentiche di controllo: tipica, infatti, la produzione di polisaccaride extracellulare ricoprente gran parte del micelio in via di sviluppo dopo 3-4 giorni di incubazione. Anche le altre impronte fenotipiche e molecolari dei ceppi analizzati sono risultate indistinguibili da quelle dei ceppi autentici di *A. pullulans*. I rilievi fitopatometrici sulle mele al momento della raccolta hanno messo in evidenza la capacità degli isolati usati per le inoculazioni sperimentali di causare rugginosità: in particolare, l'alterazione è risultata piuttosto grave su "Golden Delicious" e "Red Jonathan", mentre "Royal Gala" si è dimostrata assai poco suscettibile. Alla luce dei risultati ottenuti, può essere confermato il ruolo causale di *A. pullulans* nell'insorgenza di rugginosità su mele e pere (Matteson Heidenreich *et al.*, 1997). Questo fungo ubiquitario, prevalentemente saprotrofo, di cui non è ancora stato studiato in modo approfondito il ruolo competitivo verso la flora microrganica colonizzante il filloplano mediante produzione di sostanze fungistatiche e/o consumo di nutrienti, sembra in grado di crescere anche come endofita su materiali solubili presenti negli spazi intercellulari delle foglie (Carlile *et al.*, 2000).

Ulteriori indagini sono necessarie per chiarire il/i meccanismo/i implicato/i nell'insorgenza di rugginosità: alla pletora dei fattori elencati nell'introduzione del presente lavoro, potrebbero essere incluse la produzione di cutinasi facenti breccia nella cuticola dei frutti (Matteson Heidenreich *et al.*, 1997), la stessa pigmentazione scura dei propagali fungini conferenti aspetto fuligginoso alle matrici colonizzate (di qui il termine "sooty moulds") e la produzione di pullulano, abbondante in presenza di saccarosio nel substrato di crescita (Bruno *et* al., 2001). In particolare, soluzioni di questo polisaccaride extracellulare (formato da catene lineari di unità di maltotrioso unite da legami α (1→6) glucosidici e, per la sua solubilità in acqua e biodegradabilità, di grande interesse industriale nella fabbricazione di materie plastiche, cosmetici, prodotti farmaceutici, film ricoprenti per la conservazione di frutta e derrate deperibili, ecc...) anche se assorbite a concentrazioni molto basse possono causare avvizzimento e necrosi del tessuto fogliare di vite (Sparapano *et al.*, 2000). L'effetto fitotossico di questo e di altri pullulani estratti da filtrati colturali di funghi associati al "mal dell'esca" della vite potrebbe essere riferibile ad anossia dovuta alla formazione di sottili film impermeabili all'ossigeno nello strato delle cellule epidermiche di mele e pere e nel mesofillo fogliare. Allo stesso tempo, l'abilità di colonizzare in modo asintomatico il filloplano di

diverse specie vegetali ha reso possibile l'isolamento e l'identificazione specifica del ceppo L47 di *A. pullulans*, attivo antagonista nella lotta biologica contro agenti di marciume di ortofrutticoli freschi in postraccolta quali fragola, uva da tavola, ciliegie, pomodoro e pompelmo (Schena *et al.*, 1999; 2000). Tra i possibili meccanismi di azione dell'antagonista, potrebbero intervenire barriere difensive indotte di tipo biochimico, riferibili ad incremento di attività degli enzimi idrolitici chitinasi e β-1,3-glucanasi (Ippolito *et al.*, 2001). La presenza in natura di popolazioni di *A. pullulans*, dotate di intrinseche caratteristiche benefiche e non, offre pertanto stimolanti spunti per la prosecuzione di più approfondite ricerche.

LAVORI CITATI

CARLILE M.J., WATKINSON S.C., GOODAY G.W., 2000. The Fungi, Second Edition, Academic Press, San Diego, California, 588 pp.

CLARK E., LINDOW S.E., 1989. Indoleacetic acid production by epiphytic bacteria associated with pear fruit russeting. *Phytopathology*, 79, 1191.

CUMMINS J.N., FORSLINE P.L., WAY R.D., 1977. A comparison of russeting among "Golden Delicious" subclones. *HortScience*, 12, 241-242.

DAIS P., VLACHOU S., TARAVEL F.R., 2001. ^{13}C nuclear magnetic relaxation study of segmental dynamics of the heteropolysaccharide pullulan in dilute solutions. *Biomacromolecules*, 2, 1137-1147.

FAUST M., SHEAR C.B., 1972. Russeting of apples, an interpretive review. *HortScience*, 7, 233-235.

HAWKSWORTH D.L., KIRK P.M., SUTTON B.C., PEGLER D.N., 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, Eighth Edition, C.A.B. International, Wallingford, 616 pp.

IPPOLITO A., LIGORIO A., ROMANAZZI G., SCHENA L., NIGRO F., 2001. Attività di enzimi idrolitici in tessuti di ciliegie trattati con *Aureobasidium pullulans*. Atti VIII Convegno Annuale S.I.Pa.V., Potenza, 3-5 ottobre 2001, 66 (PS 38, Riassunto).

LA PLACA M., ET ALII, 2001. Principî di Microbiologia Medica, Nona Edizione, Società Editrice Esculapio, Bologna, 843 pp.

LINDOW S.E., 1987. Severity of pear fruit russeting associated with epiphytic indoleacetic acid-producing bacteria. *Phytopathology*, 77, 1724.

LINDOW S. E., 1992. Integrated control of frost injury, fire blight, and fruit russet of pear with a blossom application of an antagonistic bacterium. *Phytopathology*, 82, 1129.

MATTESON HEIDENREICH M.C., CORRAL-GARCIA M.R., MOMOL E.A., BURR T.J., 1997. Russet of apple fruit caused by *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula glutinis*. *Plant Disease*, 81, 337-342.

SCHENA L., IPPOLITO A., ZAHAVI T., COHEN L., NIGRO F., DROBY S., 1999. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*, 17, 189-199.

SCHENA L., FINETTI SIALER M.M., GALLITELLI D., 2000. Specific identification of *Aureobasidium pullulans* strain L47 using Scorpion PCR. *EPPO Bulletin*, 30, 559-562.

SPARAPANO L., BRUNO G., GRANITI A., 2000. Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 169-177.

ULLOA M., HANLIN R.T., 2000. Illustrated Dictionary of Mycology, APS Press, St. Paul, Minnesota, 448 pp.

WILSON K.,1989. Current protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York , I, 2.4.1-2.4.5.

BRUNO G., DELBEN F., FORABOSCO A., LIUT G., SPARAPANO L., 2001. Fitotossicità di glicani prodotti da ceppi di *Cryphonectria parasitica* e dal ceppo 42023 di *Aureobasidium pullulans*. *Petria*, 11, 59-126.