ANNA PISAPIA

Il cerchio di fuoco

Tra i più dannosi patogeni forestali a livello mondiale, *Heterobasidion irregulare* è attualmente diffuso in Lazio tanto negli impianti boschivi quanto nei parchi urbani. Monitoraggio intenso e precauzioni durante i tagli colturali possono contrastare l'invasione

Heterobasidion irregulare is one of the most harmful forest pathogens in the world and is currently widespread in the pine stands and urban parks of Lazio. Intense monitoring and care when cutting can counter this invasion

Testo di **Paolo Gonthier**, Università di Torino, Dipartimento di scienze agrarie, forestali e alimentari; **Naldo Anselmi**, Università della Tuscia, Dipartimento per l'innovazione nei sistemi biologici, agroalimentari e forestali; **Matteo Garbelotto**, University of California - Berkeley, Department of environmental science, policy and management. Foto di **Paolo Gonthier**

Il pino domestico (*Pinus pinea*) è una delle specie arboree più rappresentative del paesaggio costiero italiano, tirrenico e adriatico. Oltre a essere coltivato in impianti artificiali per la produzione congiunta di pinoli e legname [1], è ampiamente utilizzato come specie ornamentale in ambito urbano e nei parchi, tanto da connotare, non senza conseguenze per manufatti e cittadini, il verde verticale della città di Roma e di altre importanti città italiane [10]. Dal punto di vista fitosanitario, la specie è suscettibile a infestazioni di insetti e a malattie, tra cui la processionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*), i disseccamenti dei getti da *Diplodia pinea* e ruggini (come *Cronartium* spp., *Melampsora* spp.). Oggi una delle principali emergenze è rappresentata dalla cimice americana *Leptoglossus occidentalis*, originaria degli Stati Uniti occidentali, segnalata in Italia nel 1999 e diffusa in diverse parti d'Europa. Tale insetto non è letale per la pianta ma, danneggiando i semi, costituisce minaccia la produzione di pinoli. In ambiente urbano l'insetto crea disagio poiché durante l'inverno cerca rifugio nelle abitazioni. *Heterobasidion irregulare* è un patogeno esoti- ▶

Le campagne di monitoraggio possono contrastare la diffusione di *H. irregulare*.
Monitoring campaigns may prevent the spread of *H. irregulare*.

ANGELO MAZZAGLIA

Corpi fruttiferi di *H. irregulare*; centri di mortalità di *Pinus pinea* a Castelporziano e San Felice Circeo (pagina accanto).
Fruiting bodies of *H. irregulare* and Italian stone pine mortality centers in Castelporziano and San Felice Circeo (front page).

◀ co ben più subdolo e potenzialmente nocivo, tanto da essere stato recentemente incluso dalla European and mediterranean plant protection organisation (Eppo) nella Alert list a livello europeo. Si tratta di un fungo di origine nordamericana agente di marciume radicale dei pini ed è annoverato tra i più dannosi patogeni forestali a livello mondiale [2]. È attualmente diffuso in Lazio in una fascia prevalentemente costiera estesa per oltre 100 km, dove provoca rilevante mortalità a gruppi di piante (centri di infezione o mortalità), a carico del pino domestico [8]. Sono qui discusse, sulla base della recente letteratura scientifica, le modalità di introduzione e invasione del patogeno esotico e presentati dati che indicano come il fungo sia frequente tanto in impianti forestali quanto nelle pinete o parchi urbani. Sono descritte le modalità di infezione e propagazione del fungo, anche alla luce di ricerche condotte in parchi urbani.

Introduzione e invasione

La prima segnalazione di *H. irregulare* in Italia risale al 2002 nella tenuta presidenziale di Castelporziano, nei pressi di Roma [9]. In base alla biologia del fungo, al luogo di ritrovamento e ad alcune ricostruzioni storiche, gli autori della segnalazione attribuirono l'introduzione del patogeno all'importazione di cassette, o altro materiale derivante da legname infetto non trattato, come da prassi durante la Seconda guerra mondiale, da parte della Quinta armata statunitense, che occupò i suoli della tenuta nell'estate del 1944. I risultati di un recente studio di genetica di popolazione di *H. irregulare* in Italia confermano che l'introduzione è riconducibile all'area di Castelporziano, ed escludono che vi possano essere state introduzioni multiple in diversi punti dell'attuale areale di distribuzione del patogeno [3]. Analisi genetiche sul patogeno hanno dimostrato che da Castelporziano, luogo di introduzione e di primo insediamento, il fungo si è poi diffuso verso Nord e soprattutto verso Sud grazie alla disseminazione delle spore e alla presenza di formazioni boschive anche di modesta dimensione, ma distanti circa 10 km l'una dall'altra. L'assenza di formazioni boschive adatte al suo insediamento in una fascia di circa 50 km tra Fregene e la Toscana ha invece rallentato l'invasione del fungo verso Nord [3].
Durante l'invasione, il fungo esotico si è ibridato in modo rilevante con *H. annosum* [6], un patogeno nativo simile per biologia ed ecologia, ma presente solo sporadicamente nelle pinete litoranee della costa tirrenica [8].

Distribuzione e frequenza

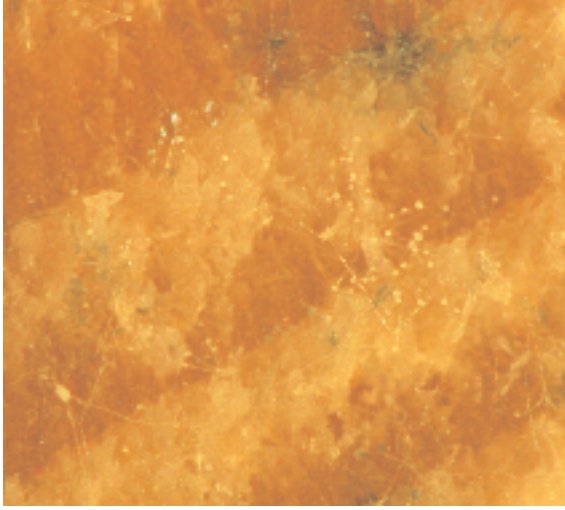
L'areale di distribuzione di *H. irregulare* si estende dalla pineta monumentale di Fregene, a Nord, fino a una piccola pineta urbana a San Felice Circeo (LT), a Sud. Nell'entroterra il fungo è stato segnalato a Castel di Guido (RM) in pinete di pino d'Aleppo (*Pinus halepensis*) e a Fossanova (LT) in formazioni forestali miste con pino domestico [5]. L'areale comprende anche la foresta di Sabaudia nel Parco nazionale del Circeo e la città di Roma, dove il fungo è stato segnalato sia a Villa Ada sia a Villa Doria-Pamphili [11]. A differenza della specie patogena nativa, *H. irregulare* è presente anche in alcuni popolamenti puri di querce caducifoglie [7], i quali potrebbero aver agito da formazio-

Summary

Root rot in urban pinewoods / *The circle of fire*

The North American pine-associated forest pathogen *Heterobasidion irregulare* was introduced in central Italy during Second world war. Research shows that the fungus also invaded urban pinewoods, thus threatening the health and stability of these stands.

The Italian stone pine (*Pinus pinea*) plays a key role in the coastal landscape of central Italy. The North American pine-associated root rot fungus *Heterobasidion irregulare* was introduced in Latium and is currently distributed in Italian stone pine stands along 103 km of coastline West of Rome. Potential consequences at the European level are significant, hence the fungus has been recently included in the Eppo Alert list. In this paper we review the pathways of introduction and invasion of the exotic fungus, and we provide evidence that



Disco di legno per captare spore di *Heterobasidion* spp.; colonia di *H. irregulare* nata dalla germinazione di una spora depositata.
Wood disk to catch spores of *Heterobasidion* spp.; *H. irregulare* colony growing from a single spore of the pathogen landed on it.

ni "ponte" favorendo la diffusione del fungo nelle formazioni a pino, che nella zona sono notoriamente molto frammentate. Dunque, sebbene la maggior parte della mortalità si manifesti in impianti monospecifici di pino domestico, il fungo è stato segnalato anche in pinete ornamentali tipicamente urbane.

Per verificare se la frequenza del fungo variasse in queste due diverse formazioni, si è proceduto a confrontare, in due annate diverse (marzo 2006 e maggio 2010), la frequenza e il grado di deposizione di spore del fungo in pinete ornamentali urbane (pineta monumentale di Fregene e pineta di via Terracina a San Felice Circeo) e in formazioni monospecifiche di pino domestico con sesto di impianto regolare (pineta di Castelfusano e pineta La Gallinara di Anzio).

I campionamenti di spore sono stati eseguiti utilizzando come captaspore dischi di legno fresco ottenuti dal sezionamento di abeti rossi sani [8]. I dischi, del diametro di circa 12 cm e dello spessore di 0,5 cm, sono stati esposti nelle pinete per 24 ore in capsule di Petri aperte contenenti carta assorbente sterile inumidita.

In funzione dell'estensione superficiale delle formazioni confrontate, sono stati allestiti da 3 a 23 punti di campionamento, in modo tale da coprire il più uniformemente possibile l'intera superficie delle pinete. Per ciascun punto di campionamento sono stati esposti 4 dischi di legno disposti a 5 m dal centro del punto di campionamento, lungo le direzioni cardinali. Dopo l'esposizione in pineta, i dischi sono stati incubati nelle capsule di Petri chiuse, a temperatura ambiente (24 °C), per circa 12-15 giorni. I dischi sono stati quindi ispezionati al microscopio stereoscopico per verificare la presenza di colonie di *Heterobasidion* derivanti dalla germinazione di ogni singola spora depositatasi durante il periodo di esposizione. Occorre precisare che mentre le colonie di *Heterobasidion* sono facilmente riconoscibili da quelle di altri funghi per via di alcune caratteristiche micromorfologiche, le colonie di *H. irregulare* sono morfologicamente indistinguibili da quelle della specie nativa *H. annosum*. Per escludere che le colonie potessero afferire a quest'ultima specie, un congruo campione di colonie (fino a un massimo di 10 per ciascun disco) sono state isolate in coltura pura mediante espianto su substrato agarizzato. L'identificazione degli isolati di *Heterobasidion* a livello specifico e la conseguente assegnazione delle spore alla specie esotica sono avvenute mediante una serie di analisi molecolari condotte con Polymerase chain reaction (Pcr), basate sia sul Dna nucleare sia sul Dna mitocondriale [8]. Per ogni punto di campionamento è stato calcolato il valore normalizzato di numero di colonie (spore), tenendo conto della superficie dei dischi e del tempo di esposizione in pineta. Tale valore, noto come grado di deposizione, è stato espresso in numero di spore/m^2 h^1. Sebbene la frequenza dei punti di campionamento interessati dalla deposizione di spore e soprattutto il grado di deposizione di spore siano risultati variare anche in modo rilevante a seconda dei periodi di campionamento in uno stesso sito e, nell'ambito di uno stesso periodo di campionamento, da sito a sito (vedi tabella a pag. xx), le differenze osservate non sono mai state significative ($P > 0,05$; test di Kruskal-Wallis o test di Mann-Whitney U, usando come repli- ▶

its presence is not limited to monospecific Italian stone pine plantations but encompasses urban parks and even small patches of pines. Furthermore, insights into the infection biology of the fungus are given, based on observations and experiments conducted in urban parks.

Heterobasidion irregulare was reported for the first time in Italy in 2002 in the presidential estate of Castelporziano, near Rome. All lines of evidence, including the results of a recent population genetics study, point to an introduction through military equipments made of untreated lumber from infected trees during Second world war. Once established in Castelporziano, the fungus spread North and South, and massively hybridized with *H. annosum*, a native interfertile pathogen. The distribution of the pathogen in Italy has been recently reviewed. To determine if its frequency may differ in urban parks and in monospecific pine plantations, an analysis of the pathogenic airspora was performed by using the wood disk exposure method in four sites during two different periods.

PUNTI INTERESSATI DA *HETEROBASIDION IRREGULARE* E GRADO DI DEPOSIZIONE MEDIO DEL FUNGO IN PINETE URBANE E FORMAZIONI MONOSPECIFICHE DI PINO DOMESTICO, IN DUE DIVERSI PERIODI

Tipologia di area verde	Superficie (ha)	Campionamenti marzo 2006			Campionamenti maggio 2010		
		Punti di campionamento (n.)	Punti con spore di *H. irregulare* (%)	Grado di deposizione medio del fungo (n. spore/ m^2 h^1)	Punti di campionamento (n.)	Punti con spore di *H. irregulare* (%)	Grado di deposizione medio del fungo (n. spore/ m^2 h^1)
Parchi urbani							
Pineta monumentale di Fregene	18,7	6	100	15,171 a	23	65	130,082 a
Pineta di via Terracina a San Felice Circeo	0,3	3	33	3,656 a	-	-	-
Impianti monospecifici							
Pineta di Castelfusano	400,0	13	85	12,738 a	3	100	255,827 a
Pineta La Gallinara di Anzio	124,0	11	91	13,060 a	-	-	-

Nell'ambito dello stesso periodo di campionamento, i valori di grado di deposizione contraddistinti dalla stessa lettera non differiscono significativamente (P > 0,05).

◄ cati i valori di ciascun punto di campionamento). Inoltre, confrontando il grado di deposizione medio tra pinete ornamentali urbane e formazioni monospecifiche di pino domestico con sesto di impianto regolare non emergono differenze significative (P > 0,05; test di Mann-Whitney U). Il grado di deposizione più basso è stato registrato nella pineta urbana di San Felice Circeo e ciò potrebbe essere imputabile, più che alla connotazione urbana della pineta, alla sua modesta estensione o al fatto che essendo localizzata ai margini dell'areale di invasione potrebbe essere stata colonizzata dal fungo solo di recente.

Taglio di potatura di *Pinus pinea*.
Pruning wound on Italian stone pine.

Infezione e propagazione

H. irregulare è notoriamente in grado di infettare mediante spore superfici fresche di taglio. Considerata la sua rilevante presenza anche in pinete urbane periodicamente sottoposte a potature, alcune ricerche e osservazioni sono state condotte nella pineta monumentale di Fregene per verificare se le ferite di potatura potessero essere bersaglio di infezione.

Le ferite di potatura

Nel mese di ottobre del 2010, con un cestello elevatore, si è proceduto a prelevare campioni sia da speroni di grossi rami (20 rotelle di 2 cm di spessore prelevate da altrettanti speroni) potati nel giugno precedente, sia da grossi speroni da potature passate (5-10 anni), con evidenti carie in atto (50 campioni consistenti in rotelle o, in caso di tessuti molto cariati, di opportuni tasselli). Per ciascun campione sono state allestite camere umide e tentati isolamenti *in vitro* per verificare la presenza del patogeno all'interno dei tessuti legnosi. Negli speroni di potature recenti non è mai stato riscontrato *H. irregulare*, mentre nei vecchi tagli di potatura con carie in atto il fungo è stato isolato in un solo campione (0,014% dei casi), a dimostrazione che il patogeno può insediarsi in via del tutto occasionale in ferite di potatura. Trattandosi di un agente di marciume radicale è escluso che un'infezione tramite ferita di potatura possa avere conseguenze fitopatologiche rilevanti sulla pianta. Tuttavia la differenziazione di corpi fruttiferi in corrispondenza di ferite di potatura poste in alto potrebbe avere rilevanza epidemiologica, poiché potrebbe consentire una distanza potenziale di disseminazione delle spore assai più elevata rispetto a quella comu-

nemente raggiungibile da spore differenziatisi in corpi fruttiferi posti al livello del suolo, stimata al massimo in poche centinaia di metri [2]. Dalle accurate e numerose osservazioni (300-400 per anno) effettuate dal 2010 al 2012 tramite cestello elevatore sui vecchi tagli di potatura a Fregene, non sono mai stati osservati corpi fruttiferi di *H. irregulare*.

Le ceppaie

In linea con la biologia di tutte le specie di *Heterobasidion*, decisamente più importante è il ruolo delle ferite alla base dell'albero e soprattutto delle ceppaie fresche di taglio, che possono infettarsi a opera delle spore e su cui il fungo fruttifica [2]. In seguito a tale infezione primaria si osserva quasi sempre un'infezione secondaria di piante limitrofe sane mediante propagazione del micelio tramite contatti radicali tra ceppaia e pianta o tra pianta e pianta. È stato stimato che questa trasmissione secondaria nel Lazio proceda a una velocità di circa 40 cm annui [5]. Il fungo è incapace di vivere nel suolo, quindi tale espansione richiede presenza di contatti o anastomosi radicali tra diversi individui.

Ceppaia di *Pinus pinea* con abbondanti fruttificazioni di *Heterobasidion irregulare*.
Italian stone pine stump with abundant fruiting bodies of *Heterobasidion irregulare*.

Interpretare e gestire l'emergenza

Trattandosi di una specie esotica agente di una delle principali malattie forestali, lo stato di allerta è massimo soprattutto per il comparto forestale. La sua rilevante presenza nelle pinete e nei parchi urbani indica però che il patogeno può insediarsi efficacemente anche in questi contesti. Tale presenza non dovrebbe essere sottovalutata poiché il patogeno è letale e, portando a morte le piante, può vanificare investimenti di durata decennale. Inoltre la presenza del patogeno, spesso in pini ancora asintomatici, può essere un grave fattore di instabilità della pianta e può favorire schianti anche in presenza di vento debole [5]. Tale instabilità è un elemento notoriamente importante in ambiente urbano e nei parchi. Va sottolineato che la diagnosi precoce (prima della comparsa dei sintomi) è assai difficile, se non avvalendosi di tecniche di biologia molecolare. Inoltre i primi sintomi potrebbero comparire solo quando oltre i due terzi dell'apparato radicale sono già compromessi [2]. Considerata la notevole estensione dell'areale di distribuzione del patogeno e la sua associazione con gli apparati radicali, l'eradicazione del fungo è improponibile [5]. Le risorse economiche devono essere utilizzate per intense campagne di monitoraggio volte a contrastare la diffusione del patogeno. Nei parchi e nelle pinete urbane colonizzate da *H. irregulare* occorre procedere al tempestivo abbattimento delle piante morte e sintomatiche e al loro interramento in discarica. Le ceppaie delle piante infette, comprese le radici con diametro superiore ai 5 cm, vanno estratte e smaltite come descritto in precedenza. Poiché è probabile che il patogeno sia stato introdotto tramite legno infetto, il legname (inclusa la legna da ardere) proveniente da zone colonizzate non deve essere trasportato al di fuori dell'attuale zona di invasione per evitare nuove introduzioni. Per impedire l'infezione delle ceppaie derivanti dall'abbattimento di piante sane e interrompere quindi il ciclo biologico del patogeno, la superficie fresca di taglio deve essere trattata tempestivamente con urea in soluzione acquosa al 30% di concentrazione. Sebbene il patogeno esotico produca spore tutto l'anno [4], la loro concentrazione nell'aria è ▶

The results indicate that the spore deposition rates of *H. irregulare*, expressed as the number of spores/m^2 h^1, to be similar ($P > 0,05$) in these two habitat types (table page XX).
Attempts of fungal isolations performed on samples collected in the Fregene monumental pinewood from 70 pruning wounds on Italian stone pine suggest the fungus may occasionally infect through pruning wounds (infected wounds: 0,014%). However, this infection court should be regarded as of minor importance compared to freshly cut stumps, that are susceptible of airborne infections and may allow the spread of the pathogen through root contacts to neighbouring healthy trees. As weakening of root systems leads to increased chance of windthrow, threats associated with *H. irregulare* are posed not only by tree mortality, but also by tree uprootings, which may be important in recreational sites. It should be noted that up to two-thirds of a root system may be decayed before symptoms appear in the crown, hence the disease may be undetectable at an early stage through visual analysis.

Antica via romana nei pressi di Nettuno (RM), zona colonizzata da *H. irregulare*.
Old Roman road at Nettuno (Rome): the area is infested by *H. irregulare*.

◄ minore in estate che in autunno. Per limitare il rischio di nuove infezioni, i tagli e le potature dovrebbero quindi essere effettuate di preferenza nel periodo tardo estivo anziché in quello autunnale. Nella realizzazione di nuovi impianti o di reimpianti, occorrerebbe distanziare le piante quanto più possibile per ridurre la probabilità di contatti radicali e conseguentemente il rischio di trasmissione della malattia in età adulta. È infine opportuno sottolineare che nonostante la velocità di invasione del fungo sia stata stimata in meno di 2 km annui [8], tutti i calcoli si basano sul territorio laziale, dove i popolamenti boschivi sono rari e frammentati. In assenza di frammentazione, come per esempio nelle pinete costiere che dalla Toscana giungono fino alla penisola iberica, la velocità di invasione subirebbe una significativa accelerazione [3]. È quindi fondamentale impedire che il patogeno si diffonda al di fuori del Lazio, dove la frammentazione degli habitat forestali gioca a nostro favore. ■

Si ringraziano tutti i collaboratori che hanno coadiuvato i lavori di ricerca in campo e in laboratorio. La ricerca è stata finanziata dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca nell'ambito del programma "Progetti di ricerca di rilevante interesse nazionale" (Prin).

Bibliografia

1) Bernetti G., 1998. *Selvicoltura speciale*. Utet, Torino, p. 415.

2) Garbelotto M., Gonthier P., 2013. *Biology, epidemiology, and control of* Heterobasidion *species worldwide*. Annual Review of Phytopathology 51, 39-59.

3) Garbelotto M., Guglielmo F., Mascheretti S., Croucher P.J.P., Gonthier P., 2013. *Population genetic analyses provide insights on the introduction pathway and spread patterns of the North American forest pathogen* Heterobasidion irregulare *in Italy*. Molecular Ecology 22, 4855-4869.

4) Garbelotto M., Linzer R., Nicolotti G., Gonthier P., 2010. *Comparing the influences of ecological and evolutionary factors on the successful invasion of a fungal forest pathogen*. Biological Invasions 12, 943-957.

5) Gonthier P. *et al*., 2014. *An integrated approach to control the introduced forest pathogen* Heterobasidion irregulare *in Europe*. Forestry, in stampa, 10.1093/forestry/cpu015.

6) Gonthier P., Garbelotto M., 2011. *Amplified fragment length polymorphism and sequence analyses reveal massive gene introgression from the European fungal pathogen* Heterobasidion annosum *into its introduced congener* H. irregulare. Molecular Ecology 20, 2756-2770.

7) Gonthier P., Lione G., Giordano L., Garbelotto M., 2012. *The American forest pathogen* Heterobasidion irregulare *colonizes unexpected habitats after its introduction in Italy*. Ecological Applications 22, 2135-2143.

8) Gonthier P., Nicolotti G., Linzer R., Guglielmo F., Garbelotto M., 2007. *Invasion of European pine stands by a North American forest pathogen and its hybridization with a native interfertile taxon*. Molecular Ecology 16, 1389-1400.

9) Gonthier P., Warner R., Nicolotti G., Mazzaglia A., Garbelotto M., 2004. *Pathogen introduction as a collateral effect of military activity*. Mycological Research 108, 468-470.

10) Morelli G., Raimbault P., 2011. *Un cittadino sconosciuto*. Il Verde Editoriale, Milano. ACER 3: 20-30.

11) Scirè M., D'Amico L., Motta E., Annesi T., 2008. *North American P type of* Heterobasidion annosum *shows pathogenicity towards* Pinus halepensis *in Italy*. Forest Pathology 38, 299-301.

The distribution area of *H. irregulare* is too vast to suggest eradication. Management guidelines include the prompt removal of dead and declining trees, including stumps and roots with a diameter > 5 cm, from infested sites. Freshly cut stump surfaces from healthy trees must be treated with 30% urea solution in order to prevent airborne infections. Although spores of *H. irregulare* may be present year-round, cutting and pruning could be performed in summer, to minimize the infection risk. The rate of spread of the exotic pathogen has been estimated at less than 2 km per year. However, it should be noted that available habitats (forest stands) are extremely fragmented in the infestation area. Research suggests that in regions where available habitats are less fragmented (such as the pine stands stretching from Tuscany to Northeastern Spain, or the Scots pine plantations of Central and Northern Europe), the spread rate may increase significantly. Thus, the movement of infected wood outside the current zone of infestation should be avoided.