

La prova del DNA



L'Università di Torino propone un servizio diagnostico basato su un metodo biomolecolare per l'individuazione e la diagnosi precoce dei funghi agenti di carie direttamente dal legno. Ciò consente all'arboricoltore di prevedere l'intensità e l'esito del processo degradativo e la sua evoluzione all'interno degli organi della pianta colpita fin dalle primissime fasi d'infezione

Testo e foto di **Giovanni Nicolotti, Paolo Gonthier, Fabio Guglielmo**, Università di Torino - DI.VA.P.R.A. Patologia vegetale; **Matteo Garbelotto**, University of California (Usa) - Berkeley, Department of Environmental science, policy and management, ecosystem sciences division

Corpo fruttifero di *Perenniporia fraxinea*.

I funghi agenti di carie hanno la peculiarità di degradare le pareti cellulari lignificate grazie a una specifica attività enzimatica. Mentre in foresta viene esaltata la funzione ecologica di questi funghi decompositori della sostanza organica, in ambienti antropizzati la loro azione degradativa del legno pone seri problemi per i rischi connessi di indebolimento meccanico e schianti che spesso determinano danni a cose e a persone.

Occorre, inoltre, ricordare che le difficili condizioni vegetative degli ambienti antro-

pizzati giocano un ruolo fondamentale come fattori di debolezza predisponenti l'insediamento di questi funghi, in quanto spesso limitano l'efficienza delle difese fisiologiche dei vegetali a tali processi infettivi.

Il metodo VTA permette l'individuazione delle piante potenzialmente pericolose per la presenza di anomalie strutturali della chioma o di carie del legno, ma raramente consente l'individuazione dei funghi agenti di carie nelle fasi incipienti del processo infettivo, ovvero quando il fungo ha già infettato l'organo, ►

◀ ma non ha ancora determinato sostanziali modifiche strutturali e non ha fruttificato.

Sebbene moderne tecnologie abbiano significativamente migliorato la capacità di rilevamento delle carie nei tronchi ⁽⁶⁾, l'identificazione degli agenti causali è difficilmente realizzabile in assenza dei corpi fruttiferi che di solito compaiono solo sporadicamente o tardivamente. Anche quando presenti, la loro identificazione può essere tutt'altro che semplice per via della sovrapposizione dei caratteri morfologici spesso esistente tra diversi generi e specie ⁽²⁾.

Siccome la biologia e l'ecologia di questi funghi è variabile, il loro riconoscimento è importante perché consente di prevedere la loro rapidità di degradazione, la loro diffusione all'interno della pianta infetta e il rischio di contagio tra piante vicine, oltre che di mettere a punto eventuali misure di eradicazione e bonifica del "posto pianta" prima di procedere a un nuovo impianto.

Le tecniche classiche d'identificazione dei funghi agenti di carie prevedono, in assenza di corpo fruttifero, l'isolamento da legno in coltura pura, seguito da osservazioni sulla crescita del micelio e sulla sua attività enzimatica e da prove biochimiche e immunologiche ^(3,8). Il problema principale di questo tipo di approccio è dato dal fatto che l'isolamento in purezza richiede tempi lunghi e spesso non ha successo per la contemporanea presenza, nel medesimo campione di legno, di organismi "inquinanti". Per contro, le tecniche basate sull'analisi del DNA fungino estratto direttamente da legno cariato sembrano essere molto promettenti, sensibili e rapide da eseguire.

Il metodo molecolare basato sulla PCR (Polymerase chain reaction), descritto in questo lavoro, ha previsto il disegno di *primers* in grado di riconoscere, direttamente da legno cariato o da porzioni di corpo fruttifero, catene di DNA dei principali funghi agenti di carie presenti in Europa e Nordamerica. Per i dettagli del metodo si rimanda alla bibliografia ^(3,4).



A sinistra, corpo fruttifero di *Phellinus igniarius*.

Scelta dei generi e delle specie

I funghi sono stati selezionati in base alla loro frequenza e aggressività su specie arboree ornamentali nelle regioni temperate dell'emisfero nord ^(1,5,7) e comprendono i seguenti *taxa*: *Armillaria* spp., *Ganoderma* spp., *Hericium* spp., *Inonotus* spp., *Laetiporus sulphureus*, *Perenniporia fraxinea*, *Phellinus* spp., *Pleurotus* spp., *Schizophyllum* spp., *Stereum* spp., *Trametes* spp. e *Ustulina deusta* (tabella 1).

Per ciascun genere e/o specie si è partiti da colture pure ottenute direttamente da corpi fruttiferi raccolti in Italia e in California o da isolati provenienti da micoteche. Sono state esaminate provenienze sia europee che nordamericane per determinare il livello di variabilità genetica nell'ambito della stessa specie o genere tra i due continenti e ciò per verificare che i *primers* disegnati avessero efficacia a prescindere dalla provenienza del fungo.

Sviluppo del metodo

Il DNA dei funghi è stato estratto da micelio, precedentemente liofilizzato, e si è quindi proceduto all'amplificazione mediante PCR del DNA ribosomiale nucleare e, in alcuni casi, di quello mitocondriale ⁽³⁾. Tali porzioni di DNA sono poi state sequenziate. Per aumentare la

rappresentatività del campione e disegnare *primers* affidabili, alle sequenze di cui sopra ne sono state aggiunte altre disponibili in banche genetiche (EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/>).

I *primers* sono stati disegnati per riconoscere i funghi a livello di genere poiché, di norma, tale livello è sufficiente per mettere a punto un piano di gestione preventiva del rischio, oppure a livello di specie per quei *taxa* che annoverano al loro interno specie con diversa aggressività (per esempio *Ganoderma* spp., *Inonotus* spp. e *Phellinus* spp.) o per quei funghi la cui pericolosità o diffusione sono limitate ad aree geografiche definite (per esempio *Perenniporia fraxinea*).

I *primers* specifici ^(3,4) sono stati combinati in cinque multiplex (tabella 1), di cui Mhyme e Mgano funzionali all'identificazione a livello subgenerico di funghi appartenenti al gruppo *Inonotus-Phellinus* e al gruppo *Ganoderma*.

Validazione del metodo

Una volta messe a punto le cinque multiplex necessarie per l'identificazione, è stata eseguita la validazione del metodo, analizzando 114 campioni legnosi prelevati vicino al punto di evasione del corpo fruttifero.

La specie di appartenenza di ciascun fungo è stata determinata con l'analisi delle caratteristiche macroscopiche e microscopiche dei corpi fruttiferi ⁽¹⁾. I campioni legnosi sono poi stati sottoposti alle multiplex PCR e si è proceduto al confronto tra i risultati ottenuti con il metodo molecolare e quelli attesi per ciascun campione.

Su 114 campioni, nel 66% dei casi è stato individuato almeno uno dei *taxa* diagnosticabili con il metodo (figura 1, pagina a fianco). Nel 17% è stato rilevato un fungo diverso dalla specie attesa e tra questi i casi più frequenti sono risultati *Perenniporia fraxinea* anziché *Ganoderma* spp., *Phellinus torulosus* e *Stereum* spp. anziché *Inonotus/Phellinus*. Tuttavia, come dimostrato dal sequenziamento del DNA, l'errore era stato commesso durante l'identificazione tradizio-

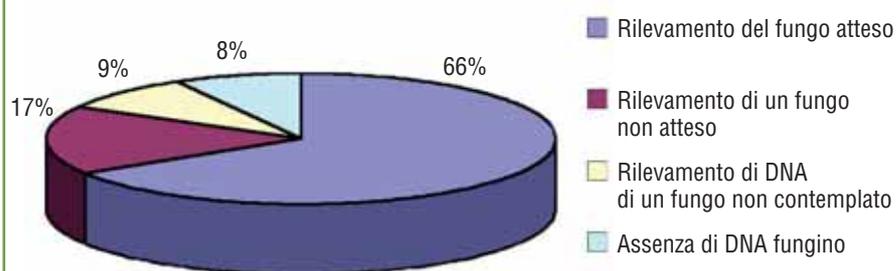
Glossario

Primer: corto filamento di DNA che serve come punto di innesco per la replicazione del DNA durante la reazione PCR. Il *primer* si aggancia al DNA, permettendone quindi la replicazione, solo se la sua sequenza è complementare a quella del DNA presente nel campione.

Multiplex PCR: reazione di replicazione controllata del DNA in laboratorio nella quale vengono utilizzati più di due *primers*.

Sequenziamento: operazione mediante la quale viene determinata l'esatta sequenza di nucleotidi in una determinata regione del DNA.

FIGURA 1 - EFFICACIA DIAGNOSTICA DEL METODO SU CAMPIONI LEGNOSI PRELEVATI IN PROSSIMITÀ DI CORPI FRUTTIFERI





A lato, i diversi tipi di materiale sui quali si può effettuare l'analisi; da sinistra in senso orario: frammenti di legno cariato; campione di segatura; carota prelevata col succhiello di Pressler; carpoforo, anche in cattivo stato di conservazione.

nale. Nel 9% dei casi sono stati rilevati funghi non appartenenti ai *taxa* diagnosticabili (per esempio altri basidiomiceti o, più frequentemente, ascomiceti o funghi imperfetti) e, infine, solo nell'8% dei casi non è stato rilevato DNA fungino nel legno.

Fasi e funzionamento del metodo

La procedura è schematizzata in figura 2 (pagina 52). L'analisi può essere effettuata a partire da diversi tipi di materiale quali semplici pezzi di legno cariato, segatura o trucioli di legno, carote estratte con succhiello di Pressler o pezzi di tessuto fungino prelevato possibilmente dal contesto di carpofori di qualsiasi età o stato di conservazione. Il campione viene liofilizzato, omogeneizzato e da esso viene estratto il DNA fungino mediante appositi kit.

La M1 indica se nel campione sono presenti una o più specie fungine poiché la reazione contiene anche *primers* universali per funghi e DNA del gruppo *Ganoderma* e/o del gruppo *Inonotus/Phellinus*. Se M1 risulta positiva a uno o entrambi di questi due gruppi, possono essere eseguite le multiplex Mgano e/o Mhyme per determinare la specie di appartenenza del *Ganoderma*, del *Phellinus* o dell'*Inonotus*. Se invece M1 è positiva ad altri funghi, si eseguono la multiplex M2 che permette la diagnosi di *Armillaria* spp., *Hericium* spp., *Laetiporus sulphureus* e *Pleurotus* spp., e la multiplex M3 per diagnosticare *Perenniporia fraxinea*, *Schizophyllum* spp., *Stereum* spp., *Trametes* spp. e *Ustulina deusta* (figura 3, pagina 52).

La presenza di una banda positiva per un fungo in M1 e un esito negativo di tutte le altre multiplex PCR indicherà che nel campione è presente un fungo non contemplato dal metodo. La sua identificazione potrebbe, però, avvenire mediante il sequenziamento di una regione di DNA e il confronto della sequenza con quelle presenti in banche genetiche.

Discussione

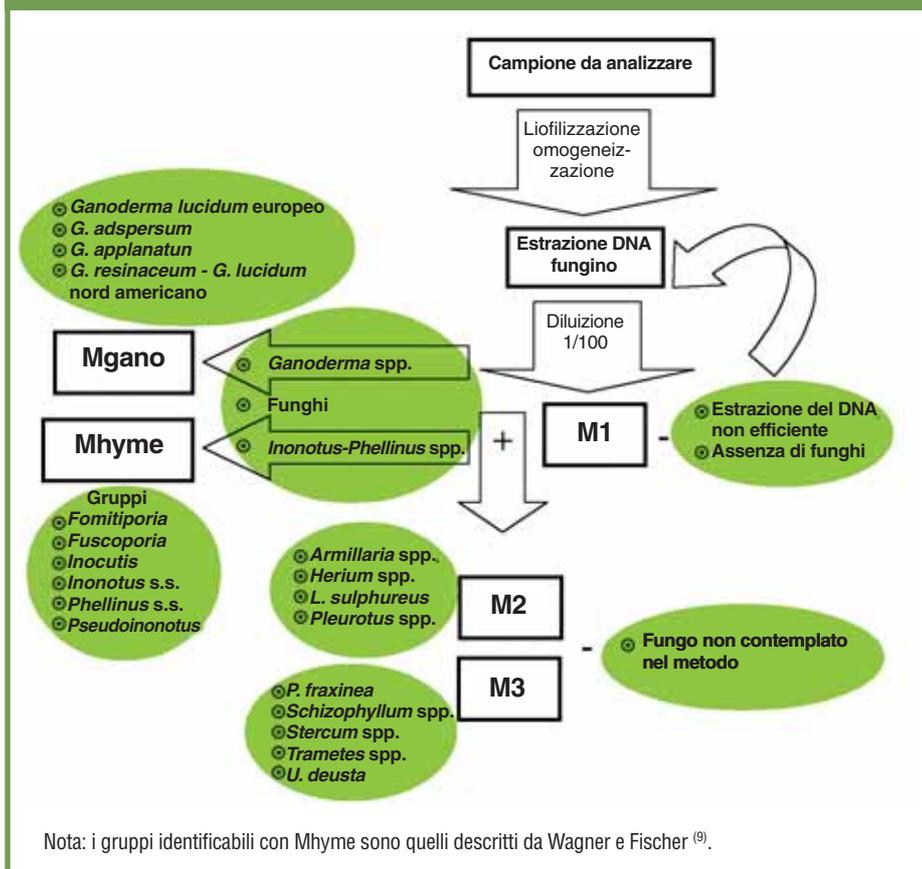
Il metodo messo a punto consente, oggi, la possibilità di identificare a livello specifico un consistente numero di specie fungine tra cui *Laetiporus sulphureus*, *Perenniporia fraxinea* e *Ustulina deusta* frequentemente riportate in letteratura come importanti agenti di alterazione^(5,7), *Inonotus dryadeus* e *I. hispidus*, *Phellinus gilvus* e *P. robustus* che, nell'ambito del gruppo *Inonotus/Phellinus*, recentemente rivisto⁽⁹⁾, sono note per la ►

TABELLA 1 - LE CINQUE FASI DELL'ANALISI MULTIPLEX PCR E LE SPECIE FUNGINE DIAGNOSTICABILI

Multiplex PCR	Dimensione della banda/ <i>taxon</i> identificabile	Specie diagnosticabili
M1	600-850 bp/ presenza di funghi 226-228 bp/ <i>Ganoderma</i> spp. 111 bp/ <i>Inonotus</i> spp.- <i>Phellinus</i> spp.	- <i>G. adspersum</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>G. resinaceum</i> <i>I. andersonii</i> , <i>I. dryophilus</i> ; <i>I. dryadeus</i> , <i>I. hispidus</i> , <i>I. radiatus</i> , <i>I. tamaricis</i> , <i>P. gilvus</i> , <i>P. igniarius</i> , <i>P. pini</i> , <i>P. punctatus</i> , <i>P. robustus</i> , <i>P. torulosus</i> , <i>P. tremulae</i> , <i>P. tuberculosus</i>
M2	185 bp/ <i>Armillaria</i> spp. 146 bp/ <i>Laetiporus sulphureus</i> 158 bp/ <i>Pleurotus</i> spp. 200 bp/ <i>Hericium</i> spp.	<i>A. gallica</i> , <i>A. mellea</i> , <i>A. nabsnona</i> <i>L. sulphureus</i> <i>P. ostreatus</i> , <i>P. pulmonarius</i> <i>H. coralloides</i> , <i>H. erinaceum</i>
M3	152 bp/ <i>Perenniporia fraxinea</i> 190 bp/ <i>Schizophyllum</i> spp. 231-236 bp/ <i>Stereum</i> spp. 260 bp/ <i>Ustulina deusta</i> 220 bp/ <i>Trametes</i> spp.	<i>P. fraxinea</i> <i>S. commune</i> , <i>S. radiatum</i> <i>S. hirsutum</i> , <i>S. rugosum</i> , <i>S. sanguinolentum</i> <i>U. deusta</i> <i>T. cervina</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>T. zonatella</i>
Mgano	211 bp/ <i>Ganoderma adspersum</i> 200 bp/ <i>Ganoderma applanatum</i> 193 bp/ <i>Ganoderma lucidum</i> 178 bp/ <i>Ganoderma resinaceum</i>	<i>G. adspersum</i> <i>G. applanatum</i> <i>G. lucidum</i> (provenienza europea) <i>G. resinaceum</i> , <i>G. lucidum</i> (provenienza nord americana)
Mhyme	258 bp/ <i>Fomitiporia</i> 225 bp/ <i>Fuscoporia</i> 254 bp/ <i>Pseudoinonotus</i> 265 bp/ <i>Inocutis</i> 214 bp/ <i>Inonotus</i> s.s. 173 bp/ <i>Phellinus</i> s.s.	<i>P. punctatus</i> , <i>P. robustus</i> <i>P. gilvus</i> , <i>P. torulosus</i> <i>I. dryadeus</i> <i>I. dryophilus</i> <i>I. andersonii</i> , <i>I. hispidus</i> <i>P. igniarius</i> , <i>P. tremulae</i> , <i>P. tuberculosus</i>

Nota: bp = paia di basi (unità di dimensione delle catene di DNA).

FIGURA 2 - DIAGRAMMA SCHEMATICO DEL METODO DI ANALISI



rapidità e l'intensità del processo degradativo che determinano (1,5). Il metodo consente, inoltre, di distinguere *Ganoderma adspersum*, *G. applanatum* e *G. resinaceum*, importanti agenti di carie e marciume radicale e causa di sradicamenti subdoli (1,5) da *G. lucidum* che, contrariamente agli altri *Ganoderma*, è di scarsa pericolosità. Il metodo si è dimostrato affidabile, rapido, ripetibile e consente l'identificazione dell'agente causale anche nei casi in cui assai

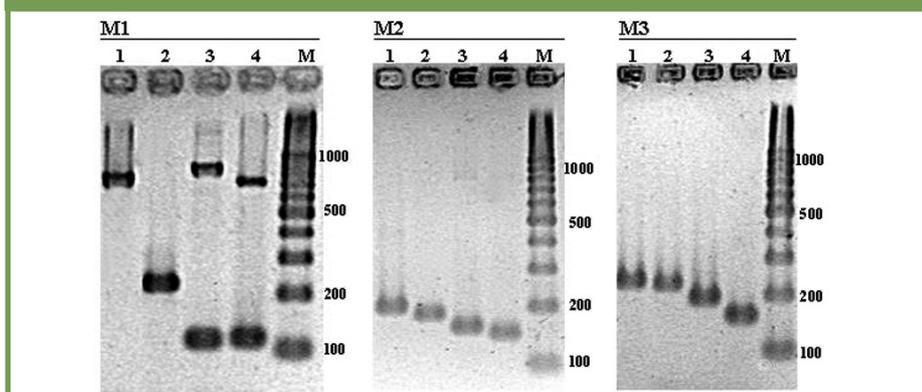
difficilmente si otterrebbe un risultato con le tecniche tradizionali. Da un punto di vista applicativo il metodo di analisi, utilizzato a Torino su campioni legnosi prelevati al colletto e sui contrafforti radicali, ha consentito la diagnosi precoce di focolai d'infezione di *Ganoderma resinaceum*, *Armillaria* spp. e *Perenniporia fraxinea* su piante asintomatiche su cui l'indagine VTA non aveva rilevato alcun tipo di anomalia strutturale. ■

(*) Lavoro svolto nell'ambito del progetto di ricerca "Problematiche fitosanitarie del verde urbano" finanziato dalla Città di Torino - Divisione verde pubblico.

Bibliografia

- 1) BERNICCHIA A., 2005. *Polyporaceae s.l.* Edizioni Candusso, Alassio (SV).
- 2) GONTHIER P., NICOLOTTI G., 2007. *Così simili, così diversi. Chiave per il riconoscimento dei più comuni funghi agenti di carie.* Il Verde Editoriale, Milano. Acer 3: 47-50.
- 3) GUGLIELMO F., BERGEMANN S.E., GONTHIER P., NICOLOTTI G., GARBELOTTO M., 2007. *A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees.* Journal of Applied Microbiology 103/5, 1490-1507.
- 4) GUGLIELMO F., GONTHIER P., GARBELOTTO M., NICOLOTTI G. *A PCR-based method for the identification of important wood rotting fungal taxa within Ganoderma, Inonotus s.l. and Phellinus s.l.* FEMS Microbiology Letters, sottoposto per la pubblicazione.
- 5) LONSDALE D., 1999. *Principles of tree hazard assessment and management.* Forestry Commission, London.
- 6) NICOLOTTI G., SOCCO L.V., MARTINIS R., GODIO A., SAMBUELLI R., 2003. *Application and comparison of three tomographic techniques for detection of decay in trees.* Journal of Arboriculture 29/2, 66-78.
- 7) NICOLOTTI G., GONTHIER P., PECOLLO D., 2004. *Ecologia e grado di preferenza d'ospite dei funghi agenti di carie.* Il Verde Editoriale, Milano. I parte. Acer 1, 47-51.
- 8) STALPERS J.A., 1978. *Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture.* Studies in Mycology 16: 1-248.
- 9) WAGNER, T., FISCHER M., 2002. *Proceedings towards a natural classification of the worldwide taxa Phellinus s.l. and Inonotus s.l., and phylogenetic relationships of allied genera.* Mycologia 94(6): 998-1016.

FIGURA 3 - I RISULTATI DI M1, M2, M3 VISUALIZZATI SU GEL DI AGAROSIO



In M1 si osservano il profilo di *Trametes versicolor* (colonna 1), *Ganoderma adspersum* (colonna 2), *Inonotus hispidus* (colonna 3), *Phellinus torulosus* (colonna 4). In M2 quelli di *Hericium erinaceum* (colonna 1), *Armillaria mellea* (colonna 2), *Pleurotus ostreatus* (colonna 3) e *Laetiporus sulphureus* (colonna 4). In M3 i profili di *Stereum* spp. (colonna 1), *Trametes* spp. (colonna 2), *Schizophyllum* spp. (colonna 3) e *Perenniporia fraxinea* (colonna 4). Nota: M = peso molecolare indicato in paia di basi (bp).

Abstract

DNA evidence

The detection and identification of wood rotting fungi in standing trees is crucial for the prediction of the severity and evolution of decay. In the case of very active root and butt rot fungi, an early identification method is important to establish the more appropriate Failure Risk Classification. In this work, a method to identify some of the most important and widespread decay fungi directly from wood has been developed. The approach is based on the application of taxon-specific primers combined in 5 multiplex Polymerase Chain Reactions (PCR). The whole method proved to be efficient and specific for the diagnosis and the early detection of the target fungi starting from DNA extracted directly from wood of standing trees.