



**Diagnosi molecolare  
dei funghi cariogeni su alberi ornamentali e  
monumentali:  
stato dell'arte e nuove prospettive**

**Matteo GARBELOTTO<sup>1</sup> e Paolo GONTHIER<sup>2</sup>**

**<sup>1</sup> ESMP – Università della California, Berkeley**

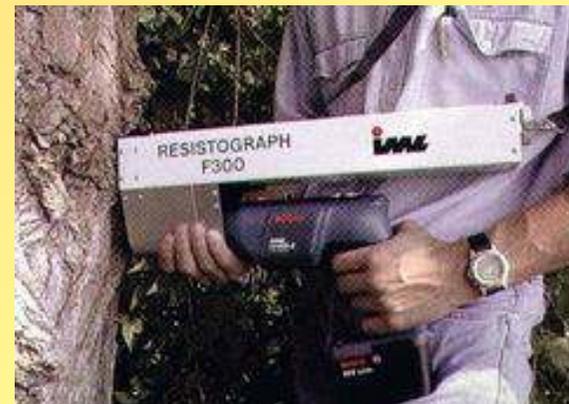
**<sup>2</sup> DIVAPRA – Patologia Vegetale, Università degli Studi di Torino**



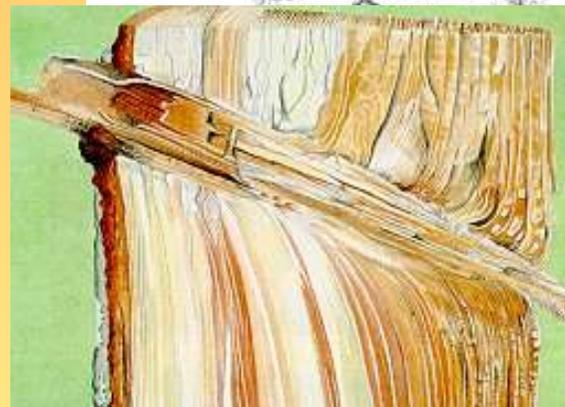
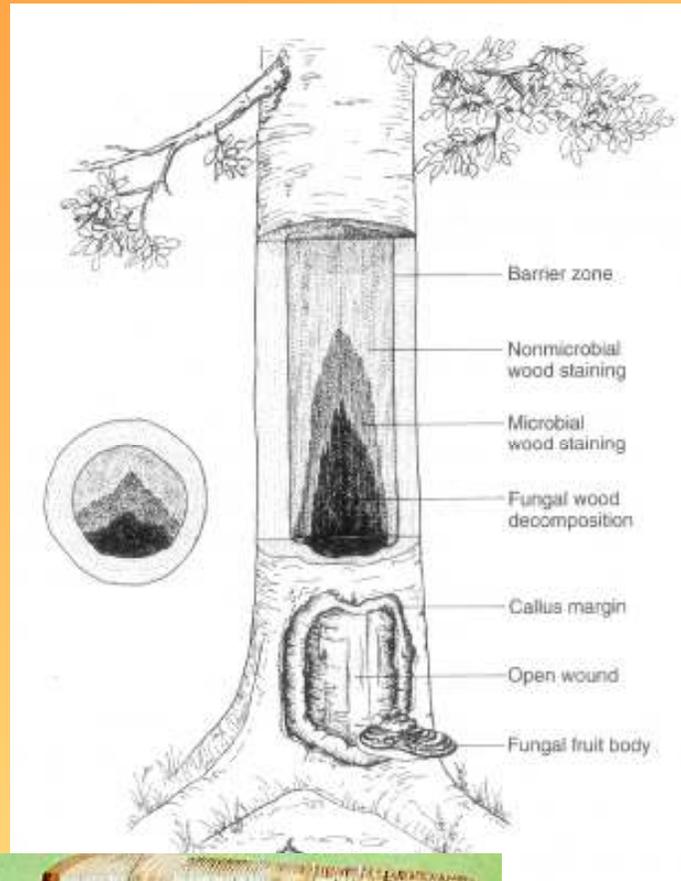
## Il metodo migliore per individuare carie su piante in piedi



# Resistograph



# Individuazione delle carie in base all'esame visivo di sintomi e segni



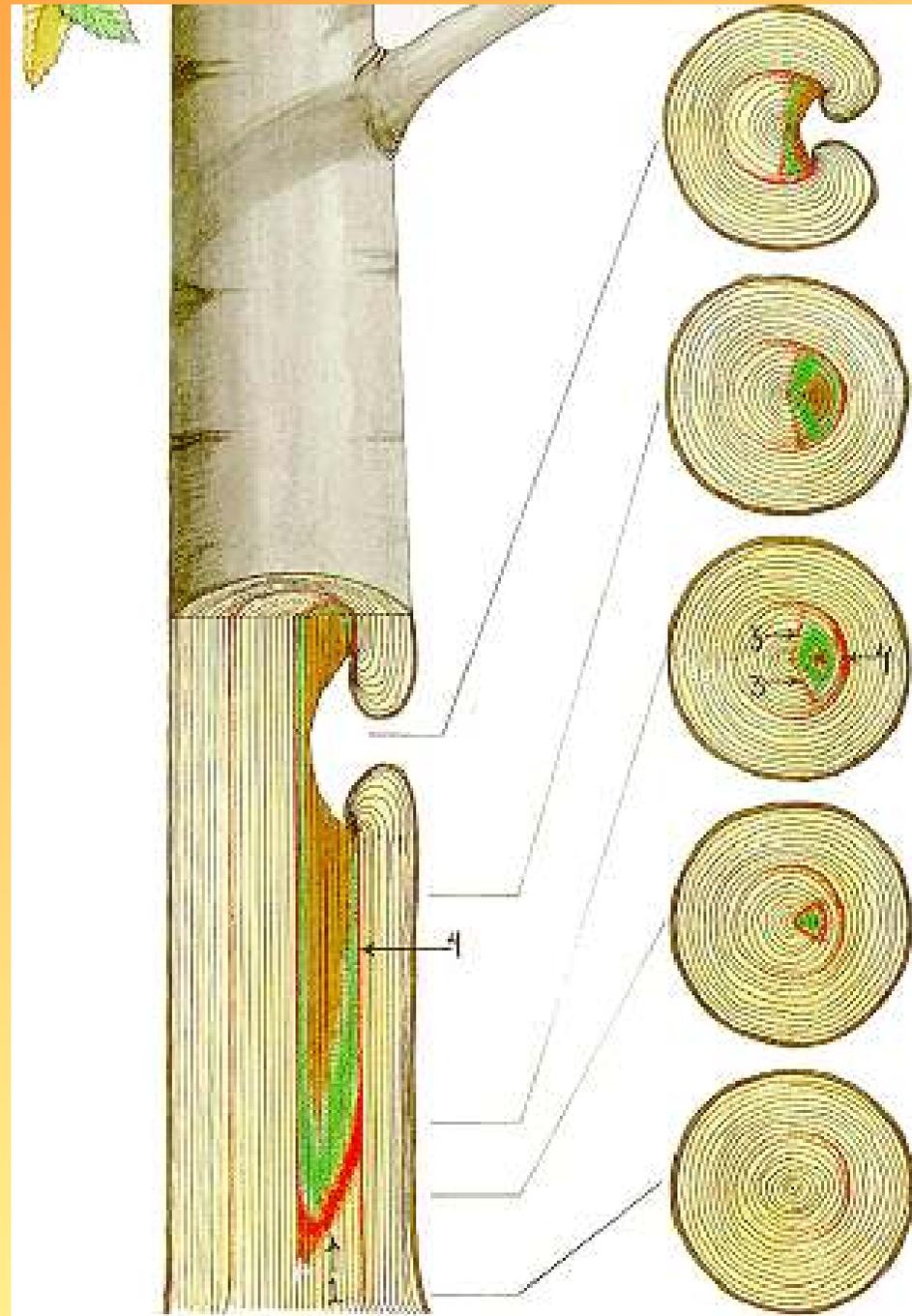
**La presenza di un corpo fruttifero consente la diagnosi (identificazione dell'agente patogeno)**



**cruciale per la prognosi poiché specie diverse:**

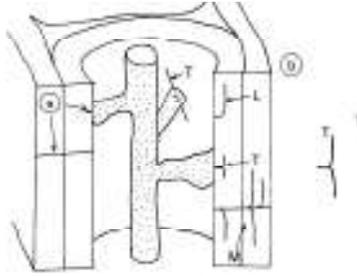
- possono presentare gradi di patogenicità diversi;**
- hanno diversa capacità lignivora;**
- possono differire nella loro capacità di superare le zone di reazione nella pianta.**



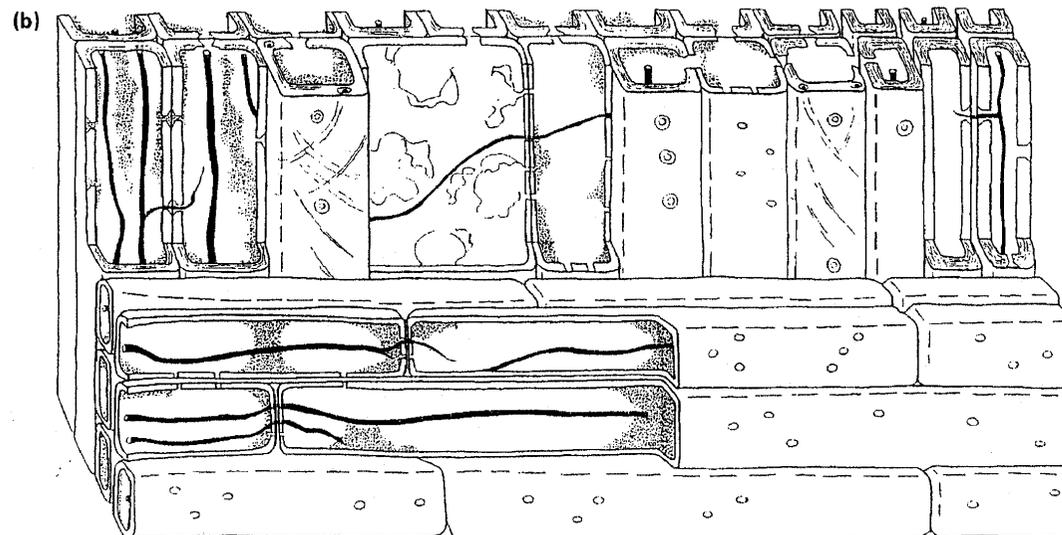
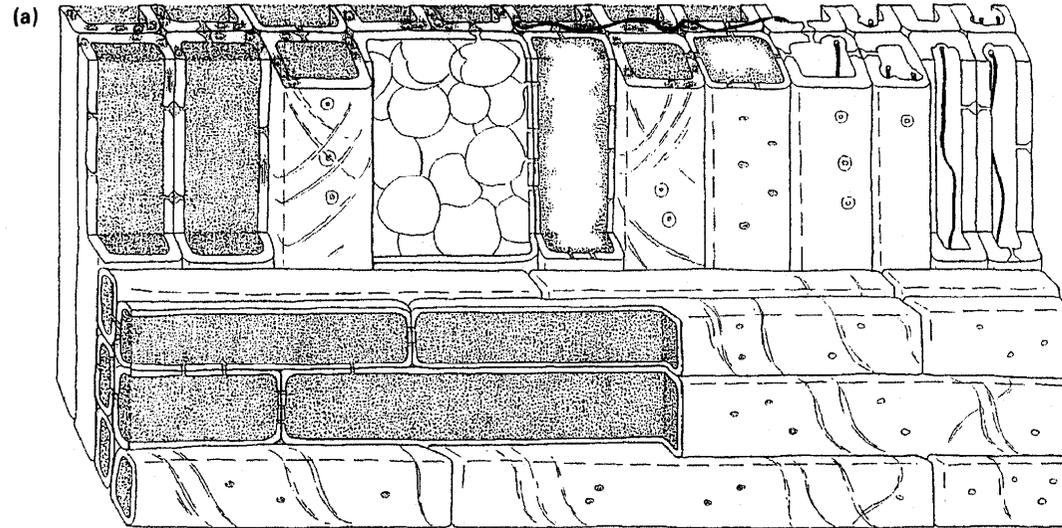


**Teoria CODIT e della  
zona di reazione**

Da Eaton and Hale (1993)



## *Inonotus hispidus*



## *Ganoderma adspersum*

Da Schwarze and Baum (2000)

## Ma i corpi fruttiferi....

- in alcune specie sono stagionali;
- in genere compaiono tardivamente;
- in ambiente urbano o su suoli costipati possono non comparire affatto;
- talvolta presentano caratteristiche morfologiche molto simili anche tra specie diverse.



*Ganoderma resinaceum*



*Perenniporia fraxinea*

# Protocollo diagnostico basato su M-PCR per la diagnosi di funghi agenti di carie (latifoglie)

Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

## A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees

F. Guglielmo<sup>1</sup>, S.E. Bergemann<sup>2</sup>, P. Gonthier<sup>1</sup>, G. Nicolotti<sup>1</sup> and M. Garbelotto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Exploitation and Protection of the Agricultural and Forestry Resources, University of Torino, Grugliasco, TO, Italy;

<sup>2</sup> Ecosystem Sciences Division, Department of Environmental Science, Policy and Management, University of California, Berkeley, USA

14

Nicolotti et al.: Detection of Wood Decay Fungi



Arboriculture & Urban Forestry 2009, 35(1):14-19.



## A Biomolecular Method for the Detection of Wood Decay Fungi: A Focus on Tree Stability Assessment

Giovanni Nicolotti, Paolo Gonthier, Fabio Guglielmo, and Matteo M. Garbelotto



RESEARCH LETTER

## A PCR-based method for the identification of important wood rotting fungal taxa within *Ganoderma*, *Inonotus* s.l. and *Phellinus* s.l.

Fabio Guglielmo<sup>1</sup>, Paolo Gonthier<sup>1</sup>, Matteo Garbelotto<sup>2</sup> & Giovanni Nicolotti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Exploitation and Protection of the Agricultural and Forestry Resources, University of Torino, Grugliasco, TO, Italy; and <sup>2</sup>Department of Environmental Science, Policy and Management, Ecosystem Sciences Division, University of California, Berkeley, USA

## Taxa fungini inclusi nel metodo diagnostico

- *Armillaria* spp. (Agaricales, Marasmiaceae)
- *Ganoderma* spp. (Polyporales, Ganodermataceae)
- *Hericium* spp. (Russulales, Hericiaceae)
- *Inonotus/Phellinus* spp. (Hymenochaetales, Hymenochaetaceae)
- *Laetiporus* spp. (Polyporales, Polyporaceae)
- *Perenniporia fraxinea* (Polyporales, Polyporaceae)
- *Pleurotus* spp. (Agaricales, Pleurotaceae)
- *Schizophyllum* spp. (Agaricales, Schizophyllaceae)
- *Stereum* spp. (Russulales, Stereaceae)
- *Trametes* spp. (Polyporales, Polyporaceae)
- *Kretzschmaria deusta* (Xylariales, Xylariaceae)

4 gruppi

6 gruppi  
(Wagner and Fischer  
2002)

**Principali funghi bersaglio sulle latifoglie**

# Protocollo diagnostico basato su M-PCR

Campione di legno



Estrazione del DNA

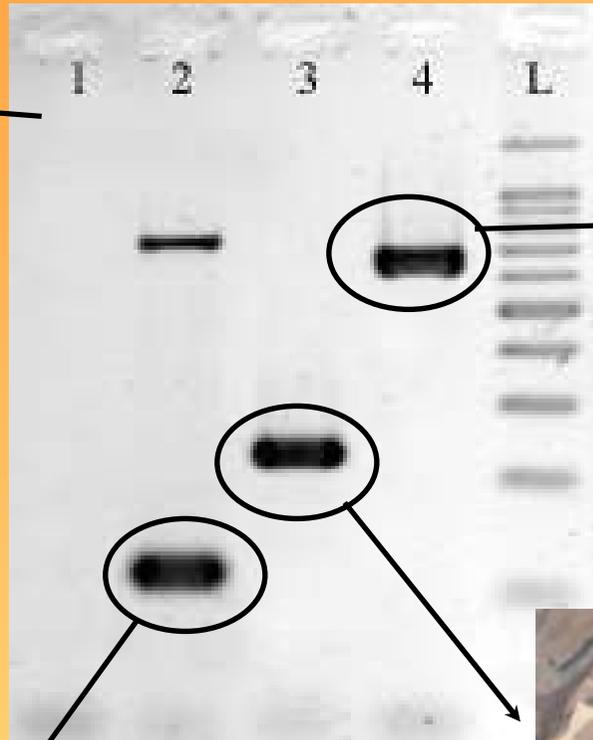


M1



# M1: interpretazione dei risultati

No DNA  
fungino



**Fungi**  
(no *Ganoderma*;  
no *Inonotus/Phellinus*)



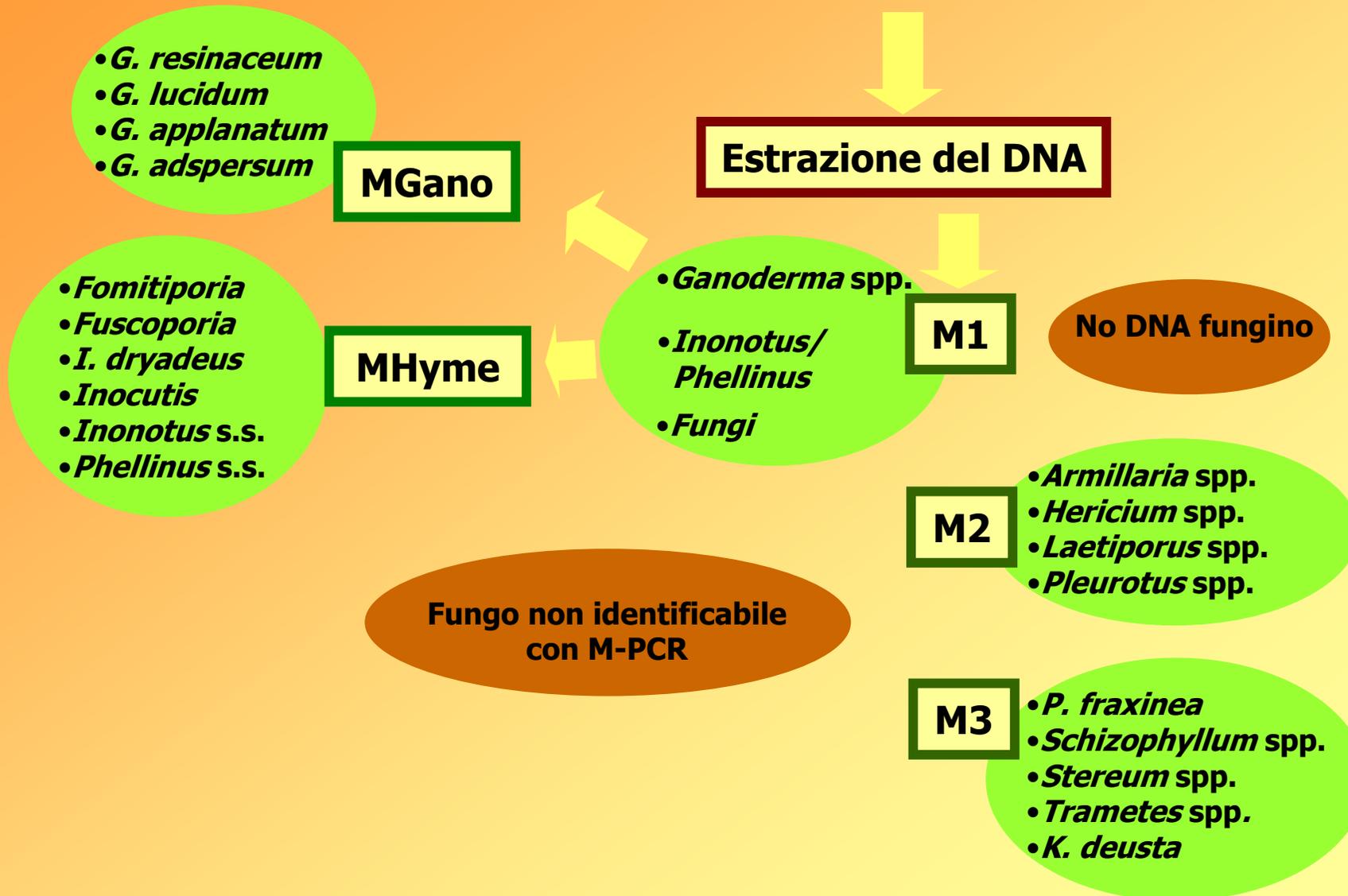
115 bp:  
***Phellinus/ Inonotus***



228 bp:  
***Ganoderma***

# Protocollo diagnostico basato su M-PCR

Campione di legno



# **Protocollo diagnostico basato su M-PCR: applicazioni**

## **Metodo complementare al VTA:**

**Piante con carie sospetta o evidente**

**Identificazione fungo supporto nella prognosi**

## **Monitoraggio fitopatologico:**

**Indagine sistematica su alberate urbane e parchive**

**Individuazione precoce piante potenzialmente pericolose**

# Protocollo diagnostico basato su M-PCR: applicazioni

Piante senza segni e/o sintomi evidenti di carie  
(indagini sistematiche)

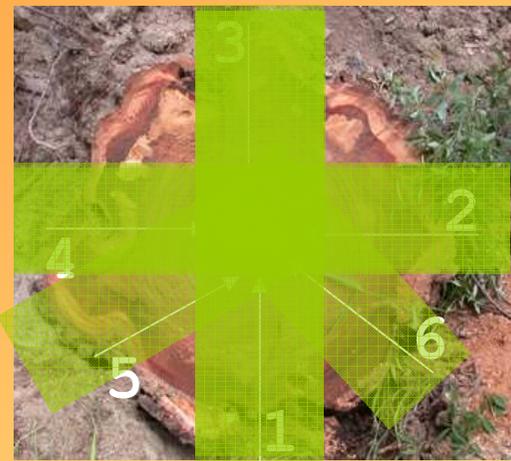
Messa a punto di un metodo di  
campionamento efficiente ed affidabile



# Messa a punto metodo di campionamento tramite forature



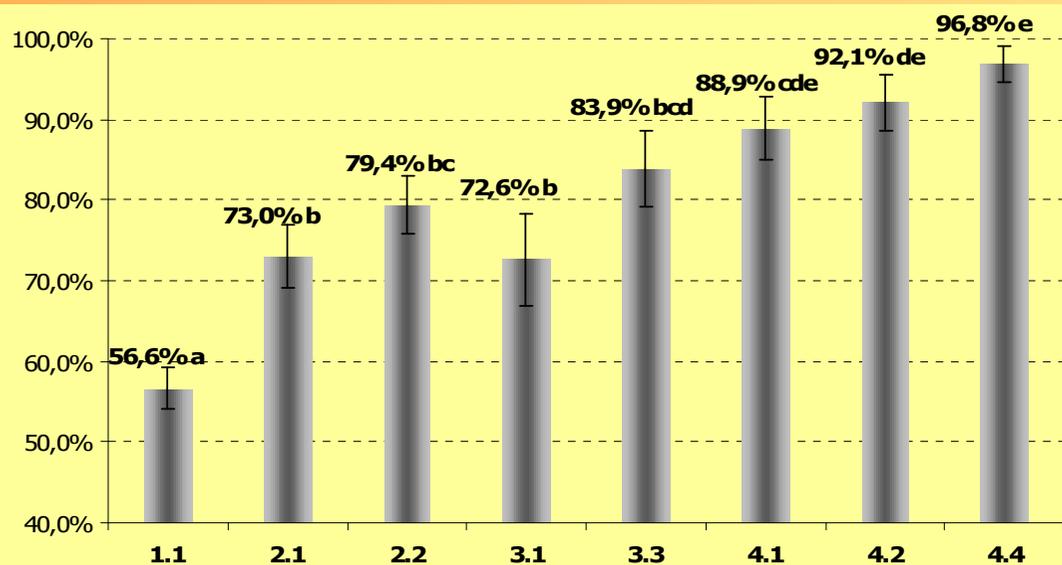
**Forature al colletto con trapano**



**Schema di campionamento**



**Miscela dei trucioli derivanti dalle forature**



**Efficienza diagnostica = 89%**

## Considerazioni sul metodo di campionamento

- 3 diverse opzioni disponibili: 2:1 (ampi monitoraggi), 4:1 (minimizza i falsi negativi, ma non è l'opzione più efficace), 4:2 (opzione più efficace per indagini su singola pianta);
- la scelta del metodo è funzione del tipo di attività (monitoraggio vs. diagnosi su singola pianta) e del costo;
- ricerca realizzata su piante con diametro  $< 120$  cm; su piante di maggior diametro potrebbe essere opportuno operare un numero maggiore di forature.

## Risultati di applicazioni di M-PCR: confronto frequenza piante infette/piante con segni

N= 468 piante



Taxa fungini	Diagnosi M-PCR	Diagnosi visiva
<i>Armillaria</i> spp.	36	0
<i>Inonotus/Phellinus</i> spp.	18	1
<i>Perenniporia fraxinea</i>	10	3
<i>Ganoderma</i> spp.	7	2
<i>Kretzschmaria deutsa</i>	7	1
Tot. alberi infetti	78	7

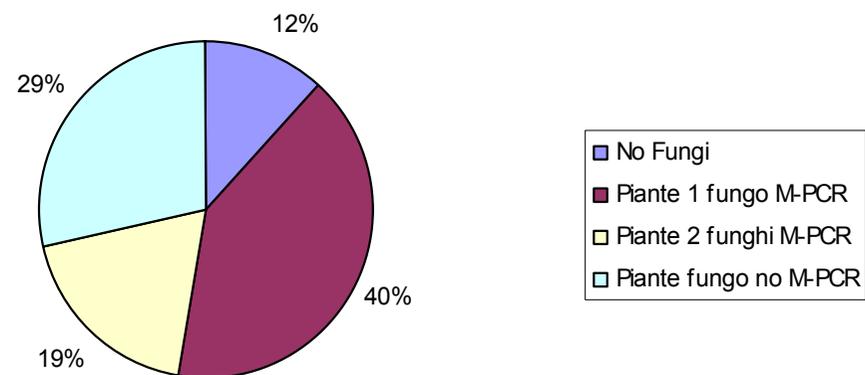
**Solo il 9% delle piante infette manifesta corpi fruttiferi**

## Risultati di applicazioni di M-PCR: Presenza simultanea di più specie lignivore



**Frequenza rilevata  
mediante M-PCR su  
piante schiantate**

**N= 42**



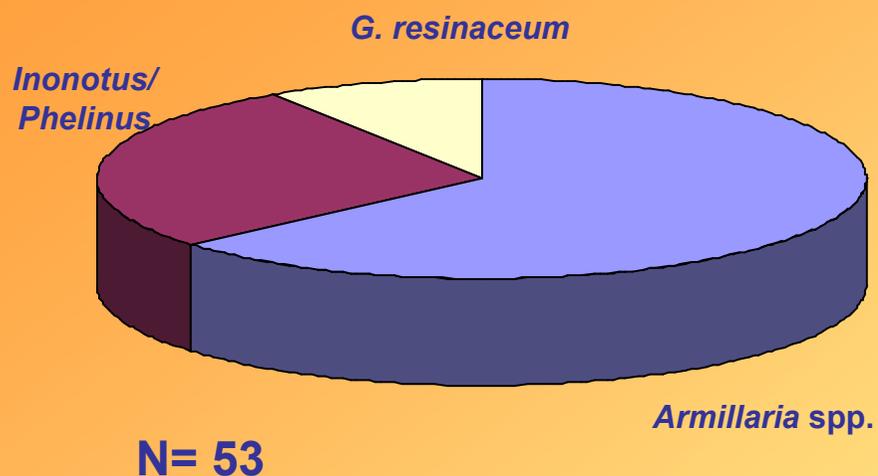
## Alcune note ecologiche derivanti dall'applicazione del metodo diagnostico negli Stati Uniti d'America

Specie ospite	Località	Taxa fungini
Torrey Pine	San Diego	<i>Hericium and schizophyllum</i>
Valley Oak	Livermore	<i>Laetiporus</i>
Magnolia	Sonoma	<i>Armillaria</i>
Tree of Heaven	Glendale	<i>Pleurotus</i>
Tree of Heaven	Glendale	<i>Armillaria</i>
Monterey Cypress	Soquel	<i>Oligoporus balsmeus</i>
Birch	Wheatland	<i>Ganoderma</i> spp.
Coast Live Oak	Palo Alto	<i>Ganoderma applanatum</i>
Coast Live Oak	Cupertino	<i>Ganoderma</i> spp.
Eucalyptus globulus	Ventura	<i>Laetiporus gilbertsonii</i>
Coast Live Oak	Mountain View	<i>Ganoderma applanatum</i>
Peach Tree	Gridley	<i>Phellinus pomaceus</i>

- 1- *Ganoderma applanatum* non è associato ai cedimenti più gravi, ma altre specie di *Ganoderma* lo sono (es. *Ganoderma lucidum*);
- 2- piante colonizzate da *Armillaria* o *Laetiporus* dovrebbero essere controllate assiduamente. In modo particolare, *Eucalyptus* è molto suscettibile;
- 3- *Phellinus pomaceus* è responsabile dello sbrancamento di alberi da frutto e altre latifoglie.

Alcune note ecologiche derivanti dall'applicazione del metodo diagnostico in Italia

Frequenza inaspettatamente elevata di *Armillaria* spp.

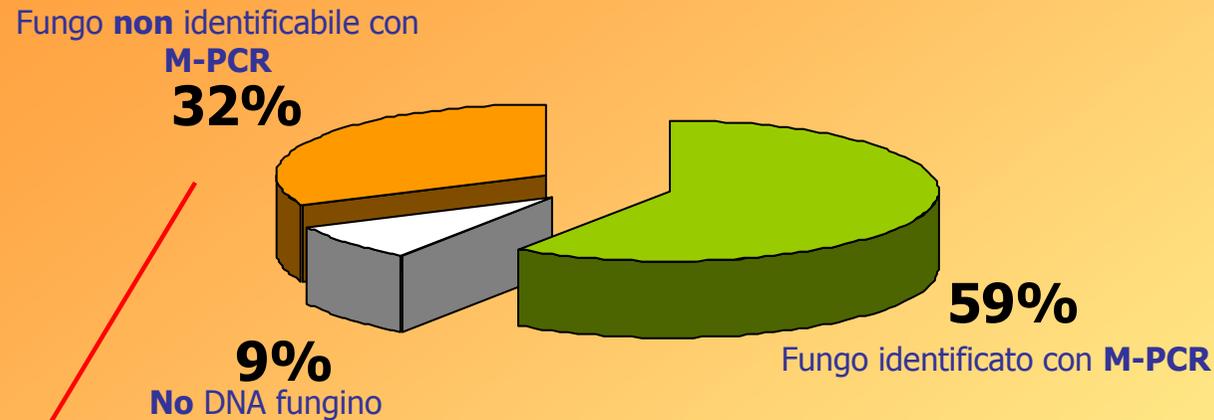


Fungo più frequente su platani con anomalie al colletto



*Armillaria* associata a schianti di *Ulmus* sp., *Celtis australis*, *Populus nigra*

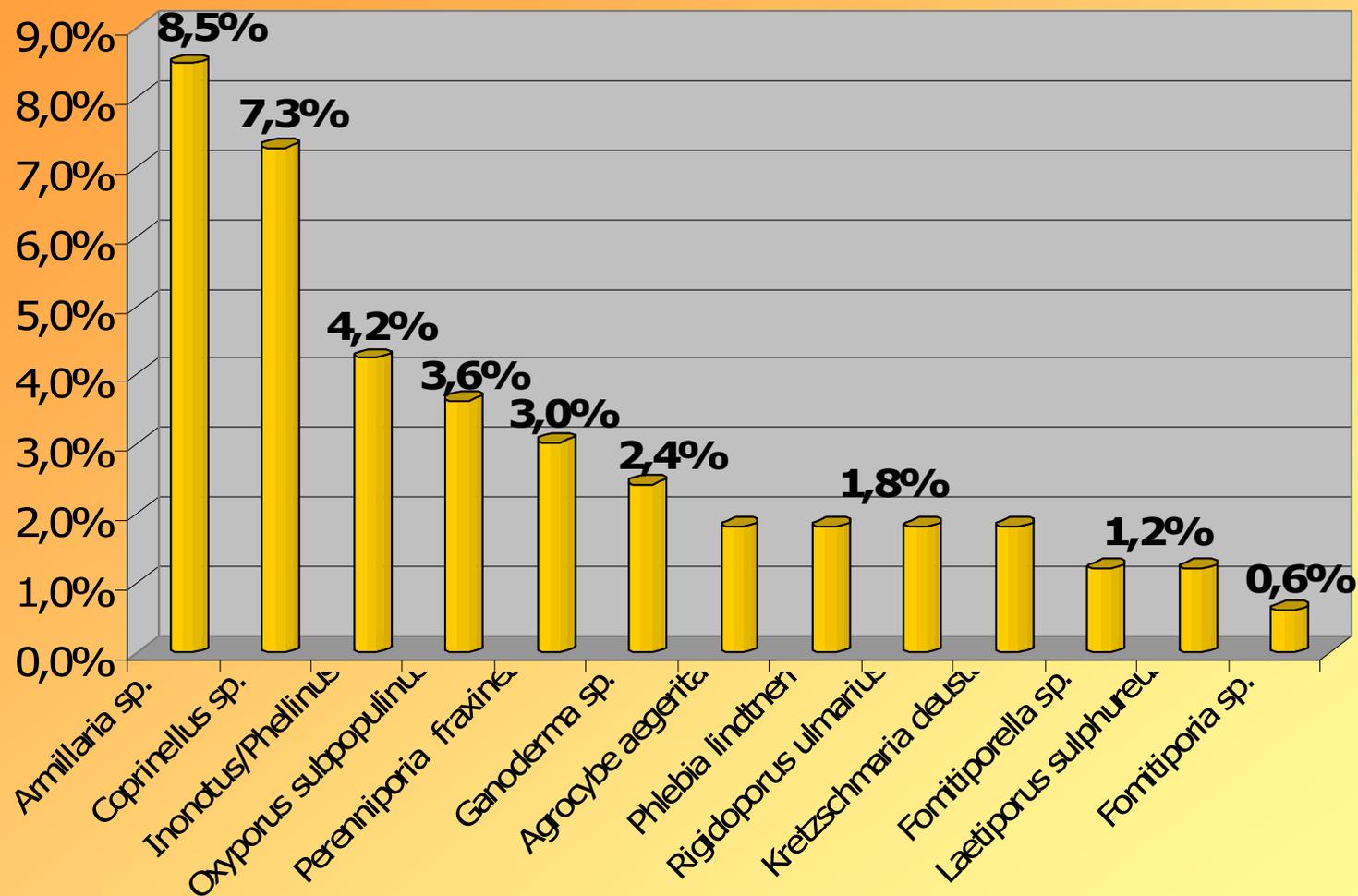
# Frequenza relativa di piante schiantate colonizzate da funghi bersaglio e da altri funghi



**Molti funghi sfuggono alla diagnosi, alcuni dei quali sono certamente associati all'instabilità delle piante**

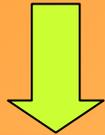
**identificazione dei funghi non diagnosticabili mediante M-PCR tramite sequenziamento e analisi nBLAST**

## Frequenza funghi identificati con M-PCR e sequenziamento del DNA



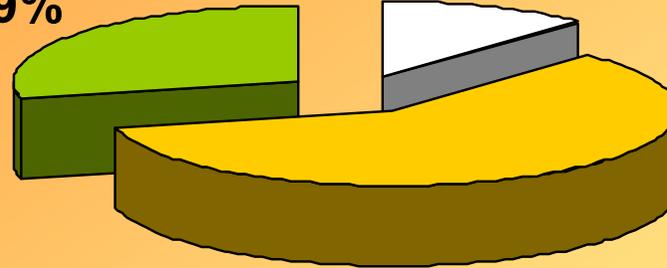
# Esito dell'applicazione di M-PCR su conifere (*Cedrus* spp. – *Pinus* spp.)

Fungo identificato con M-PCR



<i>Armillaria</i> spp.	<b>9</b>
<i>Inonotus-Phellinus</i>	<b>3</b>
<i>Ganoderma</i> sp.	<b>1</b>
<i>Schizophyllum</i> sp.	<b>1</b>

29%

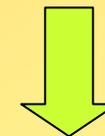


12%

No DNA fungino

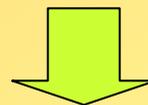
59%

Fungo non identificato  
con M-PCR



**sequenziamento**

<i>Phaeolus schweinitzii</i>	<b>5</b>
<i>Coniophora puteana</i>	<b>2</b>
<i>Phellinus pini</i>	<b>1</b>
<i>Heterobasidion annosum</i> s.s.	<b>1</b>



**Messa a punto di M-PCR per conifere**

# Messa a punto protocollo M-PCR per funghi agenti di carie su conifere

## Funghi bersaglio

- *Inonotus tomentosus*;
- *Phaeolus schweinitzii*;
- *Porodaedalea* spp.
- *Heterobasidion annosum sensu lato*;
- *Fomitopsis* spp. (*F. pinicola* e *F. officinalis*);
- *Phellinus weirii*;
- *Echinodontium tinctorium*.

## ***Heterobasidion annosum sensu lato***

**Temibile patogeno che può causare carie bianca delle radici e parte basale del tronco**



## ***Inonotus tomentosus***

**Carie molto intensa su radici e parte basale di numerose conifere**



## ***Phaeolus schweinitzii***



**Agente di carie cubica molto attivo  
Ritrovato su numerosi pini schiantati**

## ***Porodaedalea* spp. (*P. pini* e *P. chrysoloma*)**

**Temibili parassiti agenti di carie bianca**



## ***Fomitopsis* spp. (*F. pinicola* e *F. officinalis*)**

**Debole parassita  
agente di carie bruna  
molto intensa**



## ***Echinodontium tinctorium***

**Agente di carie bianca del cilindro  
centrale di diverse conifere in Nord  
America**



## ***Phellinus weirii***

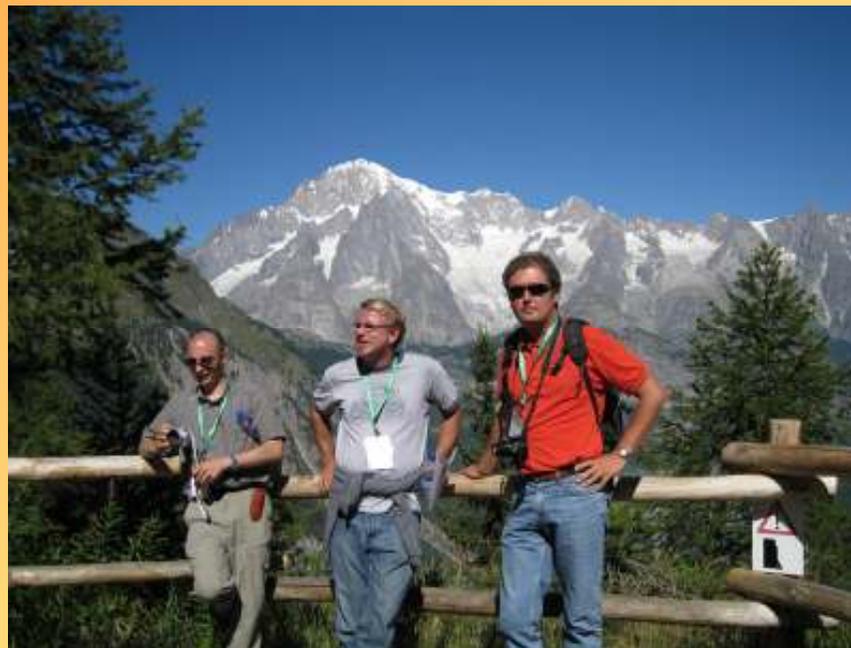
**Pericoloso agente di marciume radicale in Nord America e patogeno di quarantena per la zona EPPO**



# Conclusioni

- ✓ **La diagnosi con M-PCR è molto più efficace della diagnosi visiva basata sull'osservazione dei corpi fruttiferi**
- ✓ **L'analisi con M-PCR permette di diagnosticare la contemporanea presenza nell'albero di più specie lignivore**
- ✗ **È possibile diagnosticare solamente i funghi bersaglio...**  
...tuttavia i funghi non bersaglio possono essere identificati tramite sequenziamento del DNA
- ✗ **L'attendibilità della diagnosi dipende in modo imprescindibile dalle modalità e dall'accuratezza di campionamento**
- ✓ **L'applicazione delle M-PCR sta incrementando rapidamente le conoscenze sull'ecologia e l'epidemiologia dei funghi agenti di carie su piante in piedi**

# Ringraziamenti



**Fabio Guglielmo**

**Comune di Torino - Settore Gestione Verde**