

INDAGINI PRELIMINARI SUL RUOLO DI SCOLITIDI COME VETTORI DEI FUNGHI RESPONSABILI DELLA MORIA DEL CARPINO

M. SARACCHI, F. ROCCHI, D. LUPI

Università degli Studi di Milano - Dipartimento di Protezione dei Sistemi Agroalimentare e Urbano e Valorizzazione delle Biodiversità (DiPSA) - Via Celoria, 2, 20133 Milano
marco.saracchi@unimi.it

RIASSUNTO

La moria del carpino (*Carpinus betulus*) è una malattia emergente nel nord Italia, causata da due diversi patogeni fungini *Anthostoma decipiens* ed *Endothiella* sp., della quale molti aspetti non sono ancora stati chiariti. Il presente lavoro costituisce il primo contributo per lo studio di una possibile relazione tra i due patogeni fungini e insetti scolitidi. Questa indagine, effettuata in una zona dove la malattia è particolarmente frequente, ha messo in evidenza che la popolazione di insetti corticicoli presenti sui carpini era costituita quasi interamente da una sola specie: *Xyleborinus saxesenii*. Le catture di questo insetto si sono protratte da maggio a settembre, con una maggiore frequenza in giugno. Sul corpo di molti insetti è stata accertata la presenza di propaguli di *A. decipiens*, ma non di quelli di *Endothiella* sp., sia attraverso l'isolamento *in vitro* sia utilizzando tecniche di amplificazione mediante PCR con primer specifici. Questi ultimi chiamati rispettivamente REX e ORA, usati in coppia con il primer generico ITS4, potranno essere utilizzati in futuri studi sulla moria del carpino per facilitare l'evidenziazione e il riconoscimento dei suoi agenti eziologici.

Parole chiave: *Carpinus betulus*, *Anthostoma decipiens*, *Endothiella* sp., *Xyleborinus saxesenii*, primer specifici

SUMMARY

PRELIMINARY RESEARCH ON THE ROLE OF BARK BEETLES AS VECTORS OF HORNBEAM DECLINE FUNGAL AGENTS

Hornbeam (*Carpinus betulus*) decline is an emerging disease in northern Italy caused by two different fungal pathogens *Anthostoma decipiens* and *Endothiella* sp.. Many other aspects of this phytopathological problem have not yet been clarified. The present work constitutes the first contribution to the study of a possible relationship between the two fungal pathogens and bark beetles. This study, carried out in an area where the disease is particularly frequent, showed that the insect population present on hornbeam cork consists almost entirely of the species: *Xyleborinus saxesenii*. This insect was captured from May to September, especially in June. *In vitro* isolation and PCR amplification with specific primers allowed to find propagules of *A. decipiens* on the body of many specimens. Conversely, *Endothiella* sp. was never found. The primers REX and ORA, used in tandem with the generic ITS4 for the specific detection of *A. decipiens* and *Endothiella* sp., respectively, could be used in future studies of hornbeam decline epidemiology.

Keywords: hornbeam, *Carpinus betulus*, *Anthostoma decipiens*, *Endothiella* sp., *Xyleborinus saxesenii*, specific primers

INTRODUZIONE

La moria del carpino bianco (*Carpinus betulus*) è un problema fitosanitario emerso negli ultimi anni e del quale stanno aumentando notevolmente le segnalazioni (Dallavalle *et al.*, 2003; Saracchi *et al.*, 2006; 2007; 2008a; 2008b; Ricca *et al.*, 2008). Le prime indagini fitopatologiche hanno consentito di rilevare la presenza di cancri di origine fungina sui fusti e

sulle grosse branche causate dall'azione, spesso concomitante, di due differenti patogeni fungini, l'uno identificato a livello specifico come *Anthostoma decipiens* (DC.: Fr) Nitschke l'altro, attualmente ancora in fase di studio, riferibile al genere *Endothiella* (Saracchi *et al.*, 2008a; 2008c; 2008d). Entrambi i funghi sono caratterizzati dalla abbondante produzione di inoculo durante la fase di evasione. Per quanto riguarda *A. decipiens*, la sua forma conidica (*Cytospora decipiens*) produce vistosi ammassi di propaguli di colore rosso e con aspetto resinoso mentre, la forma perfetta, differenzia nei tessuti corticali devitalizzati uno strato quasi continuo di periteci nerastri, muniti di vistosi colli, che emergono sulla superficie degli organi colonizzati. Nel caso di *Endothiella* sp. è stata osservata la sola forma asessuata, caratterizzata da stromi fertili presenti negli strati corticali più esterni entro le cui cavità si differenziano numerosi conidi che fuoriescono, durante periodi umidi, sottoforma di lunghi cirri gialli. L'epidemiologia di questa malattia non è stata sino ad ora indagata. È possibile ipotizzare che le piogge possano avere un ruolo significativo nella diffusione dell'inoculo liberando e diffondendo i numerosi propaguli prodotti dai due patogeni. Un secondo aspetto significativo riguarda il possibile ruolo di eventuali insetti vettori in quanto, frequentemente, nei pressi dei cancri sono stati ritrovati piccoli fori riferibili alla presenza di insetti corticicoli. Interazioni funghi-insetti sono estremamente comuni tra i coleotteri scolitidi e contribuiscono alla diffusione epidemica di malattie che compromettono seriamente lo stato fitosanitario di intere popolazioni arboree quali, ad esempio olmi e cipressi (Phillips e Burdekin, 1982; Tainter e Baker, 1996; Agrios, 2005). Di questi insetti fanno parte i cosiddetti "ambrosia beetles" le cui specie attuano vere e proprie coltivazioni di funghi all'interno delle gallerie scavate nelle cortece (Peer e Taborsky, 2007; Biedermann *et al.*, 2009).

Il presente lavoro è relativo a una indagine condotta in un giardino storico della Brianza lombarda e riguarda i primi risultati inerenti l'entomofauna riscontrata su tronchi e branche di carpini colpiti da moria e la ricerca degli agenti patogeni fungini sul corpo degli insetti stessi.

MATERIALI E METODI

Descrizione della carpineta

I rilievi sono stati condotti nell'ambito del giardino storico del Palazzo Arese-Borromeo di Cesano Maderno (MB). In un'area di circa 10 ettari, con origini nel XVII secolo, sono presenti 652 carpini con età variabile da giovani esemplari sino a esemplari probabilmente centenari. La maggior parte di queste piante è allineata in due doppi filari che con i loro 400 m di lunghezza costituiscono una delle carpinete più lunghe d'Europa. L'incidenza della moria del carpino in quest'area è molto elevata: circa il 40% dei carpini risulta colpito e il 10% è già morto a causa della malattia. Nel giardino sono state riscontrate contemporaneamente su un terzo delle piante sintomatiche censite entrambe le specie fungine coinvolte nella moria del carpino (Saracchi *et al.*, 2007).

Determinazione dell'entomofauna associata ai carpini sintomatici

Per questo aspetto della ricerca sono state utilizzate 3 trappole Superforest[®] innescate con alcool etilico al 95%. Le trappole sono state posizionate da maggio a novembre nel 2008 e nel 2009, lungo il filare centrale di carpini, ad un'altezza di circa 2 m. L'ispezione è stata effettuata con cadenza quindicinale. Il materiale raccolto è stato selezionato e classificato. Gli esemplari appartenenti alla famiglia degli scolitidi sono stati classificati fino al livello di specie utilizzando la chiave proposta da Balachowsky (1949).

Valutazione della presenza di *A. decipiens* ed *Endothiella* sp. sugli insetti scolitidi

Questa parte della ricerca è stata affrontata adottando due differenti approcci metodologici, l'uno impostato sull'isolamento diretto *in vitro* dei funghi patogeni, l'altro mediante l'impiego di tecniche biomolecolari basate sulla reazione di amplificazione mediante PCR e impiego di primer specifici.

Isolamento

Gli insetti catturati in campo nei due anni e identificati come *Xyleborinus saxeseni* sono stati sottoposti ad analisi di laboratorio finalizzate all'isolamento della microflora fungina presente esternamente e internamente allo scolitide.

Gli insetti raccolti sono stati inseriti singolarmente in microtubi contenenti 0,5 ml di acqua distillata sterile e Tween 20 (0,5%) e sottoposti ad agitazione mediante vortex. Successivamente la soluzione ottenuta dal lavaggio di ogni singolo scolitide è stata distribuita sulla superficie di piastre Petri (0,1 ml per piastra) contenenti due substrati nutritivi adatti per lo sviluppo dei funghi: MA++ (Agar Malto - Difco - addizionato con 25 ppm di tetraciclina e 25 ppm di streptomicina) e MAR+ (Agar Malto - Difco - addizionato con 25 ppm di Rosa Bengala e 25 ppm di streptomicina). Per ogni combinazione insetto/substrato colturale sono state predisposte tre ripetizioni.

A seguito dei primi risultati ottenuti, allo scopo di ridurre la contaminazione di lieviti presenti nell'intestino degli insetti, nel corso della prosecuzione delle analisi gli scolitidi sono stati privati dell'addome mediante asportazione con bisturi sterile. Il capo ed il torace sono stati quindi omogeneizzati con un pestello in 0,5 ml di acqua distillata sterile e Tween 20 (0,5%); la sospensione così ottenuta è stata utilizzata per inoculare substrati agarizzati come precedentemente descritto.

Le piastre inoculate sono state incubate in termostato a 24 °C ed osservate ogni giorno per valutare lo sviluppo di colonie fungine che sono state di volta in volta isolate e purificate. I ceppi ottenuti sono stati in seguito allevati per 10 gg a 24 °C in piastre e provette di Agar malto (Difco) e successivamente conservate in frigorifero a 4 °C.

Analisi biomolecolare

Questo approccio metodologico è stato seguito sia per l'identificazione a livello tassonomico dei ceppi fungini isolati dagli insetti sia per ricercare direttamente sul corpo degli scolitidi la presenza dei propaguli dei due patogeni coinvolti nella moria del carpino. La preparazione dei campioni per l'estrazione del DNA ha previsto, per quanto riguarda gli isolati fungini la loro coltivazione, a 24 °C per 10 gg, in piastre di Agar malto entro le quali sono state adagiate membrane di cellophane per poterne raccogliere i miceli, separandoli dal substrato colturale sottostante. Il micelio è stato liofilizzato e successivamente triturato mediante appositi pestelli in mortai sterili. Per ogni isolato l'estrazione è stata condotta, in doppio, su aliquote di 30 mg di micelio liofilizzato. I corpi degli insetti, invece, non sono stati sottoposti a pretrattamenti. L'estrazione è stata condotta su coppie di scolitidi, congelati in azoto liquido e tritati. Il DNA totale è stato estratto dai differenti campioni considerati utilizzando il kit di estrazione HP Fungal DNA Kit (Omega Bio-tek).

Per eseguire l'amplificazione mediante PCR sono state allestite microprovette da 200 µl, contenenti 28,8 µl di miscela di reagenti (GoTaq reaction buffer Promega 1x, 0,1 mM per ogni dNTP, due primer 1 µM e 0,9 U di Go Taq DNA polimerasi Promega) ai quali sono poi stati aggiunti 1,2 µl di sospensione di DNA.

Per l'amplificazione è stato usato un termociclatore Gene Cyclor (Bio-Rad Laboratories, USA) programmato in modo da eseguire l'amplificazione delle regioni ITS del DNA (White

et al., 1990) utilizzando il primer generico ITS1 in coppia con uno dei due primer REX e ORA, inneschi specifici per i due funghi agenti della moria del carpino bianco che sono stati disegnati e messi a punto dal gruppo di lavoro del prof. Saracchi (Vaghi, 2008). Il primer REX (AGT TAC TTG GAG GCG AGC TA) è stato approntato per riconoscere selettivamente *Anthostoma decipiens* mentre ORA (AAA GGG AAA ATC CTT TTT TT) è specifico per *Endothiella* sp. Il ciclo termico per l'amplificazione PCR che ha fornito i migliori risultati durante la messa a punto del protocollo è stato il seguente: 1 ciclo (95 °C per 2 min), 25 cicli (57 °C per 30 sec; 72 °C per 1 min; 95 °C per 30 sec) e 1 ciclo finale (72 °C per 10 min).

La presenza di prodotti di amplificazioni è stata valutata mediante elettroforesi in tampone di corsa (TAE 1x) utilizzando gel d'agarosio all'1,5% ed effettuando una corsa in cella elettroforetica alimentata da un alimentatore multiplo PowerPac 300 (Bio-Rad Laboratories, USA). Tutte le corse sono state effettuate a voltaggio costante di 3 V/cm per 120 minuti.

Al termine della corsa elettroforetica la colorazione degli amplificati è stata effettuata mediante immersione dei gel per 20-30 minuti in bromuro di etidio (0,5 µg/ml in soluzione acquosa), seguito da lavaggio per 5 minuti in acqua deionizzata. La visualizzazione delle bande è stata ottenuta impiegando un transilluminatore Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, USA) in luce UV.

RISULTATI

Entomofauna associata ai carpini deperienti

Nell'ambito della carpineta in studio sono state rinvenute 3 specie di coleotteri scolitidi. La specie prevalente in entrambi gli anni di monitoraggio è stata *Xyleborinus saxesenii* (Ratzeburg) (figura 1). Singoli esemplari di *X. dispar* (Fabricius) e *X. monographus* (Fabricius) sono stati catturati rispettivamente nel 2008 e nel 2009. Tutte le specie appartengono alla tribù degli Xileborini, nota per le complesse forme di socialità e di sfruttamento delle crescite fungine (Peer e Taborsky, 2007).

Gli andamenti delle catture di *X. saxesenii* nei due anni considerati sono rappresentati nella figura 2: come appare evidente nel corso del 2008 la presenza degli insetti è risultata più frequente nel mese di giugno, con altri due picchi di catture nella prima metà dei mesi di agosto e settembre. Nel 2009 le catture sono risultate numericamente inferiori rispetto al primo anno di indagine e, apparentemente, in anticipo in quanto il maggior numero di scolitidi è stato ritrovato nelle trappole durante la terza decade di maggio.

Presenza di *A. decipiens* ed *Endothiella* sp. sugli insetti scolitidi

Le analisi eseguite in entrambi gli anni hanno evidenziato che la popolazione fungina totale, associata agli insetti in esame, è risultata molto contenuta anche quando la metodologia di analisi prevedeva la triturazione dei corpi degli scolitidi. Frequentemente sono state isolate forme fungine tipicamente saprofiti riferibili ai generi *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium* e *Penicillium*. In diverse occasioni sono stati isolati anche lieviti. Occasionalmente è stata rilevata la presenza di funghi afferenti ai generi *Sporotrix* e *Pestalotia* che includono forme potenzialmente fitopatogene, nonché alcuni eumiceti riferibili al genere *Beauveria*, dal comportamento tipicamente entomopatogeno.

Un discreto numero di colonie non ha invece differenziato strutture riproduttive. Questa popolazione è stata quindi soggetta ad ulteriori studi in quanto la caratteristica di sporulare in condizioni di allevamento particolari o solo dopo lunghissimi tempi di incubazione, superiori anche ai due mesi, è tipica anche dei patogeni responsabili della moria del carpino. Per trenta

ceppi di miceli sterili, le cui colonie assomigliavano a quelle di *A. decipiens* ed *Endothiella* sp., è stata quindi prevista l'identificazione tassonomica su base biomolecolare.

A seguito delle reazioni di amplificazione PCR, impiegando sequenze di innesco specifiche, 6 ceppi hanno prodotto una banda elettroforetica di circa 490 paia di basi utilizzando la coppia di primer REX-ITS4, per cui sono stati identificati come *A. decipiens*. Questi ceppi sono stati isolati da scolitidi catturati tra luglio ed agosto 2008. Nessuna identificazione positiva è stata invece ottenuta tra i ceppi sterili utilizzando i primer specifici per *Endothiella* sp.

Per quanto riguarda l'evidenziazione della presenza dei due patogeni direttamente sul corpo degli scolitidi mediante tecniche PCR, le prove condotte hanno considerato, per il momento, solo gli esemplari catturati nel 2008. In particolare, sono stati analizzate 42 esemplari di *X. saxesenii* catturati tra luglio e agosto, scelti a caso e in numero proporzionale a quanti presenti nelle trappole.

Le risposte ottenute dalle analisi biomolecolari, seppur parziali, confermano i risultati ottenuti dagli isolamenti *in vitro* e cioè la presenza di *A. decipiens* sul corpo di diversi esemplari di *X. saxesenii* esaminati. In particolare, tale presenza è stata riscontrata in 10 campioni catturati all'inizio di luglio e all'inizio di agosto 2008. Sulla base delle analisi effettuate, invece, non sono stati ottenuti riscontri positivi circa la presenza di *Endothiella* sp. sui medesimi scolitidi analizzati.

Figura 1. Esemplare di *X. saxesenii* osservato al microscopio elettronico a scansione

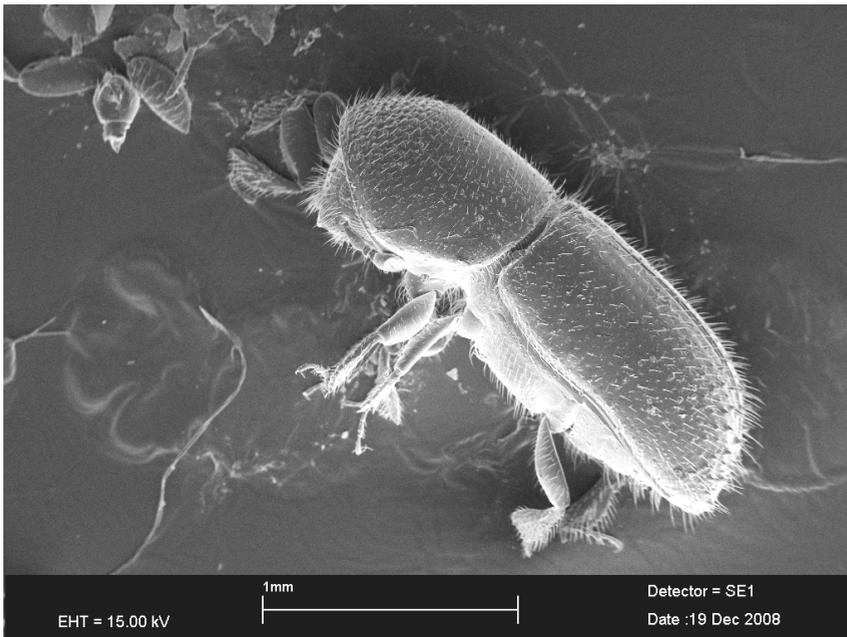
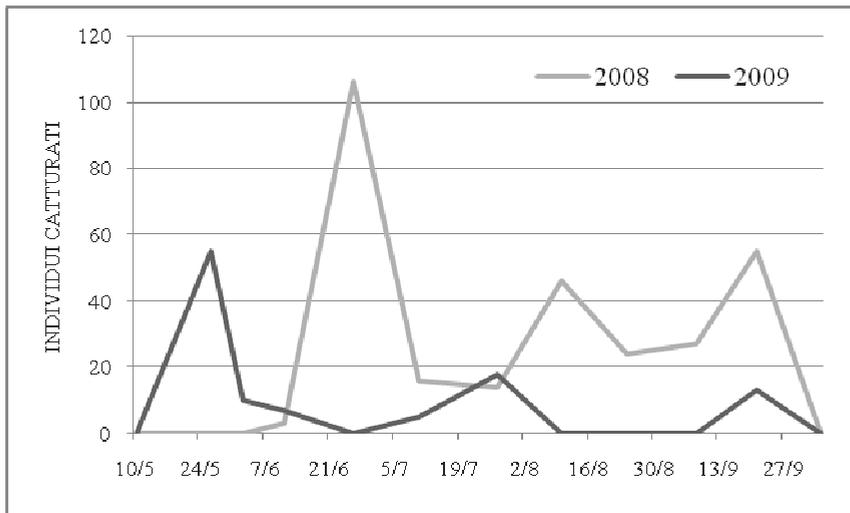


Figura 2. Andamento delle catture di *X. saxesenii* nei due anni di monitoraggio



CONCLUSIONI

La moria del carpino è una malattia emergente e molti aspetti che la riguardano non sono stati ancora chiariti. Il presente lavoro costituisce il primo contributo allo studio di un eventuale rapporto tra patogeni fungini coinvolti in questa malattia e insetti corticicoli.

Innanzitutto gli studi condotti sull'entomofauna presente in un'area dove è particolarmente frequente la malattia hanno sottolineato che essa è costituita quasi totalmente da un'unica specie di insetti scolidi: *X. saxesenii*. Le curve di cattura relative a due anni di osservazioni sembrano delineare una presenza costante durante tutto il periodo estivo con due picchi di presenze, in epoche che possono, probabilmente, variare in relazione all'andamento meteorologico. Sebbene questa specie sia spesso associata ad alberi danneggiati, o stressati, talvolta può attaccare anche alberi apparentemente sani e quindi, potenzialmente, contribuire alla diffusione dei patogeni coinvolti in questa malattia. Questa presenza necessita ovviamente di conferme presso altre località dove sono presenti carpini sintomatici.

Sul corpo degli insetti catturati è stata accertata la presenza di propaguli di *A. decipiens* ma non di *Endothiella* sp. sia mediante l'isolamento *in vitro* sia con l'impiego di amplificazioni PCR e l'uso dei primer specifici. Questa presenza, seppur significativa, necessita di ulteriori conferme su un maggior numero di individui anche provenienti da luoghi diversi da quello considerato.

I primer specifici per *A. decipiens* ed *Endothiella* sp., denominati rispettivamente REX e ORA, impiegati in coppia con il primer universale ITS4, costituiscono loro stessi un importante contributo allo studio della malattia potendo, nella prosecuzione delle ricerche, venire utilizzati per l'evidenziazione specifica della presenza dei due patogeni; essi sono stati messi a punto anche nell'ambito della presente ricerca e, sempre in tale contesto, sono state studiate le condizioni per un loro impiego ottimale.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare Francesco Pennacchio (Centro di ricerca per l'agrobiologia e la pedologia di Firenze-CRA-ABP) e Marta Valentini per il prezioso aiuto nella classificazione degli esemplari rinvenuti.

LAVORI CITATI

- Agrios G.N., 2005. Plant pathology. Elsevier, Amsterdam, 922 pp.
- Balachowsky A., 1949. Coleopteres Scolytidae. Faune de France, vol. 50. Lechevallier, Paris, 320 pp.
- Biedermann P.H.W., Klepzig K.D., Taborsky M., 2009. Fungus cultivation by ambrosia beetles: behavior and laboratory breeding success in three *Xyleborine* species. *Environ. Entomol.*, 38 (4), 1096-1105.
- Dallavalle E., Iotti M., Zambonelli A., 2003. *Cryphonectria radicalis* a new pathogen of *Carpinus betulus*. *Journal of Plant Pathology*, 85 (4), 319.
- Peer K., Taborsky M., 2007. Delayed dispersal as a potential route to cooperative breeding in ambrosia beetles. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 61, 729-739.
- Phillips D.H., Burdekin D.A., 1982. Diseases of forest and ornamental trees. Macmillan, London, 433 pp.
- Ricca S., Gonthier P., Nicolotti G., 2008. Impact and epidemiology of fungal disease of ornamental hornbeam (*Carpinus betulus*) trees in northern Italy. *Atti European Congress of Arboriculture "Arboriculture for the third millennium"*, Torino 16-18 giugno 2008.
- Saracchi M., Rocchi F., Maffi D., Quaroni S., 2006. La moria del carpino in Lombardia. *Atti XVI Convegno Nazionale di Micologia*, Firenze 4-6 dicembre 2006, 42.
- Saracchi M., Rocchi F., Maffi D., Quaroni S., 2008a. La moria del carpino in Lombardia. *Micologia Italiana*, 37 (1), 16-22.
- Saracchi M., Rocchi F., Quaroni S., 2008b. Primi risultati sulla diffusione della moria del carpino in Lombardia. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 507-512.
- Saracchi M., Rocchi F., Quaroni S., 2008c. Further studies on the etiological agents of *Carpinus betulus* decline. *Journal of Plant Pathology*, 90 (2 supplement), S2-453.
- Saracchi M., Rocchi F., Quaroni S., 2008d. La moria del carpino in Lombardia: ulteriori studi sugli agenti eziologici. *Atti XVII Convegno Nazionale di Micologia*, 21.
- Saracchi M., Rocchi F., Vaghi M., 2007. La moria del carpino. *Acer*, 6/07, 55-58.
- Tainter F.H., Baker F.A., 1996. Principles of forest pathology. John Wiley & Sons, New York, 805 pp.
- Vaghi M., 2008. Studio sugli agenti responsabili della moria del carpino bianco. Tesi di laurea, Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Milano, a.a. 2007-08, 127pp.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and application (Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. coord.) Academic Press, London, 315-322.

