

RUOLO DELLE CORTECCHE UTILIZZATE COME PACCIAMATURA NELLE INFEZIONI DA *ARMILLARIA* SPP. SU MIRTILLO GIGANTE AMERICANO

L. PALMIERI ⁽¹⁾, D. PRODORUTTI ⁽²⁾, D. GOBBIN ⁽¹⁾, I. PERTOT ⁽¹⁾, C. GESSLER ^(1,3)

⁽¹⁾ SafeCrop Centre

⁽²⁾ Dipartimento Protezione delle Piante - Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Via E. Mach 1, 38010 S. Michele all'Adige (TN), Italia luisa.palmieri@iasma.it

⁽³⁾ Institute of integrative Biology: ecology, evolution and infectious diseases, Swiss Federal Institute of Technology, Universitätstrasse 2, CH-8092 Zürich, Svizzera

RIASSUNTO

Dal 2003 sono state rinvenute in Trentino piante di mirtillo gigante che presentavano caratteristiche anomale di sviluppo. Le piante si presentavano stentate, sviluppavano foglie piccole che arrossivano prematuramente in autunno, le radici marcivano, inoltre numerosi rami disseccavano e in genere le piante morivano dopo alcuni mesi. I microrganismi rinvenuti sulle radici di individui sintomatici sono stati preliminarmente identificati come *Armillaria* sp.. *Armillaria* sp. è stata isolata anche da cortecce impiegate nella pacciamatura. Gli isolati sono stati inoculati su piante sane per dimostrarne la patogenicità. Tecniche di genetica molecolare sono state impiegate per l'identificazione delle specie di *Armillaria* presenti sulle piante infette e sulle cortecce utilizzate come pacciamatura. L'analisi è stata svolta su DNA estratto direttamente dal micelio degli isolati. Gli isolati, derivati da piante infette e corteccia, sono stati entrambi in grado di riprodurre i sintomi una volta inoculati in piante sane e sono stati identificati come *A. gallica* e *A. mellea*. In un impianto monitorato nel corso degli ultimi due anni, la malattia è in lenta crescita.

Parole chiave: mirtillo gigante americano, pacciamatura di cortecce, marciumi radicali, marcatori molecolari

SUMMARY

ROLE OF BARKS USED IN Highbush BLUEBERRY MULCHING ON *ARMILLARIA* SPP. INFECTIONS

Since 2003 highbush blueberry plants with atypical growth were found in Trentino region (North-Eastern Italy). At the beginning plants were stunted and developed small leaves that redden prematurely in autumn. Then roots rotted, several branches wilted and plants usually died within few months. The microorganisms found on rotted roots of symptomatic plants were preliminarily identified as *Armillaria* sp.. *Armillaria* sp. was also isolated from barks used as cover mulching. The isolates were inoculated on healthy plants to prove their pathogenicity. Molecular methods were used to identify the *Armillaria* species present on infected plants and on nearby mulching barks. The analysis was carried on DNA extracted directly from *Armillaria* mycelium derived from root and bark samples. The isolates coming from the infected plants and barks were both able to produce symptoms on newly inoculated plants and they were identified as *A. gallica* and *A. mellea* by molecular analysis. In the studied orchard, the disease slowly increased during the last two years.

Keywords: highbush blueberry, mulching barks, root rots, molecular markers

INTRODUZIONE

Il mirtillo gigante americano (*Vaccinium corymbosum* L.) è una coltura di recente introduzione in Trentino. Nel 2004, dopo 15 anni di coltivazione intensiva, la superficie destinata a questa coltura era pari a 50 ettari con una produzione annua di circa 150 tonnellate. Il mirtillo ha un apparato radicale poco profondo e dovrebbe avere una pacciamatura di sostanza organica di almeno 10 cm. In genere si utilizzano segatura, foglie ed in particolare cortecce che rappresentano il materiale migliore dal punto di vista culturale. Tale pratica agricola ha diversi effetti positivi: aumenta la sostanza organica del terreno, mantiene l'umidità del suolo, protegge le radici dal calore e riduce la crescita delle malerbe. Dal 2003, in alcuni impianti di mirtillo del Trentino, sono state segnalate piante che appaiono, ad una prima analisi, sofferenti e stentate. Tali piante sviluppano foglie piccole che arrossano prematuramente in autunno, le radici marciscono, inoltre numerosi rami disseccano e in genere le piante muoiono dopo alcuni mesi. I microrganismi rinvenuti sulle radici di individui sintomatici sono stati preliminarmente identificati come *Armillaria* sp.. *Armillaria* è un fungo che causa marciumi radicali su un'ampia gamma di specie vegetali, con conseguenti rilevanti perdite economiche, specialmente su piante arboree e forestali. In Europa sono state identificate sette specie biologiche: *Armillaria borealis*, *A. ectypa*, *A. gallica*, *A. tabescens*, *A. mellea*, *A. ostoyae* e *A. cepistepes* (Guillaumin *et al.*, 1985; Shaw e Kile, 1991). Esse sono solitamente patogene per piante sottoposte a stress di varia natura, ma possono anche sopravvivere come saprofite nel legno e nei frammenti di radici (Lochman *et al.*, 2004). Quindi, la pacciamatura con sostanza organica potrebbe rappresentare una delle potenziali fonti di inoculo della malattia. Tecniche molecolari basate sull'utilizzo della PCR (Polymerase Chain Reaction), possono essere efficacemente impiegate nella caratterizzazione a livello di specie dell'agente patogeno.

La ricerca si è posta come obiettivi: l'identificazione dell'agente causale di questa malattia del mirtillo, la verifica della presenza di *Armillaria* sp. sia sulle radici di mirtillo che sulle cortecce di conifere utilizzate per la pacciamatura e la valutazione dello sviluppo della malattia in un impianto commerciale, mediante l'utilizzo di tecniche molecolari.

MATERIALI E METODI

Due impianti di mirtillo con i tipici sintomi di piante sofferenti e marciumi radicali sono stati monitorati a partire da novembre 2003, per osservare come la malattia si sviluppa nel tempo e si diffonde in campo. In uno di questi circa il 10% delle piante su un totale di 547 mostravano la sintomatologia sopra descritta. Quelle considerate morte sono state estirpate e usate per effettuare l'isolamento del presunto patogeno. *Armillaria* sp. è stata isolata da radici sintomatiche e dalla corteccia usata come pacciamatura. Due o tre pezzi di corteccia per ogni campione sono stati prelevati in zone diverse di cumuli, utilizzati per la pacciamatura, posti in vicinanza dei campi ed alla base di piante successivamente campionate. Gli isolati ottenuti sono stati poi inoculati su tronchetti di melo, previa sterilizzazione degli stessi. Successivamente tali tronchetti sono stati impiegati per inoculare piante sane poste a dimora in vasi conservati in serra, per riprodurre i sintomi, isolare nuovamente i putativi agenti patogeni e verificare, di conseguenza, la patogenicità degli stessi. L'identificazione delle specie di *Armillaria* presenti sulle piante infette e sulle cortecce è stata effettuata utilizzando tecniche di biologia molecolare basate sul metodo PCR. Si è utilizzato DNA estratto da micelio di *Armillaria* sp. proveniente da campioni di radici e di cortecce utilizzando, come riferimento per le diverse specie, 10 campioni di DNA di 5 specie di *Armillaria* (da uno a tre ceppi per specie). Nell'analisi PCR (tabella 1) sono state impiegate sette combinazioni di primer disegnati sulle regioni ITS (internal transcribed spacer) e IGS

(intergenic spacer) di rDNA (Lochman *et al.*, 2004; Pérez-Sierra *et al.*, 2000; Sicoli *et al.*, 2003). Tre coppie non permettono la determinazione della specie (ITS1/ITS4, AR1/AR2, LR12R/O-1), mentre le rimanenti ne permettono il riconoscimento (ATA1/ATA2: primer specifici per *A. tabescens*; AMEL3/ITS4 e AME1/AME2: primer specifici per il riconoscimento di *A. mellea*; AOS1/AOS2: primer specifici per il riconoscimento di *A. ostoyae*). Per rendere tale analisi più veloce e di facile applicazione tre coppie di primer specie-specifici sono stati raggruppati in una multiplex-PCR. Non permettendo tale risultato di identificare tutte le specie di interesse è stata successivamente condotta un'analisi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) con l'enzima di restrizione *AluI*, su ampliconi ottenuti con la coppia di primer LR12R/O1 (Pérez-Sierra *et al.*, 2000). Tale analisi assieme ai risultati di sequenziamento, ha permesso di confermare l'identità delle bande ottenute e quindi di determinare con certezza la specie del patogeno presente sia su cortecce che su radici.

Tabella 1 - Coppie di primer utilizzate per l'identificazione di *Armillaria*

Primer	Sequenze (5'-> 3')	Lunghezza	Ampliconi	Riferimento
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	20	847-882	Lochman <i>et al.</i> , 2004
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20		
AR1	CTGACCTGTTAAAGGGTATGTGC	23	690-724	Lochman <i>et al.</i> , 2004
AR2	AAGCTGAATCCTTCTACAAAGTCAA	25		
ATA1	TTGCCTTGAACCCTGTTATAAGGC	24	329-335	Sicoli <i>et al.</i> , 2003
ATA1	TGCCAAAATCGTTGCACGCCGC	22		
AMEL3	TTGCTTGCTTACGAGGCTAAG	20	517	Sicoli <i>et al.</i> , 2003
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20		
AME1	AAGAATCATGAGATATCATCAGT	23	319-342	Sicoli <i>et al.</i> , 2003
AME2	TTAGAAAATCCGCCTTAGAAAC	22		
AOS1	CAGRTAAAGCTAACAACAACCTTT	23	314-317	Sicoli <i>et al.</i> , 2003
AOS2	AAARTTTGAACGTAGCCCTARA	22		
LR12R	CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA	21	845-920	Harrington <i>et al.</i> , 2005
O-1	AGTCCTATGGCCGTGGAT	18		

RISULTATI

Dal 2003 al 2005 la malattia ha avuto una lenta diffusione negli impianti oggetto di studio. I dati analizzati per uno degli impianti riportano un incremento annuale medio di piante morte che variava tra 1 e 2,5%. Tutte le piante campionate risultavano ad un'analisi visiva essere infette. Gli isolati provenienti da alcune di tali piante e da cortecce per la pacciamatura sono stati identificati come *A. gallica* e *A. mellea* con l'analisi PCR, RFLP e di sequenziamento (figura 1 e 2).

In un primo frutteto 11 isolati da corteccia e 10 da radici hanno dato un profilo identico al ceppo di riferimento di *A. gallica*. In un secondo impianto tre isolati dalle radici hanno evidenziato un profilo identico al ceppo di riferimento di *A. mellea*. Gli isolati provenienti da piante infette e da cortecce utilizzate come pacciamatura sono stati entrambi in grado di riprodurre i sintomi su piante sane inoculate artificialmente: dieci mesi dopo l'inoculo, le piante di mirtillo hanno sviluppato sintomi simili a quelli rilevati nell'impianto originale di isolamento (figura 3).

Figura 1 - Linea 1: 100bp plus ladder; linee 2-5: amplificazione con primer specifici per *Armillaria* spp. di DNA estratto da patogeni presenti su radice e su corteccia (P9c e C9c) del campione 9 del campo 1 e DNA estratto da una pianta ed un tronchetto artificialmente inoculati (P4SM, P4SMT); linee 6-13: amplificazione di DNA estratto da microrganismi presenti su radici del campione 1 del campo 2 (P1S) e da ceppi di *A. mellea* e *A. ostoyae* utilizzati come controllo (M, O) impiegando primer specie-specifici (vedi tabella 1); linee 14 e 15: risultato della multiplex PCR ottenuta su DNA del campione PS1 e O utilizzando la combinazione di tre coppie di primer specie-specifici

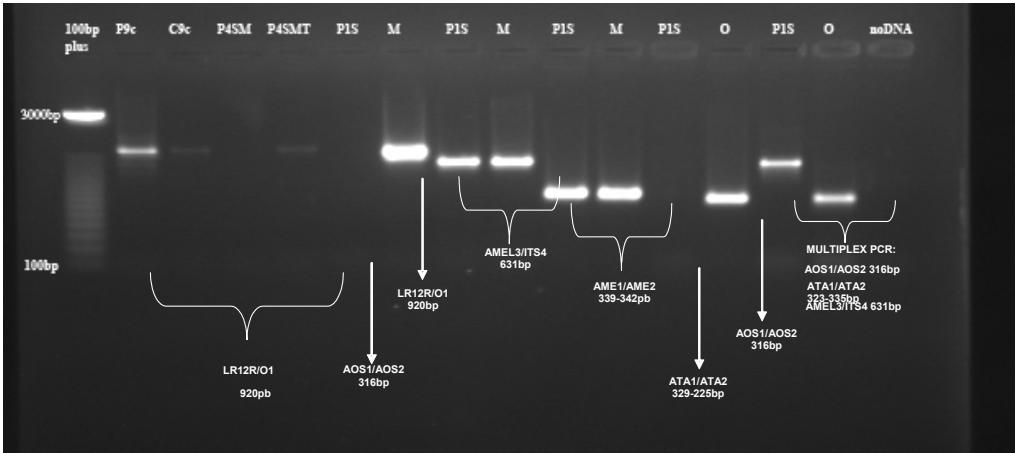


Figura 2 - linea 1: 50bp ladder; linee 2-7: profilo di restrizione degli ampliconi ottenuti dai DNA di controllo per le differenti specie di *Armillaria* (B: *A. borealis*; C: *A. cepistipes*; G: *A. gallica*; M: *A. mellea*); linee 8-14: profilo di restrizione degli ampliconi ottenuti da DNA estratto da *Armillaria* presente su radici del campo 1 (P6c, P7c, P10c, P1c, P2c) del campo 2 (P1S) e presente su corteccia del campo 1 (C10c)

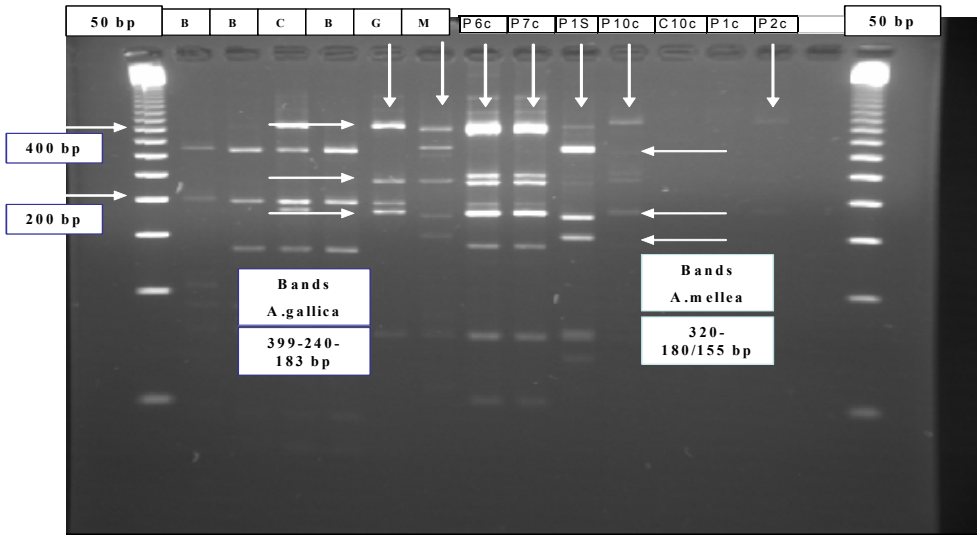


Figura 3 - Risultato dell'analisi di patogenicità. La foto evidenzia la presenza di rizomorfe su radici di una pianta sana di mirtillo, dopo l'inoculazione in vaso con uno degli isolati ottenuti in uno dei mirtilleti. La sintomatologia sulla parte aerea era simile a quella riscontrata in campo



CONCLUSIONI

A. mellea e *A. ostoyae* sono già state segnalate su mirtillo gigante negli Stati Uniti (Caruso, 1995). Un precedente lavoro ha costituito la prima segnalazione di marciume radicale causato da *A. gallica* su questa coltura (Prodorutti *et al.*, 2005).

A seguito dell'accertata presenza di *A. gallica* e *A. mellea* sia nei campioni di cortecce impiegate per la pacciamatura sia, come patogeni, sulle piante analizzate, è verosimile dedurre che le cortecce potrebbero costituire una potenziale fonte di inoculo nei campi coltivati, promuovere la diffusione della malattia o, semplicemente, rappresentare un substrato alternativo colonizzato dai patogeni dopo l'infezione della pianta. Questo è quanto si intende approfondire in futuro, con un'analisi su larga scala da condurre su piante di mirtillo provenienti da diversi impianti commerciali del Trentino, per confermare l'identità delle specie di patogeni presenti e verificare il ruolo della corteccia come fonte di inoculo sviluppando, inoltre, metodologie atte alla prevenzione dell'infezione. Tale ultimo obiettivo può essere raggiunto grazie alla quantificazione della presenza del patogeno stesso nel terreno, mediante tecniche molecolari innovative quali la Real Time PCR. Tale tecnica potrebbe infatti permettere di comprendere se il terreno è stato infettato in maniera significativa prima di porre a dimora le piante ed, al contempo, di svolgere un'analisi precoce su cortecce che, se risultanti infette, potrebbero veicolare il patogeno nel frutteto stesso.

Ringraziamenti

La ricerca è stata svolta nell'ambito del Centro SafeCrop, progetto finanziato dal Fondo per la ricerca, Provincia Autonoma di Trento. Gli Autori vogliono ringraziare Alessandro Frontuto per l'assistenza tecnica e l'aiuto nel monitorare la diffusione della malattia in Trentino e il Dr. Daniel Rigling, WSL Birmensdorf-Svizzera, per aver fornito il DNA di riferimento delle diverse specie di *Armillaria*.

LAVORI CITATI

- Caruso F.L., 1995. *Armillaria* root rot. In: Compendium of Blueberry and Cranberry Diseases. St. Paul, USA, APS Press, 22-23.
- Guillaumin J.J., Lung B., Romagnesi H., Marxmueller H., Lamoure D., Durrieu G., 1985. Systematics of the *Armillaria mellea* complex. Phytopathological consequences. *European Journal of Forest Pathology*, 15, 268-277.
- Lochman J., Sery O., Mikes V., 2004. The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR. *Microbiology Letters*, 237, 105-110.
- Perez-Sierra A., Whitehead D., Whitehead M., 2000. Molecular methods used for the detection and identification of *Armillaria*. In: *Armillaria Root Rot: Biology and Control of Honey Fungus*. Andover, UK: Intercept Ltd, 95-108.
- Prodorutti D., Palmieri L., Gobbin D., Pertot I., 2005. First report of *Armillaria gallica* on highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Italy. *Plant Pathology*, in stampa.
- Shhaw C.G., Kile G.A., 1991. *Armillaria* root disease. In: *Agriculture Handbook 691*. Washington DC, USA, USDA Forest Service, 91.
- Sicoli G., Fatethi J., Stenlid J., 2003. Development of species-specific PCR primers on rDNA for the identification of European *Armillaria* species. *Forest Pathology*, 33, 287-297.

.....
La ricerca è stata svolta dal Centro SafeCrop, finanziato dal Fondo per la Ricerca della Provincia Autonoma di Trento