

DIAGNOSI DEL MARCIUME BRUNO E DEL MARCIUME ANULARE DELLA PATATA MEDIANTE ANALISI DEI VOLATILI EMESSI DAI PATOGENI

S. BLASIOLI, E. BIONDI, I. BRASCHI, A. BERTACCINI

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna
v.le Fanin, 44 40127 Bologna, Italy
sonia.blasioli@unibo.it

RIASSUNTO

Il marciume bruno ed il marciume anulare, causati rispettivamente da *Ralstonia solanacearum* (Rs) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) sono malattie delle patate largamente diffuse e di forte impatto economico. In questo studio, i composti volatili (VOCs) emessi da colture batteriche di Rs e Cms allevati su differenti substrati (TZ-, LPG-, and PD-agar) sono stati analizzati mediante GC-MS, campionando lo spazio di testa con SPME. I risultati ottenuti sono stati confrontati con misure preliminari effettuate su patate sperimentalmente inoculate con Rs e Cms. La presenza dei patogeni favorisce la produzione di VOCs specifici per il tipo di substrato. In accordo con quanto osservato dall'analisi dello spazio di testa di Rs e Cms allevati su PDA, i tuberi infetti da Rs, confrontati con tuberi sani, producono significative variazioni dell'abbondanza relativa del picco GC-MS corrispondente all'acido 3-metilbutanoico. Per i tuberi infetti da Cms sono stati identificati 2 marcatori della malattia: il 2-propanolo, già osservato per Cms allevato su PDA, e il 3-metil-3-buten-2-one. Sembra ragionevole supporre che il metabolismo coinvolto nella crescita dei patogeni su PDA sia simile a quello coinvolto con il loro sviluppo in patata.

Parole chiave: marciume bruno, marciume anulare, VOCs

SUMMARY

DETECTION OF POTATO BROWN ROT AND RING ROT BY ANALYSIS OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS EMITTED BY THE PATHOGENS

Brown rot and ring rot, caused by the bacteria *Ralstonia solanacearum* (Rs) and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms), respectively, are the most damaging potato diseases worldwide. In this study, volatile compounds (VOCs) emitted from bacterial cultures of Rs and Cms grown on different nutrient media (TZ-, LPG-, and PD-agar) have been analyzed with GC-MS by sampling the headspace using SPME. In addition, preliminary SPME-GC-MS analysis have been performed on potatoes experimentally infected by Rs and Cms. The presence of pathogens favours the production of VOCs specific for the substrate. According to the VOCs detected in the headspace both of Rs and Cms grown on PDA, Rs infected tubers show significant variations of relative abundance of 3-methylbutanoic acid, comparing GC-MS spectra of control and infected tubers. Two specific markers of ring rot disease were identified analyzing Cms diseased tubers: 2-propanol and 3-methyl-3-buten-2-one. It seems therefore reasonable to hypothesize that the metabolism involved in the Rs and Cms growth on PDA is similar to the one occurring in potato tubers.

Keywords: Brown rot, ring rot, potato, VOCs

INTRODUZIONE

È noto che sia le piante che i microorganismi emettono composti volatili, alcuni dei quali possono avere un odore che è caratteristico per la specie che lo emette. Il profumo dei fiori o il cattivo odore di una coltura di *Escherichia coli* descrivono il largo spettro di odori che il

nostro naso percepisce ed usa per riconoscere ciò che gli sta attorno. Per quanto riguarda i microorganismi, diversi studi riportano che il tipo di substrato usato per una coltura e il suo tempo di crescita così come la specie microbica, possono influenzare la quantità e il tipo di composti volatili che possono essere prodotti. Quando questi sono caratteristici per quel particolare patogeno, essi possono essere usati come marcatori della malattia (Turner and Magan, 2004; Bachinger and Mandenius, 2000; Dudareva *et al.*, 2006).

Il marciume bruno e il marciume anulare, causati rispettivamente da *Ralstonia solanacearum* (Rs) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) sono malattie delle patate di importanza mondiale per la loro diffusione e per il tipo di danno che procurano alle colture. Il primo è stato descritto in più di 30 paesi dalle aree sub-tropicali fino a quelle temperate fredde, mentre il secondo è principalmente diffuso nel nord America, nel nord-est europeo ed in Asia. Entrambi i batteri sono inclusi nella lista A2 dei patogeni da quarantena in Europa e sono quindi soggetti alle direttive UE.

In questo studio sono stati analizzati mediante gascromatografia accoppiata alla massa (GC-MS) i composti volatili (VOCs) emessi da colture batteriche di Rs e Cms allevate su differenti substrati nutrienti (TZ-, LPG-, and PD-agar) dopo campionamento dello spazio di testa con fibre SPME (Solid Phase MicroExtraction).

MATERIALI E METODI

Ceppi di Rs (IPV-BO 5836) e di Cms (IPV-BO 7695) sono stati periodicamente allevati sui rispettivi substrati TZA and YDCA (figura 1). I due ceppi patogeni sono stati quindi allevati su differenti agar: TZA, LPGA e PDA (Potato Dextrose Agar è stato scelto in quanto mezzo colturale più simile alla patata). Piastre di TZA e LPGA insemminate con Rs sono state incubate a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 h mentre piastre di PDA insemminate sono state tenute alla stessa temperatura per 10 giorni. Piastre di LPGA insemminate con Cms sono state incubate a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 h mentre Petri di PDA insemminate sono state mantenute alla stessa temperatura per 10 giorni. Dopo incubazione, le colture batteriche sono state poste in tubi di vetro ermeticamente chiusi con tappi in Teflon (figura 2) come descritto in Blasioli *et al.*, 2010.

Fibre di Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS, SupelcoTM, USA) sono state usate per il campionamento dei VOCs emessi dalle colture batteriche. Dopo esposizione delle fibre per 24 h allo spazio di testa, i gas intrappolati sulle fibre sono stati desorbiti termicamente in un GC-MS Finnigan Mat Ion Trap.

Figura 1. A sinistra, Rs allevato su TZA; a destra, Cms allevato su YDCA

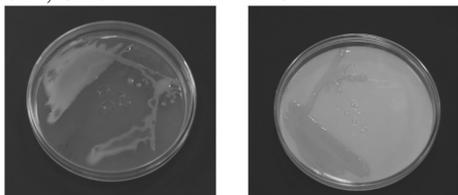


Figura 2. Apparato per l'analisi dei VOCs emessi dalle colture batteriche



RISULTATI E DISCUSSIONE

In tabella 1 sono riportati i possibili marcatori del marciume bruno e del marciume anulare così come identificati al GC-MS.

Tabella 1. Composti volatili identificati mediante GC-MS in colture batteriche di Rs e Cms allevate su diversi substrati a confronto con i substrati puri

Batterio	Substrato nutritivo		
	TZ	LPG	PD
Rs	dimetildisolfuro	dimetildisolfuro trimetiltrisolfuro 2-propanone metilestere dell'acido 2-metilbutanoico	dimetildisolfuro acido propanoico 2-butanone acido 2-metilpropanoico acido 3-metilbutanoico metilestere dell'acido 2- metilbutanoico
Cms	<i>non disponibile</i>	dimetildisolfuro	2-propanolo 3-idrossi-2-butanone

Il dimetildisolfuro (DMDS) è risultato il principale composto volatile metabolizzato da Rs su TZA. Una miscela di solfuri (DMDS e trimetiltrisolfuro), il 2-propanone e il metilestere dell'acido 2-metilbutanoico sono stati prodotti da Rs allevato su LPG. L'acido propanoico, il 2-butanone, il DMDS, l'acido 2-metilpropanoico, l'acido 3-metilbutanoico ed il metilestere dell'acido 2-metilbutanoico sono stati identificati nello spazio di testa di Rs allevato su PDA.

A causa della crescita più lenta di Cms rispetto ad Rs, solo pochi composti sono stati identificati come marcatori della presenza del patogeno: il trimetiltrisolfuro è stato osservato su LPG mentre il 2-propanolo e il 3-idrossi-2-butanone possono essere considerate molecole caratteristiche del metabolismo del Cms su PDA.

Questi risultati sono stati confrontati con dati preliminari ottenuti su patate sperimentalmente inoculate con Rs e Cms. In accordo con quanto osservato per i patogeni allevati su PDA, per i tuberi infetti da Rs confrontati con i tuberi sani sono state osservate significative variazioni dell'abbondanza relativa del picco GC-MS attribuito all'acido 3-metilbutanoico e la formazione di una miscela di idrocarburi a catena corta.

Due specifici marcatori del marciume anulare sono stati identificati analizzando tuberi infetti da Cms: il 2-propanolo e il 3-metil-3-buten-2-one.

Alla luce dei risultati ottenuti, sembra ragionevole ipotizzare che il meccanismo coinvolto nella crescita di Rs e Cms su PDA sia simile a quello implicato nello sviluppo dei medesimi patogeni in tuberi di patata.

CONCLUSIONI

Questi risultati sono incoraggianti per lo sviluppo di un nuovo metodo in GC-MS non distruttivo per la diagnosi del marciume bruno e del marciume anulare della patata basato sui differenti VOCs emessi dai tuberi infetti rispetto ai tuberi sani.

Attualmente sono in corso ulteriori prove per la diagnosi dei sintomi causati da Rs e Cms, che utilizzano tecniche analitiche innovative e alternative a quelle tradizionali (isolamento diretto, saggi sierologici e molecolari) quali il naso elettronico e l'analisi nel vicino infrarosso (NIR), che come quella sperimentata sono tecniche non distruttive.

Ringraziamenti

Questo lavoro è parte del progetto europeo Q-Detect (FP7-KBBE) che è supportato dalla Commissione Europea mediante il Seventh Framework Programme for Research and Technological Development.

LAVORI CITATI

- Bachinger T., Mandenius C.F., 2000. Searching for process information in the aroma of cell cultures. *Trends in Biotechnology*, 18, 494–500.
- Blasioli S., Biondi E., Braschi I., Mazzucchi U., Bazzi C., Gessa C.E., 2010. Electronic nose as an innovative tool for the diagnosis of grapevine crown gall. *Analytica Chimica Acta*, 672, 20–24.
- Dudareva N., Negre F., Nagegowda D. A., Orlova I., 2006. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 417–440.
- Turner A.P.F., Magan N., 2004. Electronic noses and disease diagnostics. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 161–166.