



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE**

---

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA UBALDO MONTELATICI**

**DOTTORATO IN BIOTECNOLOGIE MICROBICHE AGRARIE**  
**CICLO XXII**

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie – Sez. Patologia vegetale  
Settore scientifico disciplinare AGR 012

**Studio della diffusione di specie di Botryosphaeriaceae isolabili da vite  
in Toscana e caratterizzazione del loro potenziale patogenetico**

**Coordinatore del Dottorato:** Ch.mo Prof. Paolo Capretti

**Tutore :** Ch.mo Prof. Giuseppe Surico

**Cotutore :** Dr. Guido Marchi

**Dottorando :** Dr. Alessandro Spagnolo

30 Dicembre 2009

**Dichiarazione**

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale che è stato utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'Università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

30 Dicembre 2009

Alessandro Spagnolo

Una copia della tesi sarà disponibile presso DiBA, sez. Patologia vegetale,  
<http://www.diba.unifi.it/>

## INDICE

<b>Riassunto</b> .....	1
<b>Summary</b> .....	4

### **Capitolo 1. Introduzione generale e scopo della tesi**

1.1. Tassonomia delle Botryosphaeriaceae.....	8
1.2. Botryosphaeriaceae su vite .....	10
1.2.1. Sintomi associati alle Botryosphaeriaceae isolate dal legno di vite.....	11
1.2.2. Altri sintomi associati alla Botryosphaeriaceae isolate da vite.....	15
1.2.3. Descrizione e caratterizzazione patologica delle Botryosphaeriaceae isolate dal legno di vite .....	16
1.3. Epidemiologia .....	25
1.4. Metodi di lotta .....	26
1.5. Monitoraggio e identificazione delle Botryosphaeriaceae.....	28
1.6. Scopo della tesi.....	29

### **Capitolo 2. Identificazione di una collezione di isolati di Botryosphaeriaceae ottenuti da piante adulte e da materiale di propagazione di vite**

2.1. Riassunto .....	32
2.2. Introduzione.....	33
2.3. Materiali e Metodi .....	35
2.3.1. Materiale vegetale .....	35
2.3.2. Isolamento e caratterizzazione delle Botryosphaeriaceae e Pch.....	37
2.3.2.1. Analisi filogenetica degli isolati di Botryosphaeriaceae.....	38
2.3.2.1.1. Estrazione del DNA .....	38
2.3.2.1.2. Amplificazione delle regioni ITS, BT e EF 1- $\alpha$ mediante standard PCR .....	38
2.3.2.1.3. Analisi filogenetica.....	38
2.3.2.2. Analisi morfologica .....	40
2.4. Risultati .....	40
2.4.1. Analisi filogenetica degli isolati di Botryosphaeriaceae.....	40
2.4.2. Analisi morfologica .....	52

2.4.3. Distribuzione dei ceppi di Botryosphaeriaceae e di Pch nelle piante adulte e nel materiale di propagazione .....	56
2.5. Discussione e Conclusioni .....	67

**Capitolo 3. Caratterizzazione del potenziale patogenetico di ceppi di Botryosphaeriaceae ottenuti da piante adulte e da materiale di propagazione di vite**

3.1. Riassunto .....	72
3.2. Introduzione .....	73
3.3. Materiali e Metodi .....	74
3.3.1 Ceppi utilizzati .....	74
3.3.2. Inoculazione su piante adulte e barbatelle .....	75
3.3.2.1. Pianta adulte .....	75
3.3.2.2. Barbatelle .....	77
3.4. Risultati .....	80
3.4.1. Pianta adulte .....	80
3.4.1.1. Sintomi fogliari .....	80
3.4.1.2. Alterazioni del legno .....	80
3.4.2. Barbatelle .....	82
3.5. Discussione e Conclusioni .....	86

**Capitolo 4. Verifica della produzione di enzimi esocellulari da parte di ceppi di Botryosphaeriaceae ottenuti da piante adulte e da materiale di propagazione di vite**

4.1. Riassunto .....	90
4.2. Introduzione .....	90
4.3. Materiali e Metodi .....	91
4.3.1. Ceppi di Botryosphaeriaceae .....	91
4.3.2. Verifica della produzione di enzimi esocellulari .....	91
4.4. Risultati .....	93
4.5. Discussione e Conclusioni .....	97

<b>Capitolo 5. Manoscritto dell'articolo "Detection of Botryosphaeriaceae within grapevine woody tissues by nested PCR, with particular emphasis on the "<i>N. parvum</i>/<i>N. ribis</i> complex"</b> .....	102
--	-----

<b>Capitolo 6. Conclusioni .....</b>	<b>134</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>139</b>

## Riassunto

Negli ultimi anni, tra i vari funghi ritenuti responsabili di malattie del legno della vite, stanno suscitando sempre più interesse quelli appartenenti alla famiglia delle Botryosphaeriaceae Theiss. & H. Syd. Ad oggi sono 17 le specie afferenti a questa famiglia isolate dal legno di vite a livello mondiale, la maggior parte delle quali vengono considerate potenzialmente patogene per quest'ospite. Tuttavia, a fronte del costante isolamento di specie di Botryosphaeriaceae dal legno alterato di piante vite (spesso in associazione ai funghi dell'esca: *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*), frammentarie sono le informazioni riguardo all'epidemiologia, tassonomia, patogenicità e virulenza di queste specie fungine. Obiettivo della presente ricerca stato quello di acquisire nuove informazioni circa l'ecologia, la patogenesi e la tassonomia di questo ubiquitario gruppo di ascomiceti e la natura delle sue interazioni con la vite.

La prima della ricerca è consistita nell'allestimento di una collezione di isolati, a partire da piante adulte e da materiale di propagazione di vite. E' seguita la caratterizzazione specifica di 43 isolati, effettuata mediante analisi filogenetica basata sulle sequenze dell'rDNA ITS1-5,8S-ITS2 e di porzioni dei geni codificanti per la  $\beta$ -tubulina e il fattore di allungamento 1- $\alpha$ . Per questa via è stato possibile identificare 10 ceppi di *Diplodia seriata*, 3 di *Botryosphaeria dothidea* e 30 di *Neofusicoccum parvum* da materiale raccolto soprattutto in Toscana. Successivamente al fine di valutare le potenzialità patogenetiche di questi funghi, una selezione degli isolati ottenuti (2 ceppi di *D. seriata*, 1 di *B. dothidea* e 8 di *N. parvum*), rappresentativi di tutti i gruppi filogenetici individuati all'interno delle specie, è stata utilizzata in prove di patogenicità mediante inoculazione artificiale di piante adulte e barbatelle. I rilievi hanno riguardato la formazione di imbrunimenti nel legno e la comparsa di sintomi fogliari, eventualmente riconducibili a quelli caratterizzanti la "Grapevine leaf stripe disease", malattia tracheomicotica della vite attribuita a *P. chlamydospora* e a specie di *Phaeoacremonium*. Gli stessi ceppi di Botryosphaeriaceae impiegati nelle prove di patogenicità sono stati utilizzati anche in saggi *in vitro* per verificare la produzione di enzimi esocellulari come poligalatturonasi, pectina esterasi, xilanasi, esocellobioidrolasi,  $\beta$ -1,4-glucosidasi, endo-1,4- $\beta$ -glucanasi, laccasi, manganese perossidasi, lignina perossidasi, lipasi nonché la capacità di degradazione dell'acido tannico. Con l'obiettivo di ottenere strumenti utili sia per studi epidemiologici che per indagini diagnostiche, sono stati sviluppati anche due protocolli di nested PCR utilizzando l'rDNA ITS1-5,8S-ITS2 come regione "target" per i "primer" specifici. Il primo dei protocolli è apparso utile per rilevare il DNA delle

specie afferenti al “*N. parvum/N. ribis* complex”, la cui componente *N. parvum* viene ritenuta tra le Botryosphaeriaceae più virulente su vite. Il secondo protocollo è stato invece sviluppato per rilevare il DNA delle 17 specie di Botryosphaeriaceae potenzialmente presenti nei tessuti legnosi della vite. Infine, un terzo protocollo ha avuto come obiettivo di diagnosi molecolare il fungo *P. chlamydospora*, rinvenibile con frequenza elevata, spesso insieme a specie di Botryosphaeriaceae, nei tessuti legnosi di piante adulte e materiale di propagazione. L’indagine epidemiologica che ne è seguita ha riguardato essenzialmente materiale di propagazione attualmente commercializzato in Italia.

I risultati delle prove di patogenicità effettuate su piante adulte, benché abbiano confermato la capacità dei ceppi di Botryosphaeriaceae, ma anche di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*, di provocare alterazioni del legno, sono stati caratterizzati da una elevata variabilità tra le repliche. Ciò non ha permesso di quantificare in maniera inequivocabile eventuali differenze di virulenza tra i ceppi utilizzati. Inoltre, durante la stagione vegetativa compresa nei 12 mesi di durata della prova, non è stata osservata alcuna correlazione tra lo sviluppo, in alcune piante, dei sintomi fogliari della “Grapevine leaf streak disease” (ex mal dell’esca) e la presenza dell’inoculo artificiale di Botryosphaeriaceae o di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*. Risultati analoghi si sono avuti con le prove di inoculazione su barbatelle.

I risultati dei saggi enzimatici hanno indicato che molti dei ceppi di Botryosphaeriaceae utilizzati sembrano in grado di produrre, così come altri funghi implicati nelle malattie del legno della vite, alcuni enzimi ritenuti importanti (co)fattori di virulenza come poligalatturonasi, pectina esterasi,  $\beta$ -1,4-glucosidasi, endo-1,4- $\beta$ -glucanasi o manganese perossidasi. Comunque, la produzione dei diversi enzimi è apparsa, salvo poche eccezioni (poligalatturonasi, pectina esterasi,  $\beta$ -1,4-glucosidasi ed endo-1,4- $\beta$ -glucanasi) molto variabile da ceppo a ceppo. Ciò potrebbe, in un caso sminuire il ruolo, ai fini della patogenicità/virulenza, di questi enzimi; in un altro, essere interpretato come la dimostrazione, indiretta, di quella grande variabilità della patogenicità/virulenza riscontrata da diversi autori fra le popolazioni di Botryosphaeriaceae.

I protocolli di indagine molecolare per le Botryosphaeriaceae e quello per *P. chlamydospora*, oltre ad apparire più attendibili rispetto all’analisi classica, hanno permesso di constatare, in alcuni casi, previa analisi di sequenza degli ampliconi ottenuti, la contemporanea presenza di almeno 2 specie di Botryosphaeriaceae, talvolta

insieme a *P. chlamydospora*, in corrispondenza di una stessa alterazione legnosa. L'analisi epidemiologica condotta utilizzando tali protocolli ha evidenziato l'abbondante presenza del DNA di Botryosphaeriaceae anche nel legno del materiale di propagazione, che si dimostra quindi un'importante fonte di inoculo per i funghi afferenti al complesso "*N. parvum*/*N. ribis*" e di altre Botryosphaeriaceae coinvolte nelle malattie del legno della vite, così come per *P. chlamydospora*. Visto che l'impianto in vigneto di barbatelle sane è ritenuto importante per evitare il deperimento delle piante già dopo qualche anno, i due protocolli di diagnosi molecolare sviluppati in questo lavoro potrebbero rappresentare un utile strumento a supporto di tale strategia.



## Summary

In recent years, among the fungi known as grapevine wood pathogens, increasing interest has been arising by those belonging to the Botryosphaeriaceae family Theiss. & H. Syd.. To date, 17 Botryosphaeriaceae species have been isolated from grapevine wood worldwide, most of them considered potentially pathogenic to this host. However, in spite of their constant isolation from discoloured grapevine wood (often together with esca fungi: *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*), information's regarding epidemiology, taxonomy, pathogenicity and virulence of these species are fragmentary. Therefore, the goal of this work was to acquire new data about the ecology, the pathogenesis and the taxonomy of this ubiquitous group of ascomycetes and the nature of their interactions with grapevine wood.

The first objective of this work was to obtain a collection of Botryosphaeriaceae isolates from nursery stock material and standing vines. Then, the specific characterization of 43 isolates, through phylogenetic analysis based on rDNA ITS1-5,8S-ITS2 and part of the  $\beta$ -tubulin and translation elongation factor 1- $\alpha$  gene sequences, was done. In this way it was possible to identify 10 *Diplodia seriata*, 3 *Botryosphaeria dothidea* and 30 *Neofusicoccum parvum* strains from material recovered mostly in Tuscany. Subsequently to the characterization, in order to evaluate the pathogenic potential of these fungi, a selection of strains (2 *D. seriata*, 1 *B. dothidea* and 8 *N. parvum*), representative of all the phylogenetic groups identified within the species, was used for pathogenicity trials through artificial inoculation on standing vines and potted rooted cuttings. The consequent checks were done to observe the development of wood discolouration's and foliar symptoms, eventually resembling those characterizing the "Grapevine leaf stripe disease", a tracheomycotic disease caused by *P. chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. The same Botryosphaeriaceae strains used for the pathogenicity trials were also used in *in vitro* assays to verify the production of extracellular enzymes as polygalacturonase, pectin esterase, xylanase, exocellobiodydrolase,  $\beta$ -1,4-glucosidase, endo-1,4-  $\beta$ -glucanase, laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase and the capability to degrade tannic acid. At last, in order to obtain tools that were useful both for epidemiological studies and diagnostic screenings, 2 nested PCR protocols targeting the rDNA ITS1-5,8S-ITS2 were developed. The first was set up to detect the species from grapevine belonging to the "*N. parvum*/*N. ribis* complex", in which *N. parvum* is regarded as one of the most virulent Botryosphaeriaceae on grapevine. The second protocol was developed to detect the DNA

of all the 17 Botryosphaeriaceae species, including the members of the “*N. parvum/N. ribis* complex”, potentially present within the grapevine woody tissues. Then, a third protocol was used to specifically detect *P. chlamydospora*, recovered with high frequency, and often together with Botryosphaeriaceae species, within woody tissues of standing vines and nurseries stock material. The protocols were applied to an epidemiological analysis on the nursery stock material currently commercialized in Italy.

Results of the pathogenicity trials on standing vines, although confirming the capability of Botryosphaeriaceae strains as well as of *P. chlamydospora* and *P. aleophilum*, to cause wood discolouration's, showed a high variability within each treatment. Thus, it was not possible to statistically quantify the possible differences of virulence among the strains used. The development, in some plants, of the “Grapevine leaf stripe disease” foliar symptoms (ex esca) was not specifically linked to any of the Botryosphaeriaceae strains or of *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* in the 12 months of the trials. Similar results were also obtained for the trials on potted rooted cuttings.

Results of the enzymatic assays indicated that most of the Botryosphaeriaceae strains used are able to produce, as well as other fungi involved in trunk disease of grapevine, some enzymes regarded as important cofactors of virulence as polygalacturonase, pectin esterase,  $\beta$ -1,4-glucosidase, endo-1,4-  $\beta$ -glucanase or manganese peroxidase. However, production of the different enzymes, a part from some exceptions (polygalacturonase, pectin esterase,  $\beta$ -1,4-glucosidase and endo-1,4-  $\beta$ -glucanase), was more variable among the strains. This observation in one case could reduce the role of these enzymes in terms of pathogenicity/virulence; in another could be interpreted as the indirect demonstration of the high variability in pathogenicity/virulence observed by several authors among Botryosphaeriaceae populations.

The molecular tools for the specific detection of Botryosphaeriaceae and *P. chlamydospora*, not only appeared to be more reliable than the identification with traditional protocols, but also allowed to observe, in some cases, after sequence analysis of the amplicons obtained, the contemporaneous presence of at least 2 Botryosphaeriaceae species in the same wood discolouration, sometimes together with *P. chlamydospora*. The epidemiological analysis done by these protocols highlighted the abundant presence of Botryosphaeriaceae also in the wood of nursery stock material, which therefore showed to be an important source of inoculum for the fungi belonging to the “*N. parvum/N. ribis* complex” and for other Botryosphaeriaceae species involved in grapevine trunk diseases, as well as *P. chlamydospora*. Since planting healthy rooted

cuttings in a vineyard is recommended as an important strategy to avoid grapevine decline just after some years, the 2 protocols developed in this work could be an important tool for rapid and efficient detection.

## **CAPITOLO 1**

### **Introduzione generale e scopo della tesi**

### 1.1. Tassonomia delle Botryosphaeriaceae

Il genere fungino *Botryosphaeria* Ces. & De Not., introdotto nel 1863 da Cesari e De Notaris (Crous *et al.*, 2006), include un gruppo di ascomiceti ascritto alla famiglia delle Botryosphaeriaceae ed è basato sulla specie tipo *Botryosphaeria dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. & De Not.

A causa della scarsa varietà morfologica delle specie teleomorfe ascritte al genere e degli sporadici ritrovamenti di queste forme *in vitro* così come in natura, la tassonomia e l'identificazione delle specie correlate si sono basate principalmente sui caratteri degli anamorfi (Denman *et al.*, 2000). Nell'ultimo decennio la tassonomia delle Botryosphaeriaceae è stata oggetto di numerose e spesso controverse revisioni. Fino al 2004 (Crous & Palm, 1999; Denman *et al.*, 2000; Phillips, 2000; Zhou & Stanosz, 2001; Slippers *et al.*, 2004a), erano due i generi di anamorfi correlati a teleomorfi del genere *Botryosphaeria*: *Diplodia* Fr (conidi con larghezza tendenzialmente maggiore di 10 µm, nella maggior parte dei casi ovoidali, pigmentati e con parete spessa) e *Fusicoccum* (conidi con larghezza tendenzialmente minore di 10 µm, fusiformi, ialini e con parete fine). Tuttavia, questa suddivisione è stata messa in discussione da studi successivi di filogenetica molecolare e nuovi generi (Crous *et al.*, 2004; Pavlic *et al.* 2004) e nuove specie, *Dothiorella sarmentorum*, *D. iberica* e *D. viticola*, sono stati descritti (Phillips *et al.*, 2005; Luque *et al.*, 2005). Con lo scopo di rivedere la tassonomia di questo ampio gruppo di ascomiceti in base al "genus for genus concept" (Seifert *et al.*, 2000), Crous *et al.* (2006), mediante l'analisi della sequenza parziale dell'rDNA 28S (gene LSU), hanno chiarito che quello che fino ad allora era conosciuto come genere *Botryosphaeria*, è in realtà un insieme di diversi gruppi filogenetici relativi a diversi singoli generi e che tali generi sono ben individuabili anche su base morfologica. In seguito a ciò, il genere *Botryosphaeria* è stato ristretto a *B. corticis* (Demaree & Wilcox) von Arx & Müll. e alla specie tipo *Botryosphaeria dothidea* mentre, per gli altri generi, gli autori hanno optato di usare i nomi dei rispettivi anamorfi anche nel caso fosse conosciuto il relativo teleomorfo.

Phillips *et al.* (2008), con uno studio basato sull'analisi di più geni, hanno infine chiarito lo *status* filogenetico e tassonomico dei generi teleomorfi di Botryosphaeriaceae che producono spore scure, rimasto irrisolto dopo lo studio di Crous *et al.* (2006).

Per considerare l'insieme di questi generi, ci si riferisce ora al nome della famiglia cui appartengono, ossia alle Botryosphaeriaceae, mentre, per riportare i nomi delle specie nella forma usata prima delle su descritte revisioni tassonomiche e per lasciare un

collegamento orientativo con la vecchia nomenclatura, i nomi delle specie non più appartenenti al genere *Botryosphaeria* vengono riportati tra virgolette.

L'utilizzo dell'analisi multigenica (combined multiple gene genealogies) se da un lato ha permesso la distinzione di specie di Botryosphaeriaceae strettamente correlate sia dal punto di vista morfologico che da quello filogenetico, da un altro ha evidenziato, almeno in certi casi, un livello di variabilità intraspecifica così elevato da mettere in discussione l'uso proprio del rango tassonomico di specie. L'analisi multigenica, ad esempio, si è rivelata importante supporto nel caso della distinzione tra due specie patogene delle conifere, *Diplodia pinea* e *D. scrobiculata* (De Wet *et al.*, 2003) e nell'identificazione di due specie strettamente correlate a *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae* e *L. parva* (Alves *et al.*, 2008). Analogamente, l'utilizzo di tale approccio ha consentito la distinzione tra "*B. australis*" (ora *Neofusicoccum australe*) e "*B. lutea*" (ora *N. luteum*) (Slippers *et al.*, 2004b), così come la risoluzione del "*Botryosphaeria dothidea* complex" (Slippers *et al.*, 2004a), all'interno del quale, oltre a *B. dothidea*, erano incluse anche "*B. parva*" (ora *Neofusicoccum parvum*) e "*B. ribis*" (ora *N. ribis*). In quest'ultimo studio, oltre ad essere evidenziate le differenze tra *B. dothidea* e *N. ribis*, confermando l'erroneità di precedenti identificazioni, è stata possibile anche la distinzione tra gli isolati di *N. ribis* e quelli di *N. parvum*. Tuttavia, lo studio di Slippers *et al.* (2004a) è stato condotto con pochi isolati di queste due specie strettamente correlate e, i dubbi riguardanti la loro distinzione sono stati nuovamente sollevati in seguito ad analisi eseguite su un maggior numero di isolati, ottenuti da diversi ospiti e provenienti da regioni diverse (Farr *et al.*, 2005; Slippers *et al.*, 2005; Pavlic *et al.*, 2007). La difficoltà nella distinzione tra *N. ribis* e *N. parvum* è esemplificata dai risultati dei lavori condotti in maniera indipendente da Slippers (2003) e Sakalidis (2004). Utilizzando l'approccio dell'analisi multigenica e delle "simple sequence repeats" (SSR) su isolati ottenuti da diversi ospiti e varie aree geografiche, Slippers (2003) riuscì a definire i gruppi *sensu lato* e *sensu stricto* per ognuna delle due specie. Viceversa, a seguito di uno studio condotto in maniera analoga, Sakalidis (2004) concluse che le due specie fossero indistinguibili, considerando la separazione delle loro specie tipo come estremità della continuità genetica tra popolazioni. Entrambi i lavori comunque sono stati considerati fallaci a causa dello scarso numero di isolati provenienti da diversi continenti (Pavlic *et al.*, 2009a).

Uno studio basato sull'identificazione di isolati ottenuti da *Syzygium cordatum* in Sudafrica (Pavlic *et al.*, 2007) ha evidenziato la presenza di numerosi isolati inizialmente

## Capitolo 1. Introduzione generale e scopo della tesi

ascritti a *N. parvum* e a *N. ribis*. Tuttavia, l'elevato grado di variabilità morfologica e molecolare di questi isolati ha indotto gli stessi ricercatori ad approfondire le indagini, con lo scopo di verificare se questi rappresentassero, o meno, specie differenti (Pavlic *et al.*, 2009a). Viste le incertezze derivate dal primo studio (Pavlic *et al.*, 2007), Pavlic *et al.* (2009a) hanno optato per considerare gli isolati di *N. parvum* e *N. ribis* come esemplari di un complesso, denominato “*N. parvum/N. ribis* complex”. Lo studio condotto da Pavlic *et al.* (2009a) è stato eseguito utilizzando la “genealogical concordance phylogenetic species recognition” (GCPSR), un tipo di analisi che prevede il riconoscimento delle specie in base alla concordanza tra analisi filogenetiche effettuate su più regioni geniche. Tale GCPSR, eseguita da Pavlic e colleghi (2009a), sebbene abbia chiaramente supportato la distinzione tassonomica tra *N. parvum* e *N. ribis*, ha al contempo evidenziato l'esistenza di specie criptiche (*N. cordaticola*, *N. kwambonambiense* e *N. umdonicola*) all'interno del “*N. parvum/N. ribis* complex” (Pavlic *et al.*, 2009a, 2009b). Allo stato attuale delle conoscenze dunque, vista la loro stretta correlazione, *N. parvum* e *N. ribis*, vengono considerate, insieme a *N. cordaticola*, *N. kwambonambiense* e *N. umdonicola*, costituenti del “*N. parvum/N. ribis* complex”.

### 1.2. Botryosphaeriaceae su vite

I funghi appartenenti alla famiglia delle Botryosphaeriaceae hanno una distribuzione cosmopolita e sono in grado di colonizzare piante monocotiledoni, dicotiledoni e gimnosperme (Barr, 1987; Denman *et al.*, 2000). Alcune specie vengono considerate endofite, altre saprotrofe e altre ancora fitopatogene in grado di provocare deperimento, necrosi dello xilema e numerosi altri sintomi su piante legnose (von Arx, 1987). Secondo alcuni autori (Schoeneweiss, 1981; Swart & Wingfield, 1991; Blodgett & Stanosz, 1995), le Botryosphaeriaceae sono da considerarsi dei patogeni opportunisti, in quanto le malattie da loro causate seguirebbero a situazioni di stress estranee alla loro stessa infezione (Slippers & Wingfield, 2007).

Nel caso di *Vitis* sp. sono state isolate specie apparentemente associate a vari sintomi: deperimento dell'intera pianta o parti di essa (tralci, branche o tronchi), mortalità dei germogli, striature brune e necrosi del legno, marciume degli acini, ritardo della ripresa vegetativa e altri ancora (van Niekerk *et al.*, 2006). In certi casi è stato attribuito a specie di Botryosphaeriaceae che colonizzano il legno di vite anche lo sviluppo di sintomi fogliari (Cristizio, 1978; Larignon & Dubos, 2001; Larignon *et al.*, 2001) che ricordano da vicino quelli di una importante malattia della vite, la “Grapevine leaf stripe disease”

(Surico, 2009). La varietà di sintomi ascritti alle Botryosphaeriaceae (insieme alla difficoltà di una corretta identificazione della specie fungina coinvolta) ha sempre reso difficoltosa la correlazione sintomo-specie fungina patogena visto che varie specie sembrano causare lo stesso o gli stessi sintomi e che alcuni sintomi sono molto simili a quelli causati da altri funghi patogeni (van Niekerk *et al.*, 2006).

### 1.2.1. Sintomi associati alle Botryosphaeriaceae isolate dal legno di vite

Le prime notizie di Botryosphaeriaceae isolate da legno di vite risalgono al 1964 e si riferiscono a *Sphaeropsis malorum* Berk. = *Diplodia mutila* (Fries) Mont., isolata insieme a *Phomopsis viticola*, dalle parti legnose di *Vitis lambrusca* in Canada (Lehoczky, 1974). Ad oggi sono in tutto 17 le specie di Botryosphaeriaceae isolate da legno di vite e considerate potenzialmente patogene per quest'ospite (Tab. 1).

**Tabella 1.** Elenco delle specie di Botryosphaeriaceae ad oggi isolate da legno di vite. I nomi riportati nella colonna di sinistra si riferiscono alla nomenclatura adottata dopo le revisioni tassonomiche di Crous *et al.* (2006) e Phillips *et al.* (2008) mentre nella colonna centrale sono riportati i nomi dei rispettivi teleomorfi utilizzati fino alle suddette revisioni. I casi in cui non sono riportati i nomi dei teleomorfi si riferiscono a specie descritte esclusivamente sulla base della morfologia degli anamorfi o a identificazioni avvenute in seguito alle revisioni tassonomiche. Nella colonna di destra sono indicati i riferimenti bibliografici relativi ai ritrovamenti su vite di tali specie.

Specie	Vecchio nome teleomorfo	Riferimento bibliografico
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>B. dothidea</i>	van Niekerk <i>et al.</i> , (2006)
<i>Diplodia corticola</i>	<i>B. corticola</i>	Carlucci <i>et al.</i> , (2009)
<i>Diplodia mutila</i>	<i>B. stevensii</i>	van Niekerk <i>et al.</i> , (2006)
<i>Diplodia seriata</i>	<i>B. obtusa</i>	van Niekerk <i>et al.</i> , (2006)
<i>Dothiorella iberica</i>	<i>B. iberica</i>	Úrbez-Torres <i>et al.</i> , (2007)
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	<i>B. sarmentorum</i>	Martin & Cobos, 2007
<i>Dothiorella viticola</i>	* <i>B. viticola</i>	Luque <i>et al.</i> , (2005)
<i>Lasiodiplodia plurivora</i>	-----	Damm <i>et al.</i> , (2007)
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>B. rhodina</i>	van Niekerk <i>et al.</i> , (2006)
<i>Neofusicoccum australe</i>	<i>B. australis</i>	van Niekerk <i>et al.</i> , (2006)
<i>Neofusicoccum luteum</i>	<i>B. lutea</i>	van Niekerk <i>et al.</i> , (2006)
<i>Neofusicoccum mediterraneum</i>	-----	Aroca <i>et al.</i> , (2009)



**Tabella 1. (continuazione)**

Specie	Vecchio nome teleomorfo	Riferimento bibliografico
<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>B. parva</i>	van Niekerk <i>et al.</i> , (2006)
<i>Neofusicoccum ribis</i>	<i>B. ribis</i>	van Niekerk <i>et al.</i> , (2006)
<i>Neofusicoccum viticlavatum</i>	-----	van Niekerk <i>et al.</i> , (2006)
<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	-----	van Niekerk <i>et al.</i> , (2006)
<i>Phaeobotryosphaeria porosa</i>	-----	van Niekerk <i>et al.</i> , (2006)

\* sebbene la regola generale adottata da Crous *et al.* (2006) e Phillips *et al.* (2008) sia stata quella di identificare con un singolo nome sia l'anamorfo che il teleomorfo (se identificato) di una specie, utilizzando preferenzialmente il vecchio nome dell'anamorfo nel caso della ridefinizione di specie già conosciute, il caso di *D. viticola* rappresenta un'eccezione a tale regola, essendo stato dato un nome esclusivo anche al suo teleomorfo, *Spenceriartinsia viticola* (Phillips *et al.*, 2008).

Un sintomo spesso associato all'attività di Botryosphaeriaceae diverse è osservabile nelle sezioni longitudinali di tronchi e branche sotto forma di striature scure che interessano tratti dei vasi xilematici. In loro corrispondenza sono visibili, in sezione trasversale, piccole macchie nere (van Niekerk *et al.*, 2006). Questo sintomo è molto simile a quello causato, negli stessi organi, da *Phaeoconiella chlamydospora* e/o *Phaeoacemonium aleophilum*, agenti del "Grapevine Phaeotracheomycosis complex" (Surico *et al.*, 2006; Surico, 2009). Tuttavia, quando il sintomo è causato esclusivamente da specie di Botryosphaeriaceae, le macchie nere sono molto più numerose e, a differenza di quanto accade con *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*, in loro corrispondenza non si nota la fuoriuscita di essudato nero di consistenza gommosa (Castillo-Pando *et al.*, 2001; Phillips, 2002). Al pari di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*, anche diverse specie di Botryosphaeriaceae sono state isolate dal materiale di propagazione e in particolare da barbatelle con mancato attecchimento dell'innesto (Phillips, 2002; Fourie & Halleen, 2003, 2004; Aroca *et al.*, 2006, 2009).

Le striature brune sono spesso associate, o secondo alcuni si evolvono (Larignon *et al.*, 2001; Phillips, 2002; Úrbez-Torres *et al.*, 2006) nella sintomatologia del legno più comunemente ascritta alle Botryosphaeriaceae, la necrosi. I processi necrotici dei tessuti legnosi, che prendono spesso avvio dalle ferite di potatura, possono arrivare ad

interessare ampi settori del tronco e dei cordoni e la conseguente ridotta capacità vascolare può portare al deperimento dell'intera pianta, specie se contestualmente sottoposta ad altri fattori di stress, siano essi di natura biotica o abiotica. Un particolare tipo di necrosi è rappresentato da settori necrotici ("wedge-shaped necrosis"). Quest'ultima alterazione, osservabile in sezione trasversale di tronchi e cordoni, è molto simile a quella causata da *Eutypa lata*, agente della malattia conosciuta sotto il nome di "Eutypa dieback" o Eutipiosi (Carter, 1991), sebbene in questo caso la sintomatologia dei tessuti legnosi interni sia strettamente associata ad una sintomatologia della parte verde della vite rappresentata da crescita stentata dei tralci che presentano internodi raccorciati e foglie malformate, clorotiche e molto più piccole del normale (van Niekerk *et al.*, 2006). Un altro tipo di necrosi comunemente attribuito a specie diverse di Botryosphaeriaceae si presenta sotto forma di arco ("arch shaped necrosis"); questo sintomo si sviluppa soprattutto a partire da ferite di spollonatura.

Alcune specie di Botryosphaeriaceae sono ritenute gli agenti causali della malattia nota con il nome di "black dead arm" (BDA). Il termine fu coniato da Lehoczky (1974) per distinguere la malattia causata da "*Botryosphaeria stevensii*" (ora *Diplodia mutila*) dalla già nota "dead arm disease", provocata da *Phomopsis viticola*. Lehoczky ritenne opportuno dare questo nome alla malattia indotta da "*Botryosphaeria stevensii*" in quanto le piante di vigneti ungheresi dalle quali il fungo venne isolato, presentavano, rispetto alla "dead arm disease", l'ulteriore sintomo della necrosi del legno di tronchi e cordoni. La presenza della malattia fu descritta in Italia da Cristinzio (1978) e da Rovesti & Montermini (1987) in vigneti delle province di Isernia e Reggio Emilia, rispettivamente. In entrambe le ricerche però fu identificato quale agente causale "*Botryosphaeria obtusa*" (ora *Diplodia seriata*). Più recentemente, una forma di deperimento della vite da BDA causato da *D. seriata*, *B. dothidea* e *N. parvum* è stata descritta da Larignon & Dubos (2001) e Larignon *et al.* (2009) in Francia.

Un sintomo considerato essere tipico della BDA descritta in Francia (Larignon & Dubos, 2001; Lecomte *et al.*, 2005), cioè una striscia necrotica del legno visibile sotto la corteccia, è stato in realtà riprodotto anche in seguito ad inoculazione di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* su speroni di vite (Sparapano *et al.*, 2001) ed inoltre altri studi lo avevano già riportato associato alla "Grapevine leaf stripe disease" (ex esca) (Surico *et al.*, 2006; Surico, 2009).

Nella forma osservata da Larignon & Dubos (2001), la sindrome risultava caratterizzata dalla presenza di particolari sintomi fogliari, molto simili a quelli della

## Capitolo 1. Introduzione generale e scopo della tesi

“Grapevine leaf stripe disease”, malattia tracheomicotica, nella quale sono coinvolti *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* (Surico *et al.*, 2006). Secondo la descrizione dei sintomi fogliari attribuiti alla BDA data da Larignon & Dubos (2001), questi potevano essere facilmente distinti da quelli dell'ex esca sia per il periodo in cui cominciavano a evidenziarsi (inizio Giugno anziché inizio Luglio) che per il colore delle macchie visibili sulla superficie fogliare all'inizio del loro sviluppo (rosso o giallo-arancio anziché clorotiche). È importante però sottolineare che i sintomi fogliari descritti da Larignon & Dubos (2001) coincidono solo con quelli in precedenza riportati da Rovesti & Montermini (1987), mentre risultano differenti le descrizioni date da Lehoczky (1974) e Cristinzio (1978), che si riferivano rispettivamente a clorosi generalizzata e arrossamenti delle lamine fogliari. Lecomte *et al.* (2005, 2009) e Surico *et al.* (2006) hanno evidenziato una difficoltà oggettiva nel distinguere i sintomi della “Grapevine leaf stripe disease” dagli eventuali sintomi fogliari della BDA che per altro non sono, a differenza di quelli a carico dei tessuti legnosi interni, mai stati riprodotti nei saggi di patogenicità eseguiti né con le diverse specie di Botryosphaeriaceae isolate da legno di vite (Cristinzio, 1978; Phillips, 1998; Castillo-Pando *et al.*, 2001; Larignon *et al.*, 2001; van Niekerk *et al.*, 2004; Auger *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Savocchia *et al.*, 2007; Úrbez-Torres *et al.*, 2007, 2008; Burrzano *et al.*, 2008; Úrbez-Torres & Gubler, 2009) né, almeno in maniera univoca e ripetibile, con *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* (Sparapano *et al.*, 2000; Surico *et al.*, 2006).

Riguardo la genesi dei sintomi fogliari delle piante affette da “Grapevine leaf stripe disease” o da deperimenti da Botryosphaeriaceae è stato ipotizzato che questi possano essere causati da composti prodotti dalla pianta in risposta all'infezione o da metaboliti tossici secreti dagli stessi funghi lignicoli, poi traslocati all'apparato fogliare (Mugnai *et al.*, 1999). In effetti, i filtrati colturali o i composti purificati da filtrati colturali di *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea* hanno riprodotto sintomi reminiscenti quelli della “Grapevine leaf stripe disease” quando sono stati fatti assorbire a foglie o tralci di vite (Sparapano *et al.*, 2000). Tali capacità sono state attribuite anche agli esopolisaccaridi presenti nel fluido xilematico di piante affette da “Grapevine leaf stripe disease” (Bruno & Sparapano, 2007) e, ultimamente (Martos *et al.*, 2008), ai composti idrofilici ad alto peso molecolare ottenuti dai filtrati colturali di cinque specie di Botryosphaeriaceae isolate da vite. Quelli estratti dal filtrato colturale di *N. parvum*, una tra le specie più virulente su vite (van Niekerk *et al.*, 2004; Laveau *et al.*, 2009; Úrbez-Torres & Gubler, 2009), si sono rivelati polisaccaridi composti principalmente da

glucosio, galattosio e mannosio. Martos *et al.* (2008) hanno riportato inoltre che le foglie di vite immerse nel filtrato colturale di un ceppo di *N. parvum* hanno sviluppato sintomi fogliari simili a quelli causati da filtrati colturali, o composti da essi estratti, di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*. Questi risultati sono un importante punto di partenza per verificare l'eventuale coinvolgimento delle Botryosphaeriaceae nello sviluppo di sintomi fogliari.

### **1.2.2 Altri sintomi associati alle Botryosphaeriaceae isolate da vite**

Un sintomo al quale spesso sono associate le specie di Botryosphaeriaceae su vite è la mortalità dei germogli che, nella maggior parte dei casi, rappresenta il risultato di infezioni occorse all'inizio della stagione vegetativa. Tali infezioni, che in seguito evolvono sotto forma di lesioni scure visibili lungo gli internodi dei tralci, conducono al deperimento degli stessi, che diventano molto fragili e la cui corteccia si stacca dal legno. Dopo la vendemmia, le lesioni divengono più chiare mettendo in evidenza corpi fruttiferi immersi nei tessuti dell'ospite (Phillips, 1998). Il nome dato a questa malattia, escoriosi, fu introdotto da Ravaz & Verge nel 1925 (Phillips, 2000) e si riferiva presumibilmente al distacco della corteccia dei tralci. Nella descrizione originaria della malattia, Ravaz & Verge individuarono l'agente eziologico in *Phoma flaccida* Viala & Ravaz, successivamente considerato sinonimo di *Fusicoccum aesculi*, anamorfo di *Botryosphaeria dothidea* (Phillips & Lucas, 1997) mentre, gli stessi sintomi, osservati negli USA., furono attribuiti a *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc. (Phillips, 2000). Per molti anni si è molto discusso su chi fosse, il vero agente eziologico dell'escoriosi; nel 1998 Phillips confermò la capacità dei due funghi di provocare lesioni sui tralci di vite ma in seguito precisò che l'escoriosi fosse da attribuire a *Botryosphaeria dothidea* mentre, il nome più corretto per la malattia causata da *P. viticola* era "Phomopsis cane blight and leaf spot" (Phillips, 2000).

In seguito fu dimostrato (Phillips, 2002) che gli isolati di "*Botryosphaeria*" che Phillips analizzò prima di concludere che l'escoriosi fosse causata da *Botryosphaeria dothidea*, erano in realtà costituiti da tre diverse specie, delle quali la più rappresentata era "*B. parva*" (ora *N. parvum*). La sintomatologia dell'escoriosi costituisce ancora motivo di incertezze e, forse per questo motivo, viene comunemente attribuita a *P. viticola*.

Specie di Botryosphaeriaceae sono state associate anche al marciume dei grappoli (Hewitt & Pearson, 1988; Milholland, 1988; Ramsdell & Milholland, 1988; Pascoe,

## Capitolo 1. Introduzione generale e scopo della tesi

1998; Wunderlich *et al.*, 2009). L'evoluzione delle infezioni sui grappoli di uva viene descritta con lo sviluppo di una massa di micelio sulla superficie dell'acino. In questa fase, dagli acini che spesso raggrinziscono, possono emergere picnidi; tuttavia, la situazione descritta è stata osservata raramente a causa di infezioni secondarie dovute a lieviti ed altri funghi che causano il marciume molle del grappolo. Si ritiene che il marciume dei grappoli potrebbe giocare un ruolo importante nell'epidemiologia delle Botryosphaeriaceae e come fonte di inoculo per infezioni che si verificano in seguito a ferite (Hewitt & Pearson, 1988; van Niekerk *et al.*, 2006). In base ai risultati ottenuti da Wunderlich *et al.* (2009), il marciume dei grappoli potrebbe non dipendere dall'infezione di tessuti verdi all'inizio della stagione vegetativa, visto che diverse specie di Botryosphaeriaceae sono state isolate dagli acini maturi ma non durante la fioritura o dagli acini allo stadio di "chicco di pepe".

Esempi di malattie caratterizzate dal marciume dei grappoli sono rappresentati da "Macrophoma rot" (Milholland, 1988), attribuita a *B. dothidea*, "Diplodia cane dieback and bunch rot" (Hewitt & Pearson 1988), ascritta a *Lasiodiplodia theobromae* e "black rot of grapevine" (Ramsdell & Milholland, 1988), il cui agente causale viene ritenuto *Guignardia bidwelli*. Quest'ultima specie sembra essere associata esclusivamente con la parte verde della pianta. Infatti, mentre sia *B. dothidea* che *Lasiodiplodia theobromae* risultano tra le specie di Botryosphaeriaceae isolate da tessuti legnosi della vite (Úrbez-Torres *et al.*, 2006), ad oggi non sono riportati esempi a tal proposito per quanto concerne *Guignardia bidwelli*.

### 1.2.3. Descrizione e caratterizzazione patologica delle Botryosphaeriaceae isolate dal legno di vite

#### 1. *Botryosphaeria dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. & De Not.

Dopo la revisione tassonomica scaturita dallo studio di Crous *et al.* (2006), *B. dothidea* e *B. corticis* von Arx & Müll. sono le uniche due specie ritenute appartenenti al genere *Botryosphaeria*. Una delle prime notizie riguardanti l'isolamento di *B. dothidea* da vite risale al 1988, negli USA. In questa circostanza, il suo anamorfo *Fusicoccum aesculi*, in precedenza conosciuto come *Macrophoma flaccida* (Viala & Ravaz), venne riportato come l'agente causale del marciume dei grappoli su *Vitis rotundifolia* e alla malattia venne dato il nome di "Macrophoma rot" (Milholland, 1988).

Durante uno studio condotto da Tomaz & Rego (1990), *B. dothidea* risultò essere associata con l'escoriosi, malattia che fino a quel momento si riteneva essere causata

esclusivamente da *P. viticola*. I risultati di un altro studio condotto in Portogallo nel 1998 (Phillips, 1998), basato su prove di patogenicità per verificare la sintomatologia sviluppata da tralci di vite in seguito ad inoculazione di isolati di *B. dothidea* e *Phomopsis viticola*, indicarono che entrambi i funghi erano in grado di sviluppare i sintomi dell'escoriosi. Tuttavia, dopo tale studio fu concluso che in realtà l'unico agente causale dell'escoriosi era *B. dothidea* e non *P. viticola*, quest'ultima ritenuta invece l'agente causale di una malattia nominata "Phomopsis cane blight and leaf spot" (Pearson & Goheen, 1994). Con uno studio tassonomico eseguito nel 2002 (Phillips, 2002), fu però evidenziato che molti degli isolati in precedenza identificati come *B. dothidea* (Phillips, 1998) erano in realtà isolati di *N. parvum*.

*B. dothidea* è stata isolata anche da alterazioni del legno come striature brune e necrosi settoriale e il suo ritrovamento in tali circostanze è stato documentato in Spagna (Úrbez-Torres & Gubler, 2006; Martin & Cobos, 2007) e in California (Úrbez-Torres *et al.*, 2006). In Portogallo è stata isolata da barbatelle con mancato attecchimento dell'innesto (Phillips, 2002) e in Italia è stata ritrovata in associazione con imbrunimenti del legno in alcuni vigneti pugliesi (Carlucci *et al.*, 2009).

Prove di patogenicità su vite hanno evidenziato la capacità dei ceppi utilizzati di produrre lesioni nel legno di barbatelle e piante adulte, sebbene il grado di virulenza osservato per questa specie non sia stato tra i più elevati (van Niekerk *et al.*, 2004; Úrbez-Torres & Gubler, 2009).

## 2. *Diplodia corticola* A. J. L. Phillips, A. Alves & J. Luque

Questa specie è stata descritta da Alves *et al.* (2004) analizzando isolati ottenuti da *Quercus* spp. che presentavano lesioni esterne (cancri) e un generale deperimento, ed è stata recentemente isolata per la prima volta da vite in Puglia (Carlucci *et al.*, 2009), in corrispondenza di imbrunimenti del legno.

## 3. *Diplodia mutila* (Fr.) Mont.

*D. mutila* è stata riportata per la prima volta su vite in Ungheria (Lehoczky, 1974) e in seguito a ciò venne ritenuta l'agente causale di una nuova malattia, nominata "black dead arm" (BDA). È una delle specie di Botryosphaeriaceae ritenute essere associate con il deperimento delle piante di vite (Phillips, 2002). In Spagna è stata isolata da viti che presentavano sintomi fogliari normalmente ascritti a *E. lata* o agli agenti della "Grapevine leaf stripe disease" (Martin & Cobos, 2007) mentre in Australia (Taylor *et*

## Capitolo 1. Introduzione generale e scopo della tesi

*al.*, 2005) e in California (Úrbez-Torres *et al.*, 2006) è stata isolata da legno che presentava necrosi settoriale e ad arco. In qualche caso è stata isolata in corrispondenza delle macchie nere, simili a quelle associate alla malattia di Petri (Surico *et al.*, 2006), osservabili in sezioni trasversali di tronchi e cordoni (Castillo-Pando *et al.*, 2001; Phillips, 2002). Isolamenti di questa specie sono stati inoltre ottenuti dal tessuto necrotico contornante gemme morte (Phillips, 2002). In Sudafrica, sebbene non siano riportati isolamenti di questa specie da vite, essa è stata isolata da *Prunus* spp. insieme ad altre Botryosphaeriaceae e altri funghi associati con le malattie del legno della vite ed è stato supposto che le piante da frutto, spesso ubicate in prossimità dei vigneti, possano costituire una fonte di inoculo di questi funghi per l'infezione della vite (Damm *et al.*, 2009). Inoltre, un recente studio ha evidenziato la capacità di questo fungo, inoculato nel terreno, di infettare piante di vite in vaso attraverso le radici.

I risultati delle prove di patogenicità effettuate con isolati di questa specie in diverse aree viticole mondiali sono piuttosto contrastanti. Infatti, mentre nei lavori di Phillips in Portogallo (1998), di Taylor in Australia (2005) e di Úrbez-Torres & Gubler in California (2009), i ceppi utilizzati hanno mostrato bassi livelli di virulenza, quelli impiegati nel lavoro di van Niekerk e colleghi in Sudafrica (2004) si sono mostrati altamente virulenti.

### 4. *Diplodia seriata* De Not.

*D. seriata* è una delle Botryosphaeriaceae più diffuse su varie piante legnose (Damm *et al.*, 2009) e, essendo stata ritrovata in diverse regioni climatiche (Taylor *et al.*, 2005, Savocchia *et al.*, 2007), risulta anche tra le più cosmopolite (Castillo-Pando *et al.*, 2001). Riguardo ai rinvenimenti su vite, questa specie è stata associata alla BDA in Italia (Cristinzio, 1978; Rovesti & Montermini, 1987), in Francia (Larignon & Dubos, 2001), in Cile (Auger *et al.*, 2004) e in Libano (Choueiri & Jreijiri, 2006) ma è stata ritrovata anche in associazione con vari sintomi osservati su viti deperite (Phillips, 2002). Come altre Botryosphaeriaceae, *D. seriata* è stata isolata da striature brune del legno reminiscenti quelle tipicamente associate alla malattia di Petri (Castillo-Pando *et al.*, 2001; Phillips, 2002; Úrbez-Torres *et al.*, 2006) e, similmente a *B. dothidea*, è stata isolata da barbatelle con mancato attecchimento dell'innesto (Phillips, 2002). *D. seriata* è stata ritrovata in associazione con la necrosi settoriale del legno (Castillo-Pando *et al.*, 2001; Phillips, 2002; Úrbez-Torres *et al.*, 2006) ma anche con legno apparentemente sano di barbatelle (van Niekerk *et al.*, 2004). Si è rivelata la specie maggiormente isolata

durante lo studio condotto in Sudafrica da van Niekerk *et al.* (2004) e, in associazione con i sintomi sopra citati, è stata ritrovata anche in Australia (Castillo-Pando *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2005; Savocchia *et al.*, 2007), California (Úrbez-Torres *et al.*, 2006), in Messico (Úrbez-Torres *et al.*, 2008) e in Spagna (Martin & Cobos 2007). Ultimamente la sua presenza è stata documentata anche nei vigneti pugliesi (Carlucci *et al.*, 2009).

Nonostante l'elevata diffusione di questa specie, la sua patogenicità su vite rimane ancora da chiarire. Ciò è dovuto sia a casi in cui non è stato ottenuto il completamento dei postulati di Koch (Radman *et al.*, 1981; Rovesti & Montermini, 1987; Bonfiglioli *et al.*, 2006) sia a causa delle discrepanze tra i risultati ottenuti nelle diverse prove di patogenicità effettuate in diversi esperimenti (Phillips, 1998; Castillo-Pando *et al.*, 2001; van Niekerk *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Savocchia *et al.*, 2007; Úrbez-Torres *et al.*, 2008). Una situazione piuttosto comune sembra essere l'elevata discrepanza di virulenza tra gli isolati usati anche nello stesso studio (Larignon *et al.*, 2001; van Niekerk *et al.*, 2004; Úrbez-Torres *et al.*, 2008; Úrbez-Torres & Gubler, 2009).

#### 5. *Dothiorella iberica* A. J. L. Phillips, J. Luque & A. Alves

*D. iberica* è stata descritta da Phillips e colleghi (2005) utilizzando isolati ottenuti da *Quercus* e *Malus* spp. in Spagna e il suo primo ritrovamento su vite è stato documentato, sempre in Spagna, da Martin & Cobos (2007), i quali l'hanno isolata da giovani piante di vite deperite. Questa specie è stata rinvenuta anche nei vigneti californiani, dove è stata ritrovata in associazione con legno necrotico (Úrbez-Torres *et al.*, 2007).

Prove di patogenicità su vite con isolati di *D. iberica* sono state effettuate da Úrbez-Torres & Gubler (2009) e, sebbene il livello di aggressività osservato sia stato più basso rispetto alle altre specie esaminate, è stata comunque evidenziata la potenziale capacità di produrre alterazioni del legno.

#### 6. *Dothiorella sarmentorum* (Fr.) A. J. L. Phillips, A. Alves & J. Luque

Questa specie è stata descritta da Phillips *et al.* (2005) nello stesso lavoro in cui è stata descritta *D. iberica* e, così come quest'ultima, il suo primo rinvenimento su vite è stato documentato in Spagna da Martin & Cobos (2007). Non sono stati descritti peculiari tessuti sintomatici dai quali è stata isolata, essendo stata riportata solo l'informazione della sua presenza nel legno di piante deperite di età inferiore ai cinque anni e, al momento, non sono disponibili notizie di prove di patogenicità effettuate con questa specie su vite.



### 7. *Dothiorella viticola* A. J. L. Phillips & Luque

*D. viticola* è stata descritta da Luque *et al.* (2005), utilizzando isolati ottenuti da sarmenti eliminati con la potatura in alcuni vigneti spagnoli. La sua presenza è stata in seguito riportata anche in California da Úrbez-Torres *et al.* (2007), dove è stata trovata in associazione con legno necrotico di viti adulte. Recentemente è stata trovata per la prima volta su *Prunus* sp. in Sudafrica (Damm *et al.*, 2007).

Le uniche prove di patogenicità su vite riguardanti questa specie sono state condotte da Úrbez-Torres & Gubler (2009) e, analogamente a *D. iberica*, gli isolati di *D. viticola* hanno mostrato la capacità di causare alterazioni del legno nelle piante inoculate, anche se di entità minore se comparate a quelle prodotte da altre specie.

### 8. *Lasiodiplodia plurivora* Damm & Crous

Questa specie è strettamente correlata, sia morfologicamente che filogeneticamente, a *L. theobromae*. Infatti, la sua presenza su vite (Damm *et al.*, 2007) è stata documentata proprio in seguito all'ulteriore analisi di un isolato ottenuto nei vigneti del Sudafrica (van Niekerk *et al.*, 2004), in precedenza identificato come *L. theobromae*. Prove di patogenicità, effettuate su rami di *Prunus domestica* e *Prunus persica*, ospiti sui quali è stata rinvenuta per la prima volta (Damm *et al.*, 2007), hanno evidenziato un'elevata virulenza degli isolati utilizzati. Invece, non si hanno ancora informazioni riguardo la virulenza di isolati di questa specie su vite.

### 9. *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl.

In passato, *L. theobromae* è stata considerata soprattutto l'agente causale di una malattia denominata "Diplodia cane diebak and bunch rot" (Hewit & Pearson, 1988). Come indicato dallo stesso nome, i sintomi descritti per tale malattia sono il marciume dei grappoli e il deperimento dei tralci, accompagnato dalla presenza di corti internodi e di foglie piccole e clorotiche. Tuttavia, negli ultimi anni questa specie è stata isolata, in varie aree viticole mondiali (van Niekerk *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Wood & Wood, 2005; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Aroca *et al.*, 2006, 2008; Burruano *et al.*, 2008; Úrbez-Torres *et al.*, 2008; Úrbez-Torres & Gubler, 2009), da diverse tipologie di sintomi, tra cui il più frequentemente osservato è la necrosi settoriale del legno di tronchi e cordoni. Tra tutte le specie di Botryosphaeriaceae isolate dal legno di vite, *L. theobromae* è quella la cui presenza sembra essere associata a delle particolari condizioni climatiche, essendo stata ritrovata soprattutto in aree con clima subtropicale o

semidesertico (Taylor *et al.*, 2005; Wood & Wood, 2005; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Úrbez-Torres *et al.*, 2008; Burruano *et al.*, 2008).

Le varie prove di patogenicità effettuate dove questa specie è stata ritrovata su vite hanno dato risultati contrastanti. Altamente virulenti sono infatti risultati gli isolati ottenuti in Western Australia (Taylor *et al.*, 2005), in Messico (Úrbez-Torres *et al.*, 2008), in California (Úrbez-Torres & Gubler, 2009) e in Spagna (Aroca *et al.*, 2008), mentre, nello studio condotto da van Niekerk e colleghi in Sudafrica (2004), gli isolati ottenuti dai vigneti di quella regione hanno sviluppato lesioni simili a quelle del controllo non inoculato.

10. *Neofusicoccum australe* (Slippers, Crous & M. J. Wingf.) Crous, Slippers & A.

J. L. Phillips

*N. australe* è stata riportata per la prima volta su vite in Sudafrica da van Niekerk *et al.* (2004), dove è stata isolata da legno apparentemente sano di piante madri e da ferite di potatura. La sua presenza su vite, soprattutto in associazione con la necrosi settoriale del legno, è stata riportata anche in California (Úrbez-Torres *et al.*, 2006) e in Australia (Taylor *et al.*, 2005), regione, quest'ultima, dove la specie è stata isolata per la prima volta e descritta utilizzando isolati ottenuti da *Sequoiadendron gigantea* e *Acacia* spp. (Slippers *et al.*, 2004b). Recentemente, la sua presenza è stata documentata anche nei vigneti del Portogallo (Rego *et al.*, 2009), dove è stata isolata in corrispondenza di striature brune del legno e da necrosi settoriale. Similmente ad altre Botryosphaeriaceae, in Sudafrica e in Australia è stata isolata anche dal legno di altre piante da frutto (Damm *et al.*, 2007; Cunnington *et al.*, 2007; Slippers *et al.*, 2007; Damm *et al.*, 2009).

Gli isolati di questa specie usati in prove di patogenicità su vite sono risultati sempre altamente virulenti (van Niekerk *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Úrbez-Torres & Gubler 2009).

11. *Neofusicoccum luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A. J. L.

Phillips

Anche *N. luteum*, allo stesso modo di altre Botryosphaeriaceae, è stata isolata da tessuti legnosi sintomatici rappresentati per lo più da striature brune e necrosi settoriali, presenti in piante di vigneti australiani (Castillo-Pando *et al.*, 2001; Savocchia *et al.*, 2007), portoghesi (Phillips, 2002; Rego *et al.*, 2009), californiani (Úrbez-Torres *et al.*, 2006) e italiani (Carlucci *et al.*, 2009). Una caratteristica peculiare di questa specie permette di

## Capitolo 1. Introduzione generale e scopo della tesi

discriminarla dalle altre Botryosphaeriaceae per mezzo della semplice osservazione del micelio di una coltura *in vitro* (Phillips *et al.*, 2002) poiché rilascia un pigmento giallo nel mezzo di crescita.

Le prove di patogenicità su vite condotte da Savocchia *et al.* (2007) in East Australia e da Úrbez-Torres & Gubler (2009) in California, hanno dato risultati concordanti, evidenziando un elevato grado di virulenza dei ceppi saggiati. Invece, l'unico ceppo di *N. luteum* utilizzato da van Niekerk e colleghi (2004) nelle loro prove ha sviluppato lesioni del legno non molto differenti da quelle osservate per il controllo non inoculato.

### 12. *Neofusicoccum mediterraneum* Crous, M. J. Wingf. & A. J. L. Phillips

Questa specie è stata descritta utilizzando isolati ottenuti da branche deperienti di *Eucalyptus* sp. dell'Isola di Rodi in Grecia (Crous *et al.*, 2007) ed in seguito ritrovata anche in associazione con il marciume delle drupe negli oliveti del sud Italia (Lazzizzera *et al.*, 2008). Il suo primo ritrovamento su vite è stato riscontrato molto recentemente in Spagna, dove Aroca e colleghi (2009) l'hanno isolata, insieme a *P. chlamydospora* e altri patogeni del legno, da piante madri di portinnesto caratterizzate sia dalla presenza di foglie piccole e clorotiche o tralci rinsecchiti, sia asintomatiche.

### 13. *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A. J. L. Phillips

Dal momento che molti degli isolati analizzati da Phillips (1998) e Larignon *et al.* (2001), inizialmente identificati come *B. dothidea*, sono stati in seguito ascritti a *N. parvum* (Phillips, 2002; Larignon *et al.*, 2009), questa specie viene di conseguenza considerata l'agente causale dell'escoriosi (Phillips 2002) e quella maggiormente associata ai casi di BDA osservati in Francia (Larignon *et al.*, 2009). Inoltre, come altre specie di Botryosphaeriaceae isolate dal legno di vite, risulta essere associata soprattutto alle striature brune e alla necrosi settoriale del legno, e in tali circostanze la sua presenza è stata documentata in Portogallo (Phillips, 2002; Rego *et al.*, 2009), in Sudafrica (van Niekerk *et al.*, 2004), in Spagna (Úrbez-Torres & Gubler, 2006) e in California (Úrbez-Torres *et al.*, 2006). In Spagna, il suo ritrovamento è stato documentato anche su piante deperienti di meno di cinque anni (Martin & Cobos, 2007) e, in corrispondenza di varie alterazioni del legno, in alcuni vigneti pugliesi (Carlucci *et al.*, 2009).

Come per le altre Botryosphaeriaceae isolate da vite, anche per *N. parvum* sono state osservate differenze di aggressività tra gli isolati saggiati nello stesso esperimento (van

Niekerk *et al.*, 2004; Laveau *et al.*, 2009; Úrbez-Torres & Gubler, 2009). Tuttavia, in questo caso, i risultati delle varie prove indicano che i ceppi di questa specie sono sempre tra i più virulenti (van Niekerk *et al.*, 2004; Laveau *et al.*, 2009; Úrbez-Torres & Gubler, 2009).

14. *Neofusicoccum ribis* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A. J. L. Phillips

*N. ribis* è stata solo occasionalmente isolata da marciume dei grappoli (Pascoe, 1998) e da alterazioni del legno (Crous *et al.*, 2000, citato da van Niekerk *et al.*, 2004). Tuttavia, i risultati di prove di patogenicità su vite condotte con un ceppo isolato da *Ribes* sp. (van Niekerk *et al.*, 2004), hanno indirettamente suggerito che anche questa specie potrebbe essere un importante patogeno per la vite (van Niekerk *et al.*, 2006).

15. *Neofusicoccum viticlavatum* (Niekerk & Crous) Crous, Slippers & A. J. L. Phillips

Questa specie è stata descritta utilizzando isolati ottenuti da vite in Sudafrica (van Niekerk *et al.*, 2004) da ferite di potatura. Prove di patogenicità su vite, eseguite nello stesso studio mediante inoculazione artificiale su piante adulte, hanno evidenziato la possibilità che in Sudafrica *N. viticlavatum* possa essere un altro importante patogeno per quest'ospite. Al momento non sono riportate notizie dell'isolamento di tale specie in altre aree viticole.

16. *Neofusicoccum vitifusiforme* (Niekerk & Crous) Crous, Slippers & A. J. L. Phillips

Come *N. viticlavatum*, anche *N. vitifusiforme* è stata descritta utilizzando isolati ottenuti da vite in Sudafrica (van Niekerk *et al.*, 2004). In particolare, tale specie è stata isolata da legno necrotico e striature brune osservabili nelle sezioni trasversali di tronchi e cordoni di piante deperite. Isolati di *N. vitifusiforme* sono stati ottenuti anche su altre piante legnose da frutto in Sudafrica e saggi di patogenicità effettuati su *Prunus salicina* hanno dimostrato un'elevata virulenza degli isolati utilizzati (Damm *et al.*, 2007). La sua presenza in area mediterranea è stata riscontrata da Lazzizzera *et al.* (2008) su drupe di olivo (*Olea europea*) e recentemente è stata isolata dal legno di piante madri di vite in Spagna (Aroca *et al.*, 2009).

## Capitolo 1. Introduzione generale e scopo della tesi

Le prove di patogenicità effettuate con isolati di *N. vitifusiforme* in Sudafrica hanno evidenziato che anche questa specie potrebbe rappresentare un importante patogeno per la vite.

17. *Phaeobotryosphaeria porosa* (van Niekerk & Crous) Crous & A. J. L. Phillips  
Questa specie, anch'essa descritta da van Niekerk *et al.* (2004) utilizzando isolati ottenuti da ferite di potatura in vigneti del Sudafrica, venne inizialmente identificata con il nome di *Diplodia porosum* van Niekerk & Crous, per poi essere riclassificata da Phillips *et al.* (2008) e quindi identificata con l'attuale nome. Anche *P. porosa*, in base ai risultati delle prove di patogenicità condotte da van Niekerk e colleghi (2004), si è dimostrata un potenziale patogeno per la vite.

Il confronto dei risultati delle prove di patogenicità, condotte con le specie di Botryosphaeriaceae isolate da legno di vite e saggiate per la loro virulenza su quest'ospite, evidenzia che in molti casi, isolati della stessa specie hanno mostrato differente aggressività in esperimenti diversi. La spiegazione di ciò potrebbe dipendere da svariati fattori, come le differenti cultivar ed età dell'ospite, la differenza del periodo di incubazione, il tipo di inoculo utilizzato, così come le differenze climatiche delle diverse regioni in cui tali esperimenti sono stati condotti. Anche le condizioni microclimatiche degli spazi adibiti a tali prove, potrebbero influenzare, allo stesso modo degli altri fattori, o forse anche di più, il differente comportamento tra gli isolati di una stessa specie. Ma soprattutto, non è da sottovalutare la possibilità di differenze intraspecifiche tra gli isolati, le quali potrebbero determinare il differente comportamento degli isolati di una stessa specie anche prescindendo dall'influenza dell'ospite, dell'ambiente esterno e delle condizioni sperimentali. Quest'ultima ipotesi è supportata dal fatto che tali differenze si osservano anche nell'ambito dello stesso esperimento, soprattutto quando non ci si limita ad impiegare 1 o 2 isolati per specie di Botryosphaeriaceae considerata (van Niekerk *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Laveau *et al.*, 2009; Rego *et al.*, 2009; Úrbez-Torres & Gubler, 2009).

Lo stato attuale delle conoscenze indica che *N. parvum*, nonostante le differenze osservate tra gli isolati, è la specie per la quale i risultati dei saggi di patogenicità hanno sempre evidenziato un'elevata aggressività degli isolati (van Niekerk *et al.*, 2004; Laveau *et al.*, 2009; Rego *et al.*, 2009; Úrbez-Torres & Gubler, 2009).

### 1.3. Epidemiologia

Sono ancora poche le informazioni riguardanti l'epidemiologia delle diverse specie di Botryosphaeriaceae su vite e, probabilmente, ciò è dovuto al costante aumento del numero di specie ritrovate su quest'ospite. È stato dimostrato che le condizioni climatiche ottimali per lo sviluppo delle fruttificazioni non sono uguali per tutte le specie e ciò indica che vi potrebbe essere un ampio spettro di fattori in grado di influenzare in maniera significativa l'andamento del processo infettivo (Copes & Hendrix, 2004). Tra questi, l'umidità (pioggia; elevata UR dell'aria) sembra avere un ruolo preponderante sulla diffusione dei propaguli da parte delle Botryosphaeriaceae e/o sulla gravità della malattia.

Phillips (1998) ha descritto l'escoriosi come una malattia presente in tutte le aree viticole mondiali, caratterizzata dall'infezione dei tralci nelle prime fasi della stagione vegetativa, risultando più severa durante le primavere molto piovose. Tale osservazione è supportata da quella di Lehoczky (1974), il quale ha riportato che "*B. stevensii*" (ora *Diplodia mutila*), l'agente causale della BDA in Ungheria, sviluppava le fruttificazioni in presenza di alta umidità durante il periodo primaverile dopo aver trascorso la stagione invernale in uno stato di quiescenza. L'incremento della gravità delle infezioni dei tralci durante prolungati periodi di umidità, come descritto da Phillips (1998), potrebbe essere attribuito ad una maggiore disponibilità di inoculo. È risaputo infatti che l'elevata umidità determina la reidratazione di picnidi e pseudotecii, che attivano la produzione e il rilascio di conidi e spore. Inoltre, sembra che quanto più i periodi di pioggia siano prolungati, e i conseguenti elevati valori di umidità perdurino, tanto più aumenti la produzione e il rilascio di spore (Michailides & Morgan, 1993). Infatti, Michailides (1991) e Pusey & Bertrand (1993), hanno osservato una maggiore gravità delle infezioni su alberi di *Pistacia vera* durante periodi di pioggia prolungati.

Anche nel caso della malattia "Diplodia cane dieback and bunch rot" è stato osservato che il suo agente causale, *Lasioidiplodia theobromae*, produce e rilascia propaguli in concomitanza di periodi di pioggia prolungati, dopo essere rimasta quiescente durante il periodo invernale sulla superficie dei tralci eliminati con la potatura. I tralci derivanti dalla potatura sono considerati un'importante fonte di inoculo anche nel caso della malattia "Macrophoma rot", il cui agente causale, *B. dothidea*, sopravvive durante l'inverno all'interno delle bacche rinsecchite di grappoli rimasti attaccati ai tralci (Milholland, 1988).

Attualmente, le ferite da potatura sono ritenute la principale via di infezione per le

## Capitolo 1. Introduzione generale e scopo della tesi

Botryosphaeriaceae, infatti strettamente associate ad alterazioni del legno che spesso si sviluppano a partire dalle superfici delle ferite (van Niekerk *et al.*, 2006). L'infezione del legno può avvenire anche durante le fasi di vivaio. Specie di Botryosphaeriaceae (*B. dothidea*, *D. seriata* e *N. ribis*) sono state infatti isolate a partire dal legno apparentemente sano di spezzoni di portinnesto (Fourie & Hallen, 2003) e si pensa che tali infezioni originino, verosimilmente, da quelle presenti nel legno di piante madri (Fourie & Hallen, 2004; Aroca *et al.*, 2009), indicando che il materiale di propagazione può essere infetto già prima dell'innesto. Queste infezioni, presenti già prima della messa a dimora delle giovani piante, possono rimanere latenti fino a quando l'ospite non sia esposto a condizioni di stress o a situazioni che possano favorire lo sviluppo della malattia, che può condurre al deperimento o, talvolta, anche alla morte precoce della pianta infetta.

Sebbene tra tutte le specie di Botryosphaeriaceae isolate da vite, *D. seriata* risulti la specie più cosmopolita (van Niekerk *et al.*, 2006), anche *N. parvum*, *N. luteum* e *D. mutila* (Phillips, 2002; van Niekerk *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Savocchia *et al.*, 2007; Martin & Cobos, 2007; Carlucci *et al.*, 2009) sono state ritrovate in regioni climatiche diverse. *N. australe*, inizialmente ritrovata solo nell'emisfero sud (van Niekerk *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005), era ritenuta una specie nativa dell'Australia, regione dove è stata isolata per la prima volta da *Sequoiadendron gigantea* e *Acacia* spp. (Slippers *et al.*, 2004b); tuttavia questa specie è stata poi isolata anche in regioni dell'emisfero boreale (Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Carlucci *et al.*, 2009; Aroca *et al.*, 2009). *B. dothidea* è presente soprattutto nelle regioni dell'emisfero nord (Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Carlucci *et al.*, 2009; Aroca *et al.*, 2009), mentre per quanto riguarda *L. theobromae* la sua presenza in vigneto sembra essere strettamente associata a particolari caratteristiche climatiche. I suoi rinvenimenti sono infatti relativi a regioni caratterizzate da clima subtropicale o semidesertico (Taylor *et al.*, 2005; Wood & Wood, 2005; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Úrbez-Torres *et al.*, 2008; Burruano *et al.*, 2008).

### 1.4. Metodi di lotta

La lotta contro le malattie causate su vite, verosimilmente da specie di Botryosphaeriaceae, risulta difficile vista la mancanza di mezzi e misure ben definite. In Francia, l'arsenito di sodio è stato in passato registrato per il controllo della BDA, con modalità di intervento simili a quelle indicate per il "Grapevine Phaeotracheomycosis complex" (Lehoczky, 1974, 1988; Larignon & Dubos, 2001). Tuttavia, questo fungicida

è stato bandito in quanto ritenuto potenziale cancerogeno (Decoin, 2001; Lyubun *et al.*, 2002).

Visto che la principale via di infezione delle Botryosphaeriaceae è rappresentata dalle ferite, è importante evitare quanto più possibile la loro produzione, qualora non strettamente indispensabile (Lehoczky, 1988; Milholland, 1988, 1991; Larignon & Dubos, 2001). Saggi *in vitro* effettuati in Sudafrica per verificare l'attività di fungicidi (Bester & Fourie, 2005) hanno evidenziato l'inibizione della crescita miceliare dei funghi *D. seriata*, *L. theobromae*, *N. australe* e *N. parvum* da parte dei composti benomyl, tebuconazolo, prochloraz manganese cloruro, flusilazolo e fenarimol. Questi fungicidi, che in altri studi sono risultati attivi anche contro *P. chlamydospora*, *P. viticola* ed *E. lata* (van Niekerk *et al.*, 2006), hanno inoltre evidenziato una buona attività contro l'infezione da Botryosphaeriaceae quando sono stati applicati su ferite da potatura (Bester *et al.*, 2006). In Australia, saggi *in vitro* condotti con tebuconazolo, fenarimol, spiroxamina e fluazinam, hanno evidenziato l'inibizione della crescita miceliare di isolati di *D. seriata* e *N. luteum* (Savocchia *et al.*, 2005), mentre, i composti iprodione, benomyl, captan e penconazolo hanno limitato l'infezione di *L. theobromae* quando sono stati applicati alle ferite prima dell'inoculazione artificiale del fungo (Leavitt, 2003).

È stato dimostrato che agenti di lotta biologica come *Fusarium lateritium* Nees, *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *Trichoderma harzianum* Rifai e *Bacillus subtilis* sono in grado di ridurre la crescita miceliare di *E. lata* *in vitro* così come sulle ferite da potatura (Carter & Price, 1974; Ferreira *et al.*, 1991; Munkvold & Marios, 1993; John *et al.*, 2004). Alcune prove *in vitro* hanno evidenziato l'attività parassitaria di diverse specie di *Trichoderma* nei confronti di Botryosphaeriaceae diverse (KeXiang *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). È stato inoltre dimostrato che alcune specie di *Trichoderma* sono in grado di colonizzare le ferite da potatura (Hallen & Fourie, 2005). Attività antagonistica nei confronti di *B. dothidea* è stata anche mostrata dal batterio *Paenibacillus lentimorbus*, applicato su ferite da potatura in piante di *Pistacia vera* prima dell'inoculazione con una sospensione conidica del fungo (KeXiang *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Comunque, una buona pratica al fine di prevenire o ridurre le infezioni delle ferite da potatura, è l'allontanamento dei sarmenti dal vigneto e la loro distruzione (van Niekerk *et al.*, 2004).

Infine, si ritiene che le strategie utilizzate per ridurre l'infezione in vivaio da parte di altri patogeni del legno della vite come *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp.,



*Cylindrocarpon* spp, costituite dalla protezione delle ferite, aggiunta di fungicidi nelle vasche utilizzate per la reidratazione, trattamento con acqua calda e aggiunta di formulati di *Trichoderma* al terreno (Fourie & Hallen, 2005), potrebbero essere efficaci anche per ridurre le infezioni da specie di Botryosphaeriaceae.

### 1.5. Monitoraggio e identificazione delle Botryosphaeriaceae

La distinzione delle specie di Botryosphaeriaceae basata sul confronto dei caratteri delle specie anamorfe, sebbene meno difficoltosa rispetto a quella impostata sul confronto dei teleomorfi (Denman *et al.*, 2000), ha spesso causato confusione a causa della mancanza di peculiarità che permettessero la discriminazione tra specie strettamente correlate (Jacobs & Rehner, 1998). Un valido supporto all'analisi classica si è rivelato l'uso della filogenetica molecolare, basata sull'analisi di sequenza di regioni altamente conservate. La regione genica maggiormente utilizzata per l'identificazione su base molecolare delle specie di Botryosphaeriaceae, e di altri funghi, è rappresentata dall'rDNA ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) (Hajibabaei *et al.*, 2007; Pavlic *et al.*, 2009a). Nel caso specifico delle Botryosphaeriaceae, l'analisi multigenica (combined multiple gene genealogies), basata su un'analisi filogenetica condotta utilizzando i caratteri di più regioni geniche altamente conservate, ha consentito la distinzione tra specie strettamente correlate (Slippers *et al.*, 2004a; 2004b) e la descrizione di altre (Luque *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2005; Pavlic *et al.*, 2009a). Le regioni maggiormente utilizzate per l'analisi multigenica sono rappresentate, oltre che dall'ITS, da parti dei geni che codificano per la  $\beta$ -tubulina (BT) e per il fattore di allungamento 1- $\alpha$  (EF 1- $\alpha$ ). Per questo motivo, l'identificazione delle specie di Botryosphaeriaceae isolate da vite o altri ospiti è attualmente basata sul riconoscimento morfologico supportato da analisi filogenetica condotta sfruttando le informazioni derivanti da almeno due regioni geniche (van Niekerk *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Slippers *et al.*, 2007; Úrbez-Torres *et al.*, 2006, Alves *et al.*, 2008; Úrbez-Torres *et al.*, 2008; Lazzizzera *et al.*, 2008).

Alcune analisi filogenetiche e le ricerche con lo scopo di rilevare in maniera specifica il DNA delle Botryosphaeriaceae in campioni infetti (indexing) si sono basate sull'amplificazione di regioni minisatellite, microsattellite, corte sequenze ripetute o sullo sfruttamento dei siti di restrizione per le endonucleasi. La distribuzione casuale di questi tratti di DNA produce, in seguito a PCR (e successiva digestione con endonucleasi nei casi in cui si sfruttino i siti di restrizione), dei "pattern" specifici che consentono di fare una distinzione interspecifica o addirittura intraspecifica (Zhou & Stanosz, 2001; Zhou *et*

al., 2001; Alves *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2007).

Sfruttando l'MSP-PCR (microsatellite primed-PCR), Ma *et al.* (2003) hanno sviluppato un protocollo di nested PCR per rilevare il DNA di *Botryosphaeria dothidea* nel legno di pistacchio (*Pistacia vera*). Mentre, un protocollo di standard-PCR specie-specifica per amplificare il DNA dei patogeni del pino *Diplodia scrobiculata* e *Diplodia pinea* è stato sviluppato da Smith & Stanosz (2006) sfruttando la variabilità all'interno dell' mt SSU rDNA (mitochondrial small subunit rDNA). In occasione del "6<sup>th</sup> International Workshop on Grapevine Trunk Diseases" tenutosi a Firenze nei giorni 1-3 Settembre 2008, Martos *et al.* (2009) hanno proposto un'ibridazione tipo "dot blot", preceduta dall'amplificazione della regione ITS di isolati di Botryosphaeriaceae, per identificare il DNA di 10 delle specie ritenute potenzialmente patogene del legno della vite. Un protocollo di real-time PCR, in grado di rilevare il DNA di *D. seriata*, *D. mutila* e *N. luteum*, è stato presentato da Luchi *et al.* (2009), mentre Lummerzheim *et al.* (2009) hanno descritto un protocollo di multiplex-PCR che prevede l'amplificazione di *B. dothidea* e *D. seriata*.

## 1.6. Scopo della tesi

Fino a circa vent'anni fa erano solo tre le specie di Botryosphaeriaceae ritenute essere coinvolte nelle malattie del legno della vite: *D. mutila* (= *Botryosphaeria stevensii*), *D. seriata* (= *B. obtusa*) e *L. theobromae* (= *B. rhodina*). *D. mutila* e *D. seriata* erano considerate gli agenti causali della BDA rispettivamente in Ungheria (Lehoczky, 1974) e in Italia (Cristinzio, 1978; Rovesti & Montermini, 1987), mentre *L. theobromae* era ritenuta l'agente causale della malattia nominata "Diplodia cane dieback and bunch rot" (Hewitt & Pearson, 1988). Tuttavia, i risultati ottenuti in studi effettuati in varie parti del mondo durante l'ultimo decennio, hanno evidenziato una situazione molto più complessa di quanto si potesse credere in precedenza. Nel 2006 risultavano essere 12 le specie di Botryosphaeriaceae isolate dal legno di vite, spesso in associazione con alterazioni del legno e altri sintomi (Luque *et al.*, 2005; van Niekerk *et al.*, 2006), mentre, attualmente, il numero di tali specie è di 17 (Damm *et al.*, 2007; Martin & Cobos, 2007; Carlucci *et al.*, 2009; Aroca *et al.*, 2009).

Obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello acquisire nuove informazioni circa l'ecologia e la tassonomia di questo ubiquitario gruppo di ascomiceti e la natura delle sue interazioni con la vite.

## Capitolo 1. Introduzione generale e scopo della tesi

Con il fine di raccogliere informazioni circa la diffusione, l'epidemiologia e l'attitudine patogenetica delle principali specie di Botryosphaeriaceae isolabili da vite in Toscana, la prima fase del lavoro è stata costituita dall'allestimento di una collezione di isolati, sia da materiale di propagazione che da piante adulte ubicate in un vigneto della provincia di Firenze. Successivamente alla loro caratterizzazione specifica, al fine di valutare le potenzialità patogenetiche di questi funghi, una selezione degli isolati ottenuti è stata impiegata in prove di patogenicità mediante inoculazione artificiale su piante adulte e su barbatelle. Tali prove, oltre che per valutare la capacità degli isolati di provocare alterazioni del legno, sono state effettuate anche per verificare il possibile sviluppo di sintomi fogliari, eventualmente riconducibili a quelli caratterizzanti la "Grapevine leaf stripe disease". Con lo scopo di reperire informazioni riguardanti le interazioni di questi funghi con la pianta ospite, gli stessi isolati utilizzati nei saggi di patogenicità sono stati caratterizzati anche mediante la verifica della produzione di enzimi esocellulari, alcuni dei quali ritenuti importanti fattori di virulenza di questi, e altri organismi fitopatogeni. Gli stessi isolati sono stati inoltre

Infine, con l'obbiettivo di ottenere strumenti utili sia per studi epidemiologici che per indagini diagnostiche, sono stati sviluppati 2 protocolli di diagnosi molecolare, il primo utile per rilevare il DNA delle specie afferenti al "*N. parvum/N. ribis* complex" (Pavlic *et al.*, 2009a), il secondo quello delle 17 specie di Botryosphaeriaceae potenzialmente presenti nei tessuti legnosi della vite. Dopo la messa a punto, i due protocolli sono stati utilizzati per un'indagine epidemiologica condotta sul materiale di propagazione attualmente commercializzato in Italia.

## **CAPITOLO 2**

**Identificazione di una collezione di isolati di Botryosphaeriaceae  
ottenuti da piante adulte e da materiale di propagazione di vite**

### **2.1. Riassunto**

Scopo del presente studio è stato quello di identificare un gruppo di 43 isolati di Botryosphaeriaceae ottenuti dal legno di piante adulte (40 isolati) e da materiale di propagazione di vite (3 isolati). La caratterizzazione specifica dei 43 isolati è stata basata sull'analisi filogenetica condotta utilizzando le sequenze delle regioni ITS1-5,8S-ITS2 (ITS) e di parte dei geni codificanti per la  $\beta$ -tubulina (BT) o il fattore di allungamento 1- $\alpha$  (EF 1- $\alpha$ ). Un'indagine parallela ha riguardato la specie *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), fungo tracheomicotico, responsabile della "Grapevine leaf stripe disease", comunemente ritrovato nel legno di piante di vite, spesso in associazione a specie di Botryosphaeriaceae.

L'analisi effettuata ha permesso di identificare 3 ceppi di *Botryosphaeria dothidea*, 10 di *Diplodia seriata*, tutti da piante adulte, e 30 di *Neofusicoccum parvum* (27 da piante adulte e 3 da materiale di propagazione). Successivamente, con lo scopo di valutare il grado di variabilità tra i ceppi di *N. parvum*, l'analisi filogenetica per i 30 ceppi di quest'ultima specie è stata condotta anche in base alle sequenze delle regioni BT e EF 1- $\alpha$ . I risultati hanno evidenziato la distinzione dei ceppi di *N. parvum* in 3 gruppi filogenetici correlati. Inoltre, l'analisi morfologica degli stessi ha confermato la presenza di caratteristiche tipiche della specie.

Quanto all'origine specifica degli isolati, tutti i 40 ceppi di Botryosphaeriaceae ottenuti dalle 5 piante adulte di vite sono stati isolati da 28 delle 54 alterazioni legnose prese in esame; Pch è stata invece isolata in corrispondenza di 10 alterazioni e solo in 3 casi il suo ritrovamento si è sovrapposto a quello di specie di Botryosphaeriaceae. Nel caso del materiale di propagazione, costituito da 20 barbatelle, gli isolamenti sono stati caratterizzati da un basso tasso di fertilità, indipendentemente dalla presenza o meno di alterazioni del legno. Da tale materiale sono stati isolati solo 3 ceppi di *N. parvum*, mentre da nessun campione è stata isolata Pch.

La presenza delle 3 specie di Botryosphaeriaceae identificate in questo studio (*B. dothidea*, *D. seriata* e *N. parvum*) e specialmente di *N. parvum*, considerata una delle Botryosphaeriaceae più virulente su vite, indica che questi funghi, così come altri patogeni del legno della vite, potrebbero essere coinvolti nello sviluppo di alterazioni del legno e nel deperimento delle piante di vite anche in Toscana. La poco frequente associazione fra Botryosphaeriaceae e Pch, rilevata in questo studio, suggerisce, anche se non esclude, una eventuale azione indipendente dei due tipi di funghi.

## 2.2. Introduzione

Atteso che il numero di specie di Botryosphaeriaceae fino ad oggi isolate da piante di vite è salito a 17, soprattutto in virtù di una più attenta caratterizzazione tassonomica dei funghi ottenuti, (Damm *et al.*, 2007; Martin & Cobos, 2007; Carlucci *et al.*, 2009; Aroca *et al.*, 2009), in Italia, fino a circa due anni fa, le uniche notizie relative all'isolamento di tali funghi dal legno di vite si riferivano agli studi di Cristinzio (1978) e di Rovesti & Montermini (1987), entrambi riguardanti il ritrovamento di *D. seriata*. Più recentemente è stata riportata la presenza di *Lasiodiplodia theobromae* nella provincia di Trapani (Burruano *et al.*, 2008) e di 9 specie nei vigneti pugliesi (Carlucci *et al.*, 2009). In quest'ultimo caso, oltre ad essere stata ritrovata per la prima volta su vite la specie *Diplodia corticola*, è stata riportata anche la presenza della specie *Neofusicoccum parvum*, ritenuta una delle Botryosphaeriaceae più virulente su vite (Phillips 2002; van Niekerk *et al.*, 2004; Martos *et al.*, 2008; Laveau *et al.*, 2009; Úrbez-Torres & Gubler, 2009).

A causa della scarsa varietà morfologica delle specie teleomorfe e degli sporadici ritrovamenti di queste forme *in vitro* così come in natura, la tassonomia e l'identificazione delle specie di Botryosphaeriaceae si sono basate principalmente sui caratteri degli anamorfi (Denman *et al.*, 2000). Tuttavia, la distinzione basata sul confronto dei caratteri delle specie anamorfe, sebbene meno difficoltosa rispetto a quella impostata sul confronto dei teleomorfi (Denman *et al.*, 2000), ha spesso causato confusione a causa della mancanza di peculiarità che permettessero la discriminazione tra specie strettamente correlate (Jacobs & Rehner, 1998). Un valido supporto all'analisi classica si è rivelato l'uso della filogenetica molecolare, basata sull'analisi di sequenza di regioni altamente conservate. La regione genica maggiormente utilizzata per l'identificazione delle specie di Botryosphaeriaceae, e di altri funghi, è rappresentata dall'rDNA ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) (Hajibabaei *et al.*, 2007; Pavlic *et al.*, 2009a). Nel caso specifico delle Botryosphaeriaceae, l'analisi multigenica (combined multiple gene genealogies), basata su un'analisi filogenetica condotta utilizzando i caratteri di più regioni geniche, ha consentito la distinzione tra specie strettamente correlate (Slippers *et al.*, 2004a; 2004b) e la descrizione di altre (Luque *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2005; Pavlic *et al.*, 2009a). Le regioni maggiormente utilizzate per l'analisi multigenica sono rappresentate, oltre che dall'ITS, da parti dei geni che codificano per la  $\beta$ -tubulina (BT) e per il fattore di allungamento 1- $\alpha$  (EF 1- $\alpha$ ). Per questo motivo, l'identificazione delle specie di Botryosphaeriaceae, isolate da vite o altri ospiti, è attualmente basata

sull'analisi filogenetica condotta sfruttando le informazioni derivanti da almeno due regioni geniche (van Niekerk *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Slippers *et al.*, 2007; Úrbez-Torres *et al.*, 2006, Alves *et al.*, 2008; Úrbez-Torres *et al.*, 2008; Lazzizzera *et al.*, 2008; Pavlic *et al.*, 2009a).

Un recente studio condotto in Sudafrica su isolati ottenuti da *Syzygium cordatum* (Pavlic *et al.*, 2009a), basato sull'utilizzo di una tecnica denominata "Genealogical concordance phylogenetic species recognition" (GCPSR), ha confermato la distinzione tra *N. parvum* e la specie strettamente correlata *N. ribis*, anche quest'ultima considerata un importante patogeno del legno della vite. Tuttavia, a causa della stretta correlazione tra le 2 specie, gli autori hanno optato per considerarle come componenti di un complesso, denominato "*Neofusicoccum parvum/N. ribis* complex". Inoltre, nello stesso studio, l'utilizzo della GCPSR ha evidenziato, a differenza di quanto era stato possibile con la sola analisi morfologica, l'esistenza di 3 specie criptiche nell'ambito del "*N. parvum/N. ribis* complex", denominate *N. cordaticola*, *N. kwambonambiense* e *N. umdonicola*. Ad oggi, queste specie criptiche sono state ritrovate solo su *Syzygium cordatum* (Pavlic *et al.*, 2009a), quindi le uniche specie del complesso isolate dalla vite risultano essere *N. parvum* e *N. ribis*.

In questo studio, con lo scopo di ricavare maggiori informazioni circa la presenza di Botryosphaeriaceae nei vigneti italiani, è stata condotta un'indagine esplorativa in un vigneto della provincia di Firenze e su materiale di propagazione commercializzato in Italia. Inoltre, al fine di verificare la distribuzione relativa di questi funghi, è stato effettuato anche il monitoraggio di *Phaeoconiella chlamydospora* (Pch), fungo tracheomicotico, agente causale della "Grapevine leaf stripe disease" (ex esca) (Surico, 2009), comunemente rinvenuto nel legno delle piante di vite adulte e nel materiale di propagazione (Retief *et al.*, 2006; Aroca *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2007). L'identificazione degli isolati di Botryosphaeriaceae ottenuti è stata effettuata mediante analisi filogenetica, basata sulle sequenze delle regioni ITS, EF 1- $\alpha$  e BT.

## 2.3. Materiali e Metodi

### 2.3.1. Materiale vegetale

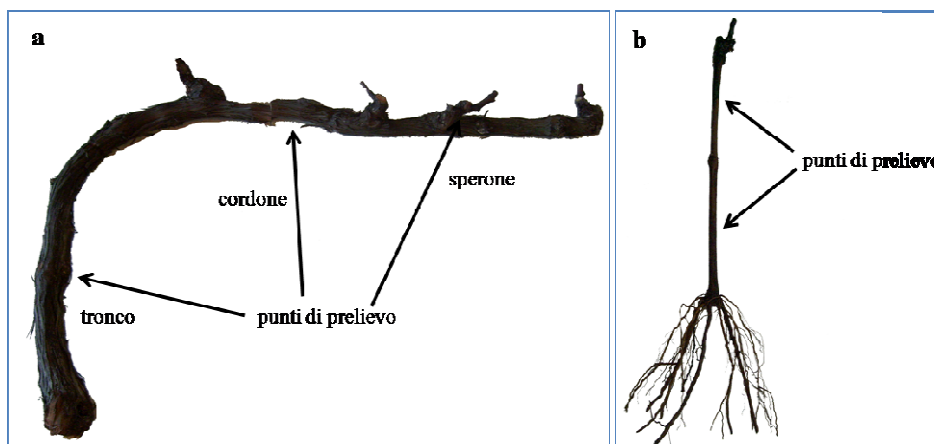
Come materiale vegetale di partenza sono state utilizzate 5 viti adulte (cultivar Sauvignon blanc) e 20 barbatelle con differenti combinazioni di cultivar e/o portinnesto. Le viti adulte, espantate da un vigneto di 12 anni ubicato presso l'azienda agraria dell'Università di Firenze (Villa Montepaldi), sita a San Casciano in Val di Pesa (FI), sono state scelte, in diversi punti del vigneto, tra quelle che nella stagione vegetativa precedente avevano manifestato sintomi di deperimento e/o la sintomatologia fogliare della "Grapevine leaf stripe disease" (Fig. 1). Le barbatelle sono state prelevate a caso da 3 lotti prodotti da un vivaio della provincia di Firenze (vivaio A) e da un lotto prodotto da un vivaio francese (vivaio B). Per ognuna delle 5 piante adulte, allevate con la tecnica del "cordone speronato", sono stati presi in esame segmenti del tronco, del cordone e dello sperone, mentre, nel caso delle barbatelle, sono stati considerati 2 o 3 punti del portinnesto (Fig. 2). Dopo lavaggio con acqua corrente, le piante adulte e le barbatelle sono state sezionate trasversalmente, disinfettate secondo le modalità descritte da Retief *et al.* (2006) e private della corteccia mediante l'utilizzo di una lama sterile. I campioni legnosi, rappresentati dalle porzioni di tronchi, cordoni e speroni delle piante adulte, o dal portinnesto delle barbatelle, sono stati poi sezionati longitudinalmente per verificare l'eventuale presenza di alterazioni del legno (Fig. 2). Nel caso delle piante adulte, frammenti legnosi (peso medio  $98 \pm 20$  mg) sono stati prelevati esclusivamente dalle alterazioni più rappresentative (Fig. 3), mentre, nel caso delle barbatelle, i frammenti legnosi sono stati prelevati sia dal legno con alterazioni sia da legno apparentemente sano (Fig. 3).



**Figura 1.** Pianta di Sauvignon blanc con sintomi di Grapevine leaf stripe disease utilizzate nelle prove per verificare la presenza di specie di Botryosphaeriaceae e di Pch.



**Figura 2.** Punti di prelievo dei campioni legnosi dalle piante adulte (a) e dalle barbatelle (b).



**Figura 3.** Esempi delle alterazioni legnose più frequentemente osservate all'interno dei tronchi, dei cordoni o degli speroni delle piante adulte (**a** e **b**, sezione longitudinale; **c** e **d**, sezione trasversale) o all'interno del legno delle barbatelle (**ef**), legno apparentemente asintomatico del portinnesto di una barbatella. La maggior parte delle alterazioni osservate è stata ritrovata in corrispondenza di ferite da potatura.



### **2.3.2. Isolamento e caratterizzazione delle *Botryosphaeriaceae* e di *Pch***

Da ogni campione legnoso, 7 frammenti di legno sono stati prelevati asetticamente e posti in piastre Petri contenenti brodo di patata-destrosio e agar (PDA) al 2% (Difco laboratories Inc., Detroit, MI, USA), addizionato con solfato di streptomina allo 0.015% (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, USA). Le piastre sono state poi incubate per circa 3 settimane, in assenza di luce, a 25°C. Le colonie di *Botryosphaeriaceae*, sviluppatesi dalle schegge di legno alterato, sono state inizialmente identificate sulla base della caratteristica della colonia e, per ogni alterazione dalla quale si sono sviluppate tali colonie, sono stati ottenuti da 1 a 4 isolati puri. Tutti gli isolati di *Botryosphaeriaceae* sono stati poi ulteriormente identificati mediante analisi di sequenza della regione ITS, in accordo a come riportato da Úrbez-Torres *et al.* (2006). In seguito, una selezione di isolati, che sulla base della sequenza ITS sono stati ascritti al “*Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex” (Pavlic *et al.*, 2009a), è stata ulteriormente caratterizzata mediante analisi di sequenza di parti dei geni BT e EF1- $\alpha$  e successiva analisi filogenetica. L’analisi morfologica è stata condotta su una selezione di ceppi

scelti in base ai risultati ottenuti con l'analisi filogenetica. Gli isolati di Pch sono stati identificati in base alla caratteristica della colonia.

### **2.3.2.1. Analisi filogenetica degli isolati di Botryosphaeriaceae**

#### **2.3.2.1.1. Estrazione del DNA**

Ogni isolato di Botryosphaeriaceae è stato cresciuto in 30 ml di PDB al 2%, in assenza di luce, a 25°C e in agitazione (100 rpm) per 7-14 giorni. Circa 200 mg della massa miceliare sviluppata sono stati prelevati asepticamente e sottoposti ad estrazione del DNA. Ciascun campione di micelio fungino è stato posto in un mortaio di ceramica e disgregato con l'ausilio di sabbia inerte sterile e azoto liquido. Dopo l'aggiunta di 800 µl di buffer AP1 (Qiagen N.V., Venlo, Netherlands), le successive fasi di estrazione del DNA sono state eseguite utilizzando il "DNeasy Plant Minikit" (Qiagen N.V., Venlo, Netherlands), secondo le istruzioni riportate.

Al fine di verificare l'avvenuta estrazione del DNA e l'assenza di inibitori della PCR, tutti i campioni ottenuti sono stati inizialmente amplificati utilizzando i "primer" universali ITS5 e ITS4 (White *et al.*, 1990) e in seguito conservati a -80°C prima delle successive amplificazioni.

#### **2.3.2.1.2. Amplificazione delle regioni ITS, BT e EF1- $\alpha$ mediante standard PCR**

Le reazioni di PCR sono state condotte utilizzando un termocicizzatore *Bio-rad* (Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). La *Taq* (DreamTaq™) e gli altri reagenti sono stati acquistati dalla "Fermentas International Inc.," (Burlington, Ontario, Canada) mentre i "primer" sono stati sintetizzati dalla "Eurofins MWG Operon" (Ebersberg, Germany). Tutte le reazioni sono state allestite in un volume finale di 25 µl in base ai protocolli descritti da Úrbez-Torres *et al.* (2006) nel caso delle amplificazioni delle regioni ITS e BT, o da van Niekerk *et al.* (2004) nel caso dell'amplificazione della regione EF1- $\alpha$ .

#### **2.3.2.1.3. Analisi filogenetica**

Tutti i prodotti di PCR sono stati purificati con il metodo "EXOSAP" (USB Europe GmbH, Staufen, Germany) secondo le istruzioni riportate e sottoposti ad analisi di sequenza con sequenziatore "ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.

1.1” (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), utilizzando il sistema “ABI prism 310 CE” (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). I cromatogrammi, inclusi delle sequenze senso e antisense, sono stati revisionati e assemblati manualmente al fine di ottenere una singola sequenza consenso, la cui identificazione è stata effettuata mediante comparazione con quelle disponibili nel “database” INSD.

Per ogni gruppo di sequenze (ITS, BT, EF1- $\alpha$ ), l’analisi filogenetica è stata condotta utilizzando sia l’analisi Bayesiana che il criterio della Massima Parsimonia. Relativamente alle specie di *Neofusicoccum* isolate da vite, e a tutti i componenti del “*N. parvum/N. ribis* complex”, l’analisi è stata condotta anche considerando, contemporaneamente, le sequenze ITS e EF 1- $\alpha$  (ITS + EF 1- $\alpha$ ), la cui congruenza è stata verificata mediante il test di partizione dell’omogeneità (partition homogeneity test), utilizzando il programma PAUP\* v.4.0b10 (Swofford, 2002). Nei casi in cui non sono risultate disponibili sequenze di riferimento relative a Botryosphaeriaceae isolate da vite, sono state utilizzate quelle di ceppi isolati da altri ospiti. Le sequenze sono state allineate con il programma Clustalw, utilizzando l’opzione Mega 4.1 (Tamura *et al.*, 2007) e l’analisi filogenetica è stata condotta con il programma “MrBayes v 3.1.2” (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) nel caso dell’analisi Bayesiana, o MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007) nel caso del criterio della Massima Parsimonia.

L’analisi Bayesiana è stata condotta secondo le seguenti impostazioni: “substitution rate=2, nucleotide frequencies=equal, 25% of the trees and sampled generations discarded”; per ogni gruppo di sequenze sono state effettuate 3 corse indipendenti per verificare la congruenza del risultato e gli alberi filogenetici risultanti sono stati visualizzati e revisionati utilizzando il programma Figtree v 1.2.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

L’analisi filogenetica basata sul criterio della Massima Parsimonia è stata condotta impostando l’opzione di ricerca euristica (branch swapping NNI) e, per verificare la lunghezza dei bracci, sono state valutate 1000 repliche dei valori di “Bootstrap”. Gli alberi filogenetici ottenuti sono stati visualizzati e revisionati con l’ausilio del programma MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007).

Nel caso dell’analisi filogenetica relativa alle sequenze ITS di tutte le specie di Botryosphaeriaceae da vite, l’“outgroup” è stato rappresentato da *Guignardia bidwelli* CBS 111145 (codice di accesso a GenBank: EU683672), mentre, quando l’analisi è stata effettuata considerando le sequenze ITS, BT e EF1- $\alpha$  delle sole specie di *Neofusicoccum*,

L'“outgroup” è stato costituito da *B. dothidea* CMW8000 (codici di accesso a GenBank: ITS, AY236949; BT, AY236927; EF1- $\alpha$ , AY236898).

### **2.3.2.2. Analisi morfologica**

Al fine di ottenere la formazione dei picnidi, i ceppi sono stati cresciuti in piastre Petri ( $\emptyset$  60 mm) contenenti agar al 2% e tralci di pioppo della lunghezza di circa 4 cm. Le piastre sono state incubate a temperatura ambiente e in presenza di luce naturale. Quando presenti, i picnidi sono stati sezionati trasversalmente con lama sterile e, il contenuto, costituito da cellule conidiogene e conidi, è stato montato su vetrino in presenza di acido lattico al 100%. L'osservazione delle strutture microscopiche è stata effettuata con stereomicroscopio “Leica MZ95” e microscopio “Leica DMR” e le rispettive immagini digitali sono state ottenute con le videocamere “Leica DFC320” e “Leica DC300”. Le misurazioni sono state condotte con l'ausilio del modulo di misurazione “Leica IM500 image management system” (Leica Micro-systems GmbH, Wetzlar, Germany).

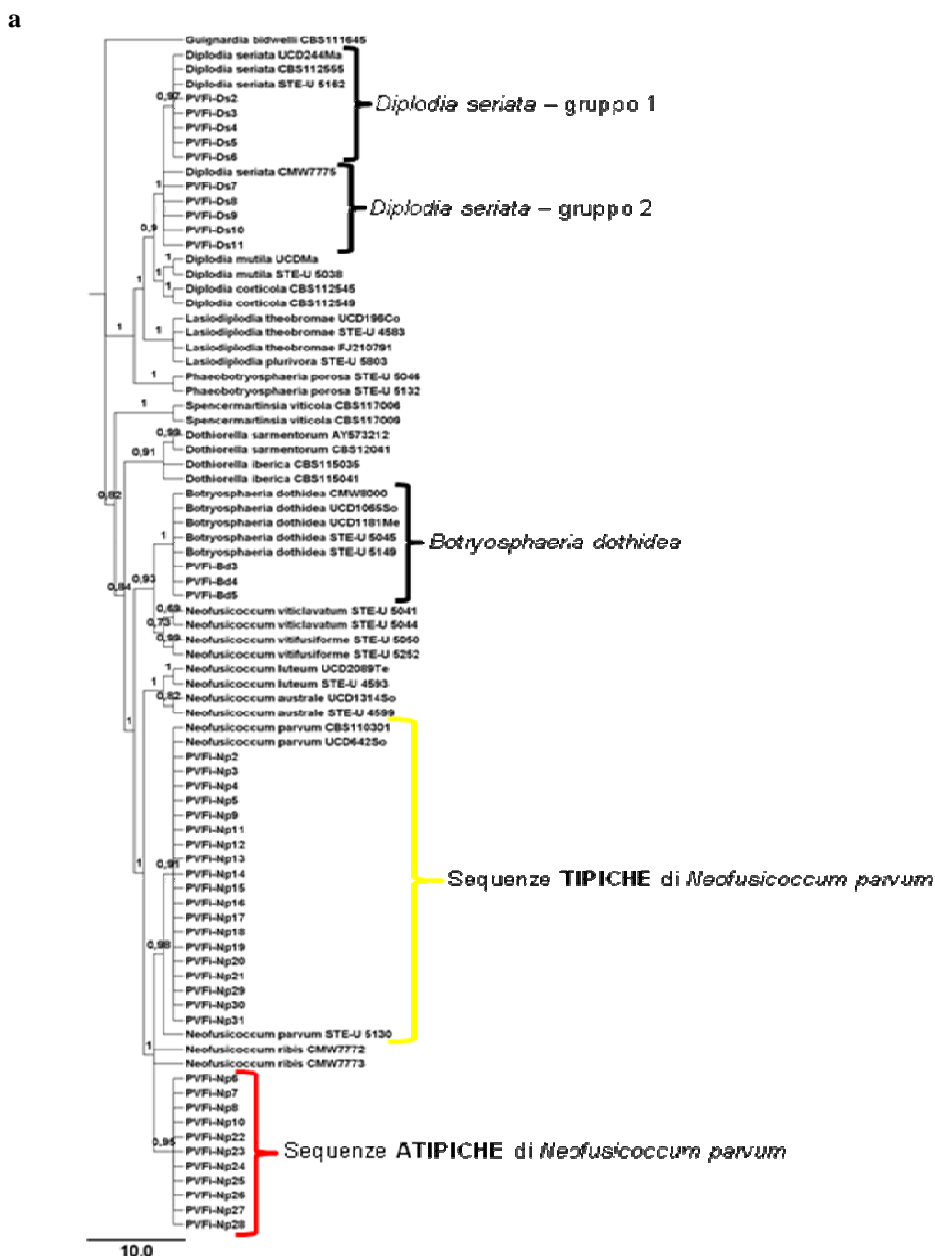
## **2.4. Risultati**

### **2.4.1. Analisi filogenetica degli isolati di Botryosphaeriaceae**

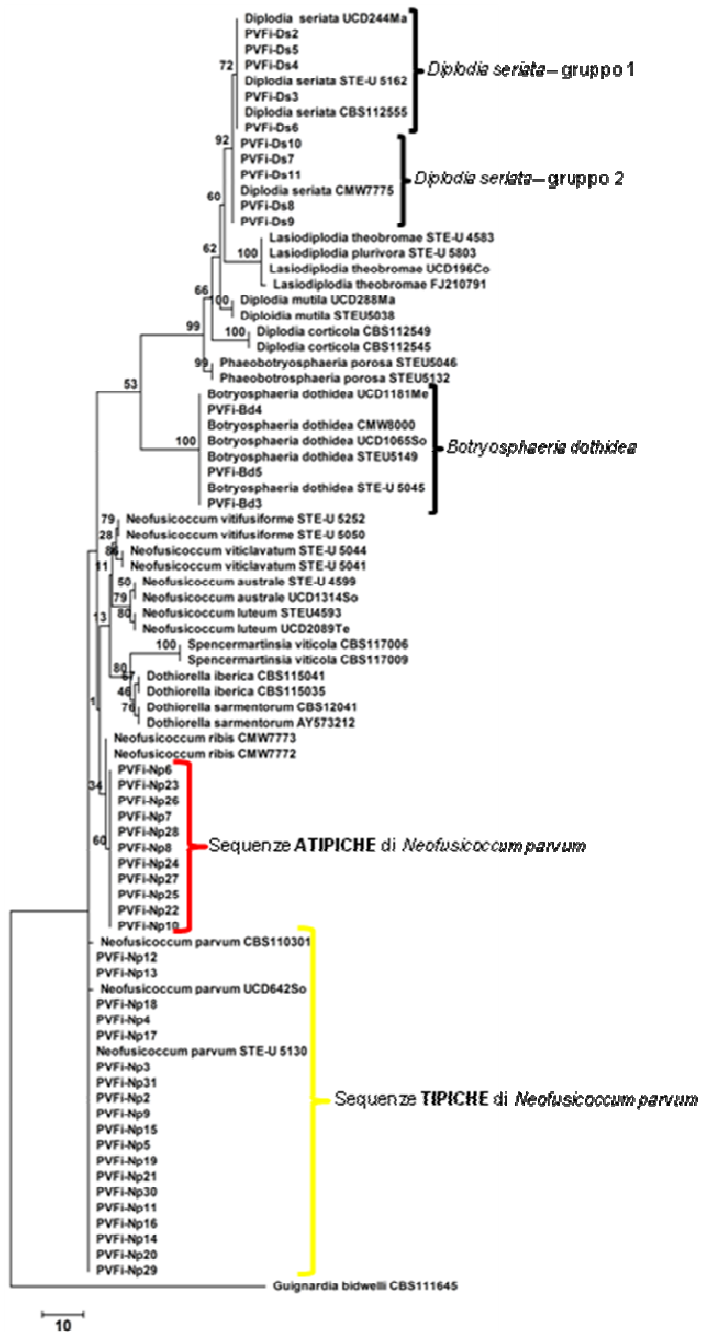
L'analisi filogenetica dei 43 isolati di Botryosphaeriaceae ha condotto all'identificazione di 3 ceppi di *B. dothidea*, 10 di *D. seriata* e 30 di *N. parvum*. In base alle caratteristiche della regione ITS, entrambi i metodi di analisi utilizzati hanno permesso di individuare un unico clado relativo a *B. dothidea* e due per *D. seriata* e *N. parvum* (Fig. 4). Tuttavia, mentre i due tipi di sequenze di *D. seriata* sono stati raggruppati con varianti già note della specie, nel caso di *N. parvum*, uno dei due gruppi non è stato supportato da nessuna delle sequenze di riferimento utilizzate. Le sequenze di questo gruppo, caratterizzate da una relativamente maggiore identità con quelle di *N. ribis*, sono state pertanto definite “atipiche”, mentre, le restanti, avendo formato un unico clado contenente anche la sequenza del ceppo tipo (*N. parvum* CBS110301) sono state definite “tipiche”. Il gruppo delle sequenze “atipiche” è risultato evidente, integralmente, anche in seguito all'analisi filogenetica condotta considerando esclusivamente le sequenze ITS di specie di *Neofusicoccum*, comprese quelle delle altre componenti del complesso “*N. parvum/N. ribis*” (Fig. 5). Nessuna distinzione, tra i ceppi di *N. parvum* ottenuti in questo studio (PVFi-Np), è stata invece osservata nel caso dell'analisi filogenetica condotta per le

sequenze di parte del gene codificante per la  $\beta$ -tubulina. Infatti, a parte la sequenza relativa al ceppo *N. parvum* CMW27901, le restanti hanno formato un unico clado insieme al ceppo tipo (Fig. 6). Comunque, le sequenze di riferimento utilizzate in questa analisi si riferiscono solo ai componenti del complesso “*N. parvum/N. ribis*” in quanto non sono risultate reperibili sequenze relative ad altre specie di *Neofusicoccum*. La presenza di sequenze “atipiche” è stata nuovamente osservata in seguito all’analisi filogenetica condotta utilizzando parte del gene codificante per il fattore di allungamento 1- $\alpha$  (EF 1-  $\alpha$ ). Sia l’analisi Bayesiana sia il metodo della Massima Parsimonia hanno infatti generato 2 gruppi relativi a *N. parvum*, uno che include il ceppo tipo, insieme al ceppo PVFi-Np e ad altri 3 di riferimento, e l’altro costituito da tutti i ceppi PVFi-Np aventi sequenze ITS “atipiche”, ma anche da alcuni, compresi i restanti 3 ceppi di riferimento, che con l’analisi dell’ITS erano stati raggruppati insieme al ceppo tipo (Fig. 7). Questo risultato ha fatto ipotizzare che, in base alle regioni geniche considerate, i ceppi PVFi-Np fossero suddivisibili in 3 gruppi: uno caratterizzato da sequenze ITS ed EF 1-  $\alpha$  “atipiche”, uno con sequenze ITS “tipiche” ed EF 1-  $\alpha$  “atipiche” e uno con entrambi i tipi di sequenze “tipiche”. Tale ipotesi è stata confermata, con entrambi i metodi utilizzati, in seguito all’analisi condotta considerando contemporaneamente le informazioni relative sia alla regione ITS che all’EF 1-  $\alpha$  (Fig. 8), evidenziando la presenza di un gruppo di ceppi PVFi-Np, aventi sia sequenze ITS che EF 1-  $\alpha$  “atipiche”, non supportato da alcun ceppo di riferimento. Il test di partizione dell’omogeneità ha evidenziato la mancanza di incongruenze significative ( $P=0.133$ ) tra le sequenze ITS e EF 1- $\alpha$  dei ceppi di *Neofusicoccum*, validando il risultato ottenuto in seguito al contemporaneo utilizzo dei 2 tipi di sequenze.

**Figura 4.** Analisi filogenetica condotta utilizzando le sequenze ITS dei 43 isolati di Botryosphaeriaceae ottenuti in questo studio (PVFi-) e almeno una sequenza di riferimento per ognuna delle specie di Botryosphaeriaceae isolate dal legno di vite. Il ceppo “outgroup” è rappresentato da *Guignardia bidwelli* CBS111645. **a)** albero di consenso dell’analisi Bayesiana (15002 repliche). I valori di supporto rappresentano la probabilità a posteriori (la probabilità che il clado sia corretto, dati i parametri e i dati). La lunghezza della barra rappresenta 10 variazioni. **b)** albero consenso ottenuto con il criterio della Massima Parsimonia. I valori di “bootstrap” rappresentano il risultato di 1000 repliche. La lunghezza della barra rappresenta 10 variazioni.



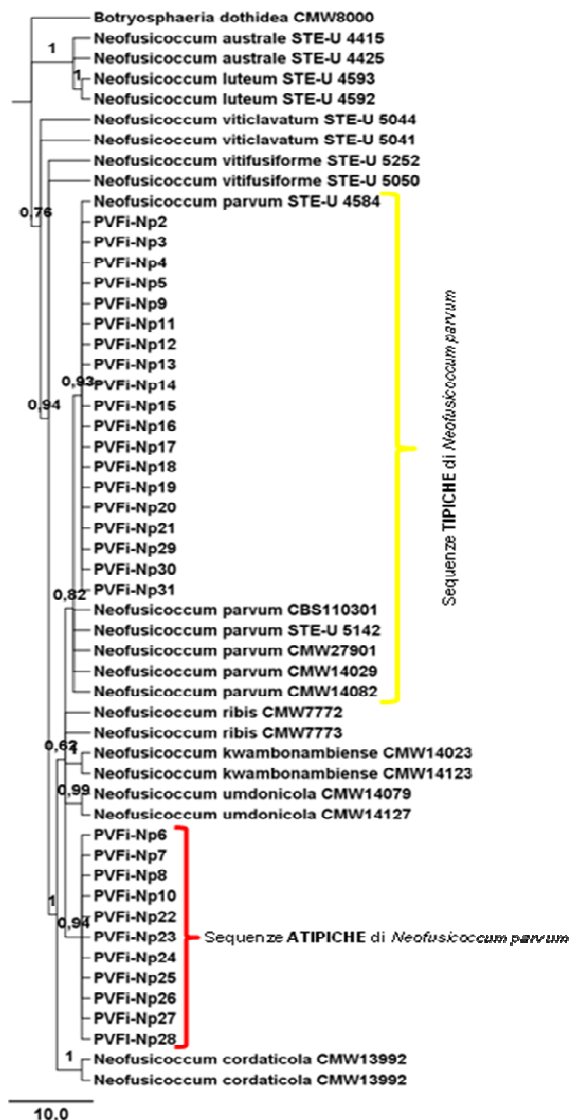
b



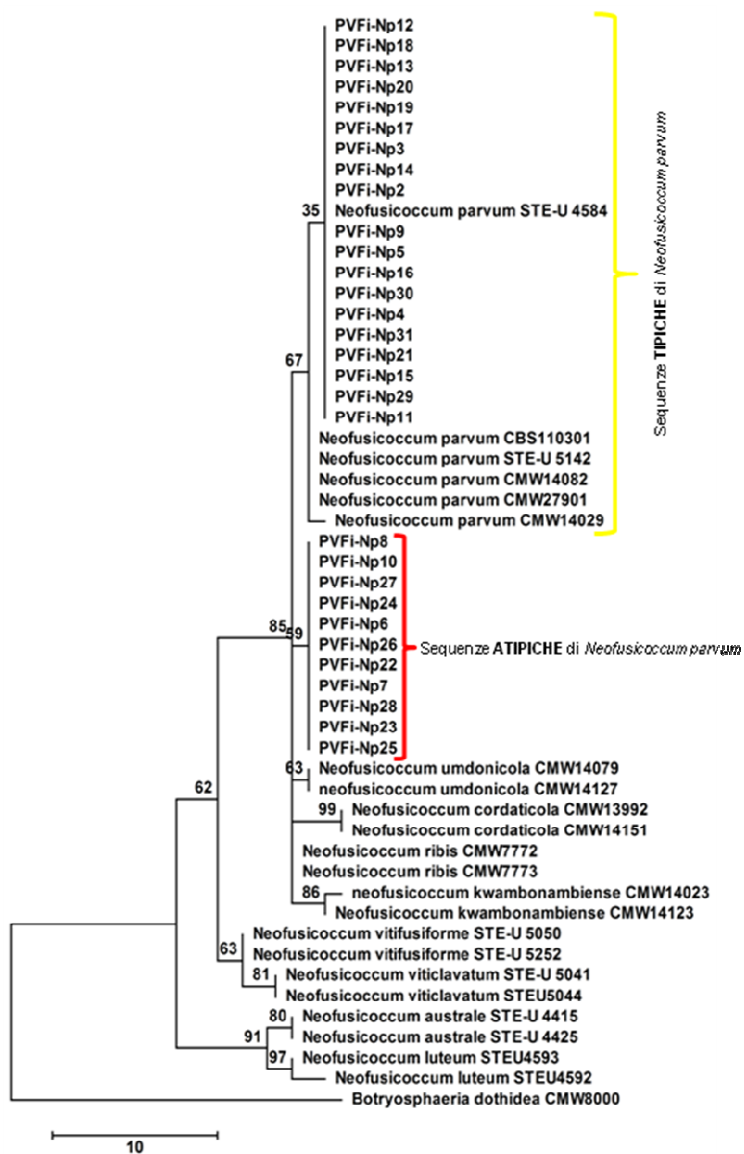


**Figura 5.** Analisi filogenetica condotta utilizzando le sequenze ITS dei 30 ceppi di *N. parvum* ottenuti in questo studio (PVFi-Np) e almeno una sequenza di riferimento per ognuna delle specie appartenenti al “*N. parvum/N. ribis* complex” e delle specie di *Neofusicoccum* isolate dal legno di vite. **a)** albero di consenso dell’analisi Bayesiana (15002 repliche). I valori di supporto rappresentano la probabilità a posteriori (la probabilità che il clado sia corretto, dati i parametri e i dati). La lunghezza della barra rappresenta 10 variazioni. **b)** albero consenso ottenuto con il criterio della Massima Parsimonia. I valori di “bootstrap” rappresentano il risultato di 1000 repliche. La lunghezza della barra rappresenta 10 variazioni.

**a**

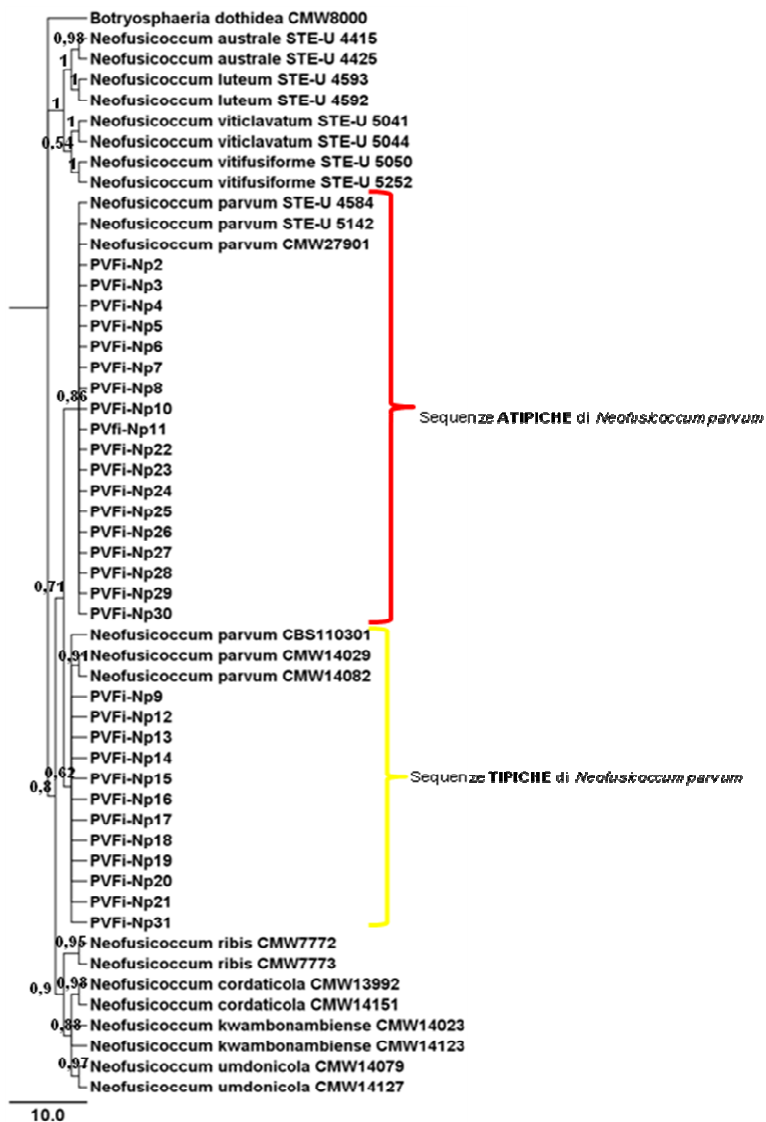


b

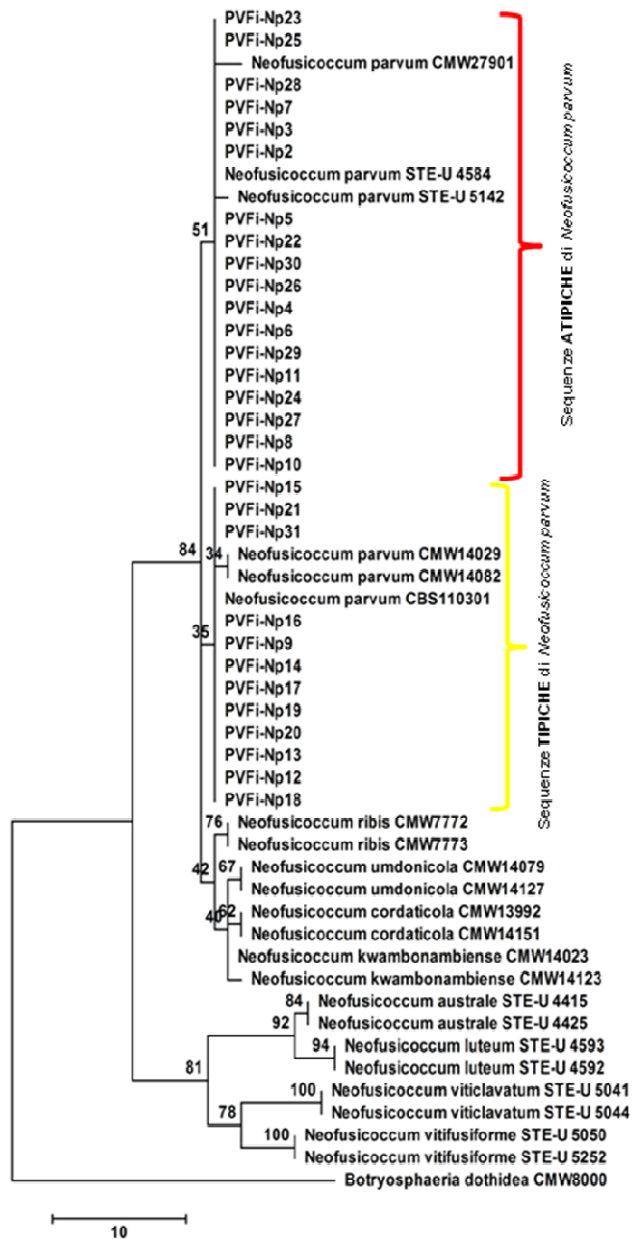


**Figura 6.** Analisi filogenetica condotta utilizzando le sequenze EF 1- $\alpha$  dei 30 ceppi di *N. parvum* ottenuti in questo studio (PVFi-Np) e almeno una sequenza di riferimento per ognuna delle specie appartenenti al “*N. parvum/N. ribis* complex” e delle specie di *Neofusicoccum* isolate dal legno di vite. **a)** albero di consenso dell’analisi Bayesiana (15002 repliche). I valori di supporto rappresentano la probabilità a posteriori (la probabilità che il clado sia corretto, dati i parametri e i dati). La lunghezza della barra rappresenta 10 variazioni. **b)** albero consenso ottenuto con il criterio della Massima Parsimonia. I valori di “bootstrap” rappresentano il risultato di 1000 repliche. La lunghezza della barra rappresenta 10 variazioni.

**a**

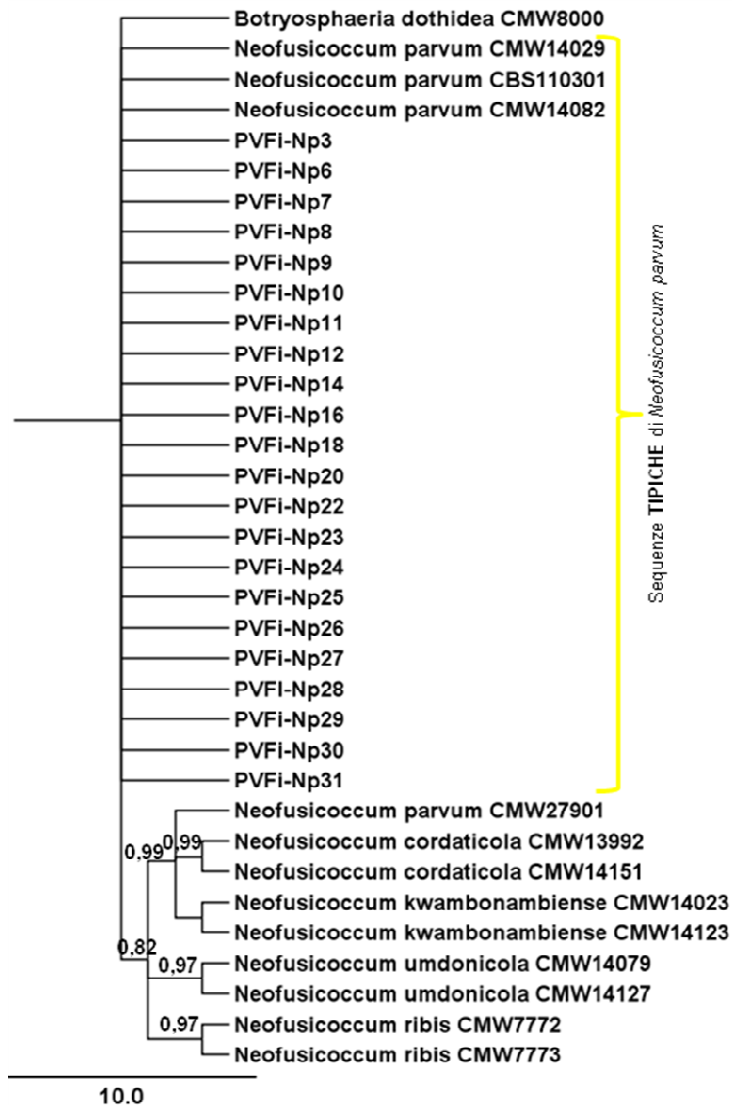


b

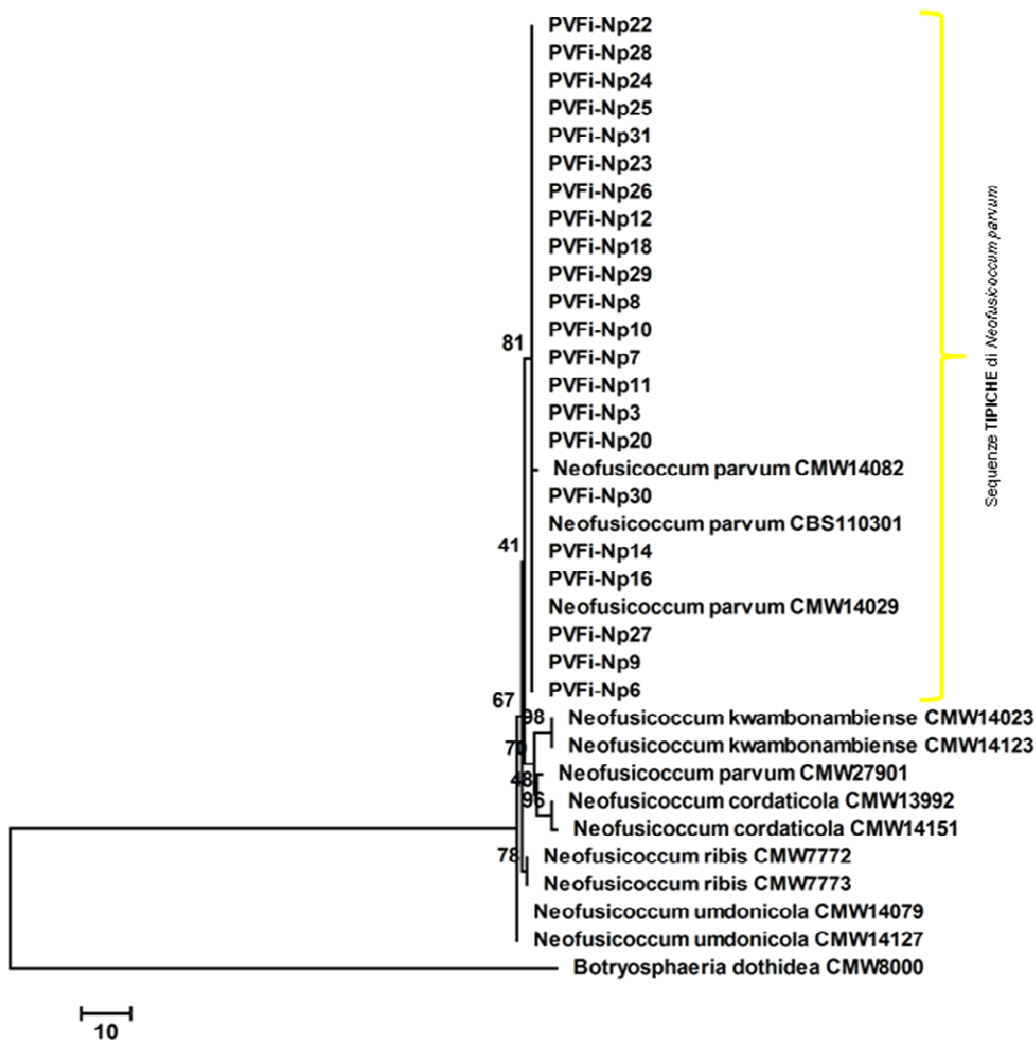


**Figura 7.** Analisi filogenetica condotta utilizzando le sequenze BT di una selezione dei 30 ceppi di *N. parvum* ottenuti in questo studio (PVFi-Np) e almeno una sequenza di riferimento per ognuna delle specie appartenenti al “*N. parvum*/*N. ribis* complex”. **a)**, albero di consenso dell’analisi Bayesiana (15002 repliche). I valori di supporto rappresentano la probabilità a posteriori (la probabilità che il clado sia corretto, dati i parametri e i dati). La lunghezza della barra rappresenta 10 variazioni. **b)**, albero consenso ottenuto con il criterio della Massima Parsimonia. I valori di “bootstrap” rappresentano il risultato di 1000 repliche. La lunghezza della barra rappresenta 10 variazioni.

**a**

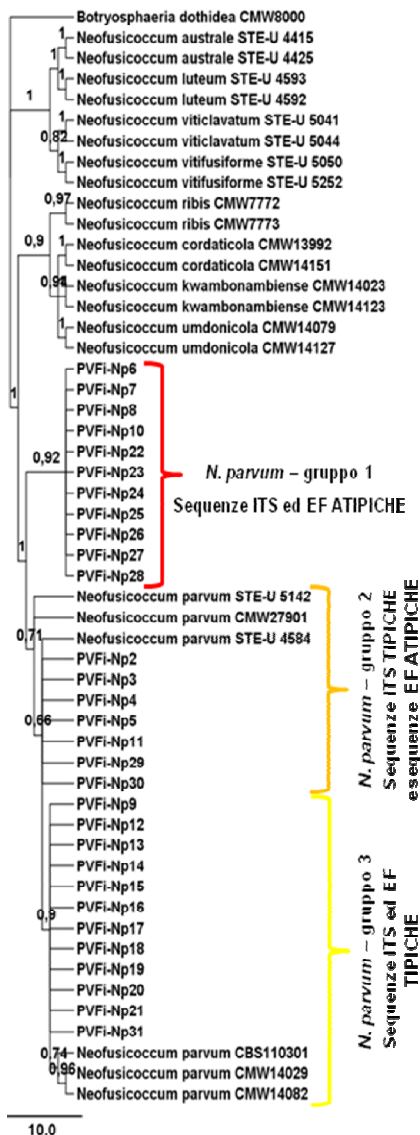


b

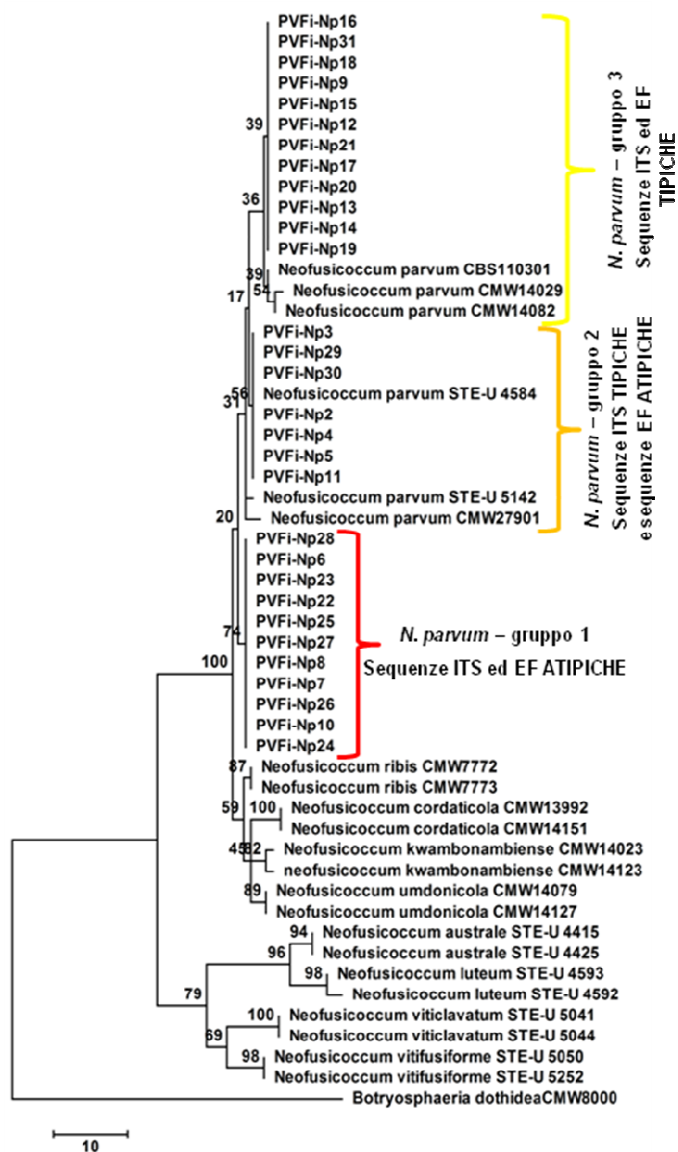


**Figura 8** . Analisi filogenetica condotta utilizzando le sequenze ITS e EF 1- $\alpha$  dei 30 ceppi di *N. parvum* ottenuti in questo studio (PVFi-Np) e almeno una sequenza di riferimento per ognuna delle specie appartenenti al “*N. parvum*/*N. ribis* complex” e delle specie di *Neofusicoccum* isolate dal legno di vite. **a)** ,albero di consenso dell’analisi Bayesiana (15002 repliche). I valori di supporto rappresentano la probabilità a posteriori (la probabilità che il clado sia corretto, dati i parametri e i dati). La lunghezza della barra rappresenta 10 variazioni. **b)** ,albero consenso ottenuto con il criterio della Massima Parsimonia. I valori di “bootstrap” rappresentano il risultato di 1000 repliche. La lunghezza della barra rappresenta 10 variazioni.

**a**



b

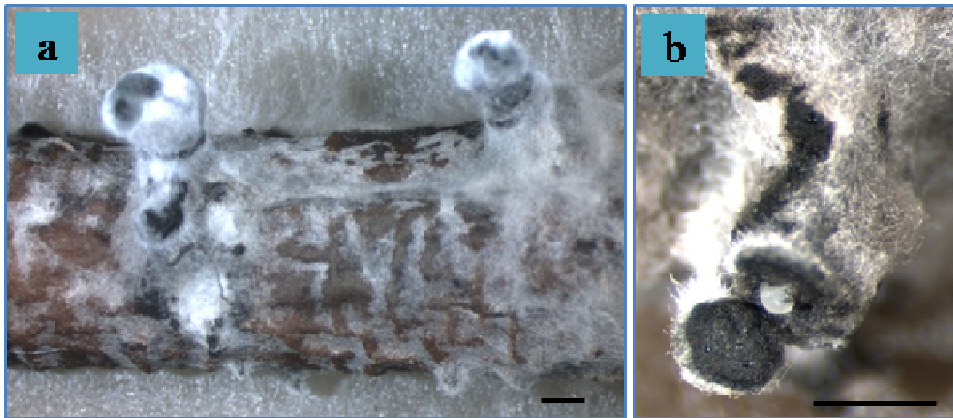




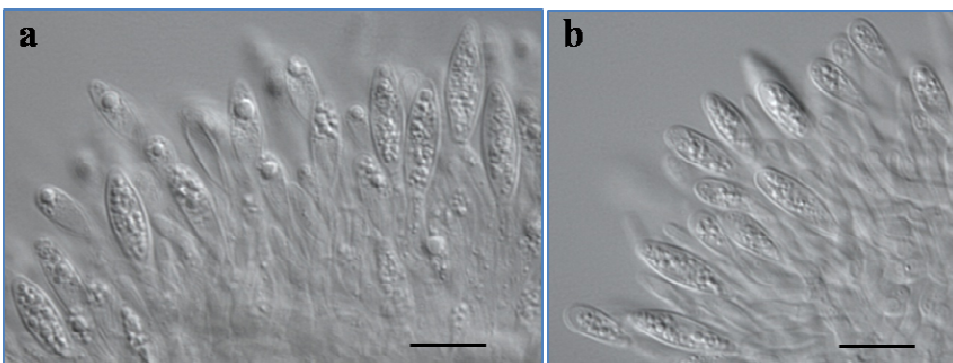
#### 2.4.2. Analisi morfologica

L'analisi morfologica è stata effettuata solo su alcuni ceppi di *N. parvum* in quanto nei casi di *B. dothidea* e di *D. seriata* non è stata osservata la formazione di strutture riproduttive. Nel caso di *N. parvum*, la formazione di picnidi è stata osservata dopo un periodo di circa 20 gg (Fig. 9) e la successiva analisi microscopica del loro contenuto ha consentito di apprezzare, nella maggior parte dei casi, le diverse fasi della conidiogenesi (Fig. 10).

**Figura 9.** Sviluppo di picnidi di una colonia di *N. parvum* sulla superficie di tralci di pioppo posti in piastre Petri (Ø 60 mm) contenenti agar/acqua al 2% (a); b) fuoriuscita del contenuto di un picnidio, sviluppatosi da una colonia di *N. parvum*, in seguito al sezionamento trasversale effettuato a livello dell'estremità superiore. Le barre indicano una lunghezza di 1mm.

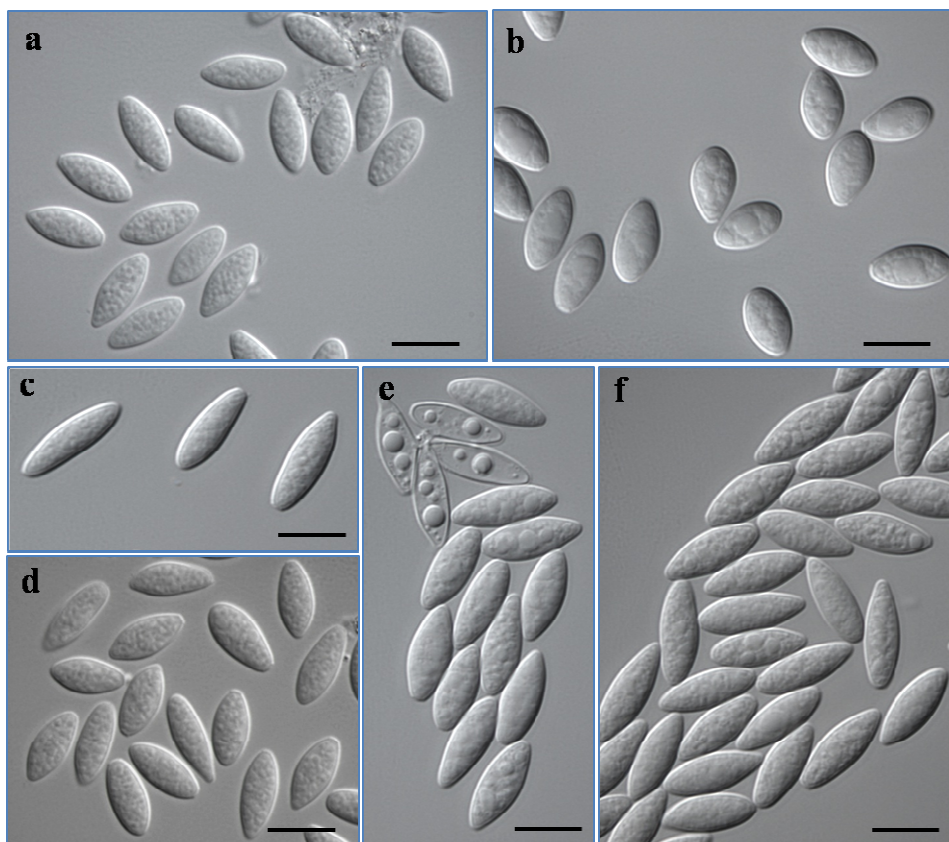


**Figura 10.** Conidiogenesi in 2 ceppi di *N. parvum*. a), immagine raffigurante diverse fasi della conidiogenesi nel ceppo PVFi-Np9; b), conidiogenesi nel ceppo PVFi-Np27. Le barre indicano una lunghezza di 10µm.



I ceppi di *N. parvum* sottoposti ad analisi morfologica, rappresentativi dei 3 gruppi filogenetici individuati nell'ambito della specie, hanno evidenziato la formazione di conidi aventi caratteristiche morfologiche corrispondenti a quelle tipiche della specie. In tutti i casi infatti è stato osservato l'aspetto ialino, la parete sottile, la forma fusoide/ellissoidale, l'estremità inferiore più arrotondata rispetto a quella superiore e la massima larghezza a livello mediano o del terzo tratto superiore (Fig. 11). In nessun caso, probabilmente a causa del breve lasso di tempo trascorso dall'inizio della conidiogenesi, è stata osservata la presenza di conidi di aspetto olivaceo, con parete inspessita e mono- o bi-settati, caratteristiche "tipiche" della forma matura di questi propaguli.

**Figura 11.** Conidi dei diversi ceppi PVFi-Np (*N. parvum*). **a e b**; conidi dei ceppi PVFi-Np gruppo 1, **a**), PVFi-Np8; **b**), PVFi-Np10; **c e d**; conidi dei ceppi PVFi-Np gruppo 2; **c**), PVFi-Np3; **d**), PVFi-Np11; **e ed f**; conidi dei ceppi PVFi-Np gruppo 3; **e**), PVFi-Np9; **f**), PVFi-Np14. Le barre indicano una lunghezza di 10µm.



Tuttavia, sono state osservate delle peculiarità di dimensione e struttura correlate ai singoli ceppi, quindi apparentemente indipendenti dal gruppo filogenetico di appartenenza. È da precisare che tale variabilità è stata verificata soprattutto tra i componenti del gruppo 1 (Fig. 11a e 11b) e tra quelli del gruppo 2 (Fig. 11c e 11d), mentre una maggiore uniformità è stata osservata tra i componenti del gruppo 3, risultati maggiormente correlati al ceppo tipo in seguito all'analisi filogenetica.

Le dimensioni medie dei conidi dei ceppi utilizzati in questo studio (PVFi-Np), confrontate con quelle ottenute nel lavoro di Phillips (2002), sono apparse in generale più piccole, soprattutto per quanto riguarda la lunghezza (Tab. 1). Di conseguenza, nella maggior parte dei casi, anche il rapporto lunghezza/larghezza è risultato inferiore rispetto ai parametri di riferimento, specialmente nel caso di PVFi-Np8 e PVFi-Np10. La maggiore corrispondenza con le misure di riferimento è stata invece evidenziata dai ceppi PVFi-Np3 e PVFi-Np27, che hanno prodotto conidi con misure medie quasi in linea con quelle di riferimento. Comunque, allorquando si considerano i valori minimi e massimi dei parametri di riferimento, le misure dei ceppi PVFi-Np concordano, a parte il caso specifico di PVFi-Np8 e PVFi-Np10, con quelle osservate da Phillips (2002).

Le caratteristiche morfologiche dei ceppi PVFi-Np sono state confrontate anche con quelle tipiche di *N. ribis* (dati non riportati), i cui conidi sono caratterizzati da una lunghezza relativamente maggiore e da forma più fusoidale, rispetto a quelli di *N. parvum*, evidenziando quindi la maggiore somiglianza dei ceppi PVFi-Np con le caratteristiche di *N. parvum*.

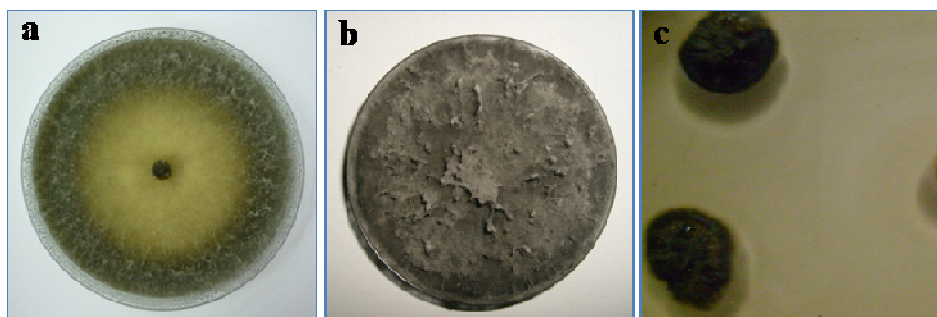
**Tabella 1.** Confronto delle misure dei conidi dei ceppi PVFi-Np (*N. parvum*) con quelle tipiche della specie *N. parvum* (Phillips, 2002), riferite alla produzione dei propaguli *in vitro*. I valori minimo e massimo sono inclusi in parentesi. I valori medi sono riportati insieme alla deviazione standard (SD).

Specie, gruppo filogenetico, ceppo	Dimensioni dei conidi (lunghezza × larghezza) (µm)		Rapporto lunghezza/larghezza (µm)	
	Parametri	Media ± SD	Parametro	Media ± SD
Misure tipiche per <i>N. parvum</i>	(12–) 15–20 (–24) × (4–) 4.5–6 (–7.5)	17.2 ± 1.6 × 5.6 ± 0.6	(1.8–) 2.5–4 (–5)	3.2 ± 0.4
<i>N. parvum</i> – gruppo 1				
PVFi-Np-8	(10.4–) 12.0–12.5 (–14.3) × (4.7–) 5.6–5.9 (–7.2)	12.2 ± 0.9 × 5.8 ± 0.6	(1.6–) 2.1–2.2 (–3.0)	2.1 ± 0.3
PVFi-Np10	(8.8–) 11.0–11.6 (12.9) × (4.5–) 5.2–5.5 (6.2)	11.3 ± 0.9 × 5.4 ± 0.4	(1.6–) 2.0–2.2 (–2.6)	2.1 ± 0.2
PVFi-Np27	(13–) 16–17.5 (–21) × (4.5–) 5.1–5.5 (7.0)	16.9 ± 1.8 × 5.4 ± 0.5	(2.2–) 3.0–3.4 (–4.0)	3.2 ± 0.5
<i>N. parvum</i> – gruppo 2				
PVFi-Np3	(14.5–) 15.9–17 (–18.9) × (4.5 –) 4.8–5 (–5.5)	16.5 ± 1.3 × 4.9 ± 0.3	(2.8–) 3.2–3.5 (–4.0)	3.4 ± 0.3
PVFi-Np11	(12.3–) 14.4–15(–17.8) × (4.1–) 5–5.3 (–5.8)	14.8 ± 1.3 × 5.2 ± 0.4	(2.3–) 2.8–3.0 (–3.5)	2.9 ± 0.3
<i>N. parvum</i> – gruppo 3				
PVFi.Np9	(13.9–) 15–15.5 (–17.4) × (5.3–) 5.8–6 (–6.4)	15.3 ± 0.8 × 5.9 ± 0.3	(2.4–) 2.5–2.6 (–3.3)	2.6 ± 0.2
PVFi.Np14	(13.9–) 15.1–15.6 (–16.9) × (5.3–) 5.6–5.8 (–6.3)	15.4 ± 0.7 × 5.7 ± 0.3	(2.4–) 2.6–2.8 (–3.0)	2.7 ± 0.1
PVFi.Np20	(13–) 14.5–15 (–16.4) × (5.4–) 6.9–7.1 (–7.1)	14.7 ± 0.8 × 7.0 ± 0.5	(1.8–) 2.0–2.2 (–2.8)	2.1 ± 0.2
PVFi.Np31	(12.1–) 14.6–15.3 (–17.5) × (4.5–) 5.3–5.5 (–6.0)	15.0 ± 1.3 × 5.4 ± 0.3	(2.0–) 2.7–2.9 (–3.5)	2.8 ± 0.3

#### 2.4.3. Distribuzione dei ceppi di Botryosphaeriaceae e di Pch nelle piante adulte e nel materiale di propagazione

Gli isolamenti dal legno alterato delle 5 viti adulte ha indicato la presenza dei morfotipi di Botryosphaeriaceae e di Pch rispettivamente in tutte e in 4 delle piante analizzate. Su un totale di 54 campioni (alterazioni), isolati di Botryosphaeriaceae e di Pch sono stati ottenuti rispettivamente in 28 e in 10 casi; invece, entrambi i morfotipi (Fig. 12) sono stati isolati dalla stessa alterazione in 3 casi (Tab. 2-6). L'analisi ha permesso di constatare la contemporanea presenza di *B. dothidea*, *D. seriata* e *N. parvum*, o di più di un ceppo di *D. seriata* o di *N. parvum*, anche nella stessa pianta, ma mai in corrispondenza della stessa alterazione. Tuttavia, a parte il caso della pianta n. 5 (Tab. 6), la distribuzione tra le piante delle 2 specie più rappresentate, *D. seriata* e *N. parvum*, non è apparsa omogenea. Infatti, *D. seriata* è stata isolata soprattutto dalle piante n. 3 e n. 4 (Tab. 4 e 5) mentre la maggior parte degli isolati di *N. parvum* sono stati ottenuti dalle piante n. 1 e n. 2 (Tab. 2 e 3 ).

**Figura 12.** Colonia del ceppo PVFi-Np11 (*N. parvum*) cresciuta su PDA al 2%, dopo 7 (a) e 20gg (b) di incubazione a 25°C e in assenza di luce; c), colonie di Pch emergenti su PDA al 2% da frammenti di legno dopo 10gg di incubazione a 25°C e in assenza di luce.



La presenza di funghi diversi dalle Botryosphaeriaceae e da Pch è stata osservata in un totale di 17 campioni. In particolare, questi funghi sono stati isolati in maniera esclusiva in 7 casi, mentre, la presenza in concomitanza con Botryosphaeriaceae, Pch o entrambi, è stata riscontrata rispettivamente in 5, 3 e 2 campioni. Il riconoscimento dei morfotipi, o l'analisi di sequenza della regione ITS, hanno evidenziato in un caso la presenza di componenti dei generi *Aureobasidium*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium* e

*Gliocladium*, nell'altro di *Bionectria* sp., mentre in nessun campione è stata verificata la presenza di specie di *Phaeoacremonium* (questo genere include specie, frequentemente associate a Pch, coinvolte nella malattia di Pierce e nella "Grapevine leaf stripe disease").

Nel caso delle barbatelle (materiale di propagazione), l'analisi è stata caratterizzata da un elevato tasso di infertilità degli isolamenti. Tale tasso ha infatti raggiunto valori intorno al 90% nel caso dei lotti n. 2 e n. 4 (Tab. 8 e 10) o del 100% nel caso del lotto n. 3 (Tab. 9). Vista la presenza, nei campioni di tutti i lotti, sia di legno alterato che apparentemente sano, la bassa frequenza di isolamento non è sembrata, di conseguenza, correlata alle caratteristiche del campione. Tre isolati di Botryosphaeriaceae, relativi a *N. parvum*, sono stati ottenuti solo da 2 barbatelle del lotto n. 1 (Tab. 7), mentre Pch non è stata isolata da nessun campione.

**Tabella 2.** Risultati degli isolamenti effettuati dal legno alterato di una pianta adulta di Sauvignon blanc (**Pianta n.1**), che nella precedente stagione vegetativa aveva mostrato i sintomi fogliari della “Grapevine leaf streap disease”. I campioni sono rappresentati da porzioni di sperone, cordone o tronco, dai quali sono stati prelevati 7 frammenti legnosi per la prova di isolamento fungino. I numeri in parentesi accanto al nome della specie rappresentano il gruppo filogenetico di appartenenza individuato nell’ambito della specie in seguito all’analisi filogenetica.

Posizione campione	Campione	Frammenti fertili/7			Isolati Botryosphaeriaceae	Altri funghi
		Totali	Pch	Botryosphaeriaceae		
Sperone	1	1				<i>Phomopsis</i> sp.
	2	7	2	5	<i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np6 <i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np7 <i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np8	
Cordone	1	4		4	<i>Neofusicoccum parvum</i> (2) – PVFi-Np2	2 non identificati
	2	7		5	<i>Neofusicoccum parvum</i> (2) – PVFi-Np3 <i>Neofusicoccum parvum</i> (2) – PVFi-Np4	
	3	5	2	2	<i>Neofusicoccum parvum</i> (2) – PVFi-Np5	<i>Gliocladium</i> sp.
	4	0				
Tronco	1	2	2			3 non identificati
	2	3				
	3	1		1	<i>Neofusicoccum parvum</i> (3) – PVFi-Np9	1 non identificato
	4	2		1	<i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np10	

**Tabella 3.** Risultati degli isolamenti effettuati dal legno alterato di una pianta adulta di Sauvignon blanc (**Pianta n.2**), che nella precedente stagione vegetativa aveva mostrato sintomi fogliari della “Grapevine leaf streap disease”. I campioni sono rappresentati da porzioni di sperone, cordone o tronco, dai quali sono stati prelevati 7 frammenti legnosi per la prova di isolamento fungino. I numeri in parentesi accanto al nome della specie rappresentano il gruppo filogenetico di appartenenza individuato nell’ambito della specie in seguito all’analisi filogenetica.

Posizione campione	Campione	Frammenti fertili/7			Isolati Botryosphaeriaceae	Altri funghi
		Totali	Pch	Botryosphaeriaceae		
Sperone	1	4		4	<i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np27	<i>Fusarium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.
	2	2				
	3	2	2			
Cordone	1	3		3	<i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np28	<i>Bionectria</i> sp.
	2	5		4	<i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np25	
					<i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np26	
	3	7		7	<i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np22	
					<i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np23 <i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np24	
Tronco	1	7		7	<i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np19 <i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np20 <i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFi-Np21	2 non identificati
	2	5		3	<i>Botryosphaeria dothidea</i> – PVFi-Bd3	
	3	2		2	<i>Neofusicoccum parvum</i> (3) – PVFi-Np18	
	4	7		7	<i>Neofusicoccum parvum</i> (3) – PVFi-Np14	
					<i>Neofusicoccum parvum</i> (3) – PVFi-Np15	
					<i>Neofusicoccum parvum</i> (3) – PVFi-Np16 <i>Neofusicoccum parvum</i> (3) – PVFi-Np17	



**Tabella 4.** Risultati degli isolamenti effettuati dal legno alterato di una pianta adulta di Sauvignon blanc (**Pianta n.3**), che nella precedente stagione vegetativa aveva mostrato sintomi fogliari della “Grapevine leaf streap disease”. I campioni sono rappresentati da porzioni di sperone, cordone o tronco, dai quali sono stati prelevati 7 frammenti legnosi per la prova di isolamento fungino. I numeri in parentesi accanto al nome della specie rappresentano il gruppo filogenetico di appartenenza individuato nell’ambito della specie in seguito all’analisi filogenetica.

Posizione campione	Campione	Frammenti fertili/7			Isolati Botryosphaeriaceae	Altri funghi
		Totali	Pch	Botryosphaeriaceae		
Sperone	1	2				2 non identificati
	2	0				
	3	1				
Cordone	1	1		1	<i>Diplodia seriata</i> (2)– PVFi-Ds9	
	2	0				
	3	3		3	<i>Diplodia seriata</i> (2)– PVDs10	
Tronco	1	1		1	<i>Diplodia seriata</i> (2)– PVFi-Ds11	
	2	0				
	3	1				<i>Cylindrocarpon</i> sp.
	4	0				

**Tabella 5.** Risultati degli isolamenti effettuati dal legno alterato di una pianta adulta di Sauvignon blanc (**Pianta n.4**), che nella precedente stagione vegetativa aveva mostrato sintomi fogliari della “Grapevine leaf streap disease”. I campioni sono rappresentati da porzioni di sperone, cordone o tronco, dai quali sono stati prelevati 7 frammenti legnosi per la prova di isolamento fungino. I numeri in parentesi accanto al nome della specie rappresentano il gruppo filogenetico di appartenenza individuato nell’ambito della specie in seguito all’analisi filogenetica.

Posizione campione	Campione	Frammenti fertili/7			Isolati Botryosphaeriaceae	Altri funghi
		Totali	Pch	Botryosphaeriaceae		
Sperone	1	0				
	2	2		2	<i>Neofusicoccum parvum</i> (1) – PVFI-Np29	
	3	5	1	3	<i>Diplodia seriata</i> (1)– PVFi-Ds2	<i>Aureobasidion</i> sp.
	4	0				
Cordone	1	3	2			1 non identificato
	2	5		3	<i>Diplodia seriata</i> (1)– PVFi-Ds3	2 non identificati
	3	1			<i>Diplodia seriata</i> (1)– PVFi-Ds4	
	4	1	1			
	5	3	2			1 non identificati
Tronco	1	2	2			
	2	2		2	<i>Diplodia seriata</i> (1)– PVFi-Ds5	
	3	1		1	<i>Diplodia seriata</i> (1)– PVFi-Ds6	

**Tabella 6.** Risultati degli isolamenti effettuati dal legno alterato di una pianta adulta di Sauvignon blanc (**Pianta n.5**), che nella precedente stagione vegetativa aveva mostrato sintomi fogliari della “Grapevine leaf streak disease”. I campioni sono rappresentati da porzioni di sperone, cordone o tronco, dai quali sono stati prelevati 7 frammenti legnosi per la prova di isolamento fungino. I numeri in parentesi accanto al nome della specie rappresentano il gruppo filogenetico di appartenenza individuato nell’ambito della specie in seguito all’analisi filogenetica.

Posizione campione	Campione	Frammenti fertili/7			Isolati Botryosphaeriaceae	Altri funghi
		Totali	Pch	Botryosphaeriaceae		
Sperone	1	0				
	2	2				
	3	2		2	<i>Neofusicoccum parvum</i> (3) – PVFi-Np30	2 non identificati
	4	4	2			2 non identificati
Cordone	1	0				
	2	4		3	<i>Diplodia seriata</i> (2)– PVFi-Ds7	1 non identificato
	3	0				
	4	0				
Tronco	1	3		3	<i>Neofusicoccum parvum</i> (3) – PVFi-Np31	
	2	0				
	3	2		2	<i>Botryosphaeria dothidea</i> – PVFi-Bd4	
	4	1		1	<i>Botryosphaeria dothidea</i> – PVFi-Bd5	

**Tabella 7.** Risultati degli isolamenti effettuati dal legno con o senza alterazioni di 5 barbatelle prelevate a caso da un lotto (**Lotto n.1**) prodotto da un vivaio della provincia di Firenze (**Vivaio A**). I campioni sono rappresentati da porzioni del portainnesto, dai quali sono stati prelevati 7 frammenti legnosi per la prova di isolamento fungino. I numeri in parentesi accanto al nome della specie rappresentano il gruppo filogenetico di appartenenza individuato nell'ambito della specie in seguito all'analisi filogenetica.

Barbatelle	Campione	Alterazioni	Frammenti fertili/7			Isolati Botryosphaeriaceae	Altri funghi
			Totali	Pch	Botryosphaeriaceae		
1	1	Assenti	1				1 non identificato
	2	Assenti	0				
2	1	Presenti	2		2	<i>N. parvum</i> (2) – PVFi-Np11	
	2	Presenti	0				
	3	Presenti	1				<i>Bionectria</i> sp.
3	1	Presenti	0				
	2	Presenti	3		2	<i>N. parvum</i> (3) – PVFi-Np12	1 non identificato
	3	Presenti	2		2	<i>N. parvum</i> (3) – PVFi-NP13	
4	1	Presenti	0				
	2	Assenti	2				2 non identificati
5	1	Assenti	0				
	2	Presenti					

**Tabella 8.** Risultati degli isolamenti effettuati dal legno con o senza alterazioni di 5 barbatelle prelevate a caso da un lotto (**Lotto n.2**) prodotto da un vivaio della provincia di Firenze (**Vivaio A**). I campioni sono rappresentati da porzioni del portainnesto, dai quali sono stati prelevati 7 frammenti legnosi per la prova di isolamento fungino. I numeri in parentesi accanto al nome della specie rappresentano il gruppo filogenetico di appartenenza individuato nell'ambito della specie in seguito all'analisi filogenetica.

Barbatelle	Campione	Alterazioni	Frammenti fertili/7			Isolati Botryosphaeriaceae	Altri funghi
			Totali	Pch	Botryosphaeriaceae		
1	1	Presenti	0				
	2	Presenti	1				1 non identificato
	3	Presenti	0				
2	1	Assenti	0				
	2	Presenti	1				<i>Aspergillus</i> sp.
3	1	Assenti	0				
	2	Assenti	0				
4	1	Assenti	0				
	2	Assenti	0				
5	1	Assenti	0				
	2	Presenti	2				2 non identificati

**Tabella 9.** Risultati degli isolamenti effettuati dal legno con o senza alterazioni di 5 barbatelle prelevate a caso da un lotto (**Lotto n.3**) prodotto da un vivaio della provincia di Firenze (**Vivaio A**). I campioni sono rappresentati da porzioni del portainnesto, dai quali sono stati prelevati 7 frammenti legnosi per la prova di isolamento fungino. I numeri in parentesi accanto al nome della specie rappresentano il gruppo filogenetico di appartenenza individuato nell'ambito della specie in seguito all'analisi filogenetica.

Barbatelle	Campione	Alterazioni	Frammenti fertili/7			Isolati Botryosphaeriaceae	Altri funghi
			Totali	Pch	Botryosphaeriaceae		
1	1	Assenti	0				
	2	Assenti	0				
2	1	Assenti	0				
	2	Assenti	0				
3	1	Presenti	0				
	2	Assenti	0				
4	1	Assenti	0				
	2	Presenti	0				
5	1	Presenti	0				
	2	Presenti	0				

**Tabella 10.** Risultati degli isolamenti effettuati dal legno con o senza alterazioni di 5 barbatelle prelevate a caso da un lotto (**Lotto n.4**) prodotto da un vivaio francese (**Vivaio B**). I campioni sono rappresentati da porzioni del portainnesto, dai quali sono stati prelevati 7 frammenti legnosi per la prova di isolamento fungino. I numeri in parentesi accanto al nome della specie rappresentano il gruppo filogenetico di appartenenza individuato nell'ambito della specie in seguito all'analisi filogenetica.

Barbatelle	Campione	Alterazioni	Frammenti fertili/7			Isolati Botryosphaeriaceae	Altri funghi
			Totali	Pch	Botryosphaeriaceae		
1	1	Presenti	0				
	2	Presenti	0				
	3	Presenti	1				1 non identificato
2	1	Assenti	0				
	2	Assenti	0				
3	1	Assenti	0				
	2	Presenti	1				1 non identificato
4	1	Presenti	0				
	2	Presenti	0				
	3	Presenti	0				
5	1	Assenti	2				2 non identificati
	2	Assenti	0				

## 2.5. Discussione e Conclusioni

Scopo del presente studio è stato quello di caratterizzare un gruppo di isolati di Botryosphaeriaceae ottenuti dal legno di piante adulte e da materiale di propagazione di vite. La caratterizzazione specifica di 43 isolati, 40 ottenuti da piante adulte e 3 da materiale di propagazione, è stata basata sull'analisi filogenetica condotta utilizzando le sequenze delle regioni ITS, EF 1- $\alpha$  e BT. L'analisi basata sulle caratteristiche delle sequenze ITS ha permesso di identificare 3 ceppi di *B. dothidea*, 10 di *D. seriata* e 30 di *N. parvum*. Sia l'analisi Bayesiana che il criterio della Massima Parsimonia hanno evidenziato il raggruppamento in un unico clado dei 3 ceppi di *B. dothidea* e in 2 cladi nel caso dei ceppi di *D. seriata* e di *N. parvum*. Tuttavia, mentre i 2 gruppi di *D. seriata* sono risultati essere costituiti anche da ceppi di riferimento, confermando l'esistenza di varianti già note delle sequenze ITS di questa specie (Phillips *et al.*, 2007), nel caso di *N. parvum*, uno dei 2 gruppi non è stato supportato da nessuna sequenza nota. Le sequenze di tale gruppo, presentando, comunque, la massima identità con quelle della specie *N. parvum*, sono state definite "atipiche", mentre, le restanti, avendo formato un gruppo contenente, oltre ad altre sequenze di riferimento, anche quella del ceppo tipo (*N. parvum* CBS 110301), sono state definite "tipiche". Con lo scopo di valutare meglio il grado di variabilità tra i 2 tipi di ceppi di *N. parvum* e considerando anche l'ipotesi che le sequenze "atipiche" fossero relative ad una specie criptica del "*N. parvum/N. ribis* complex", l'analisi filogenetica relativa ai 30 ceppi di *N. parvum* ottenuti in questo studio (PVFi-Np), è stata condotta utilizzando anche le sequenze BT ed EF 1- $\alpha$ . Le sequenze BT, benché abbiano confermato la distinzione tra i ceppi di *N. parvum* e di *N. ribis*, non sono risultate utili al fine di evidenziare differenze tra i ceppi PVFi-Np, mentre, l'ulteriore analisi condotta sulla base delle caratteristiche delle sequenze EF 1- $\alpha$ , ha riproposto la loro separazione in 2 cladi. Di questi, quello privo del ceppo tipo è risultato essere composto dagli stessi ceppi con sequenze ITS "atipiche", ma anche da alcuni aventi sequenze ITS tipiche, compresi 3 ceppi di riferimento. Questo risultato, benché importante per evidenziare un'ulteriore differenza tra i ceppi PVFi-Np, ha però dimostrato che sequenze EF1- $\alpha$  diverse da quella del ceppo tipo fossero già note. Comunque, la presenza di sequenze ITS tipiche ed EF 1- $\alpha$  atipiche ha fatto ipotizzare che i ceppi PVFi-Np fossero suddivisibili in 3 gruppi e tale ipotesi è stata confermata in seguito all'analisi filogenetica condotta considerando contemporaneamente le sequenze ITS e EF1- $\alpha$ . Tuttavia, le differenze osservate tra i 3 gruppi, non sono state ritenute



sufficienti per confermare l'ipotesi della presenza di nuove specie nell'ambito del "*N. parvum*/*N. ribis* complex" ma, piuttosto, hanno evidenziato che essi sono rappresentati da ceppi di *N. parvum* che si stanno evolvendo separatamente, confermando l'esistenza di una certa variabilità, anche intraspecifica, osservata tra i componenti del "*N. parvum*/*N. ribis* complex" (Pavlic *et al.*, 2009a).

I risultati dell'analisi morfologica, condotta per alcuni ceppi di *N. parvum* (PVFi-Np), sebbene abbiano evidenziato una generale minore lunghezza dei conidi rispetto a quella tipica (Phillips, 2002), hanno comunque confermato che tutti presentano le caratteristiche morfologiche tipiche di questa specie. Inoltre, le differenze morfometriche osservate tra i ceppi PVFi-Np, non correlate con l'appartenenza ad un particolare gruppo filogenetico, rappresentano una caratteristica già osservata per *N. parvum*, così come per gli altri componenti del "*N. parvum*/*N. ribis* complex" (Pavlic *et al.*, 2009a)

Le ferite da potatura vengono ritenute la principale via di infezione per le Botryosphaeriaceae in vigneto. Tali ferite sono infatti strettamente associate ad alterazioni del legno che spesso si sviluppano a partire dalle superfici delle ferite (Phillips, 2002; van Niekerk *et al.*, 2006). Da ognuna delle 5 viti adulte analizzate è stato possibile isolare almeno uno dei 40 ceppi di Botryosphaeriaceae (3 di *B. dothidea*, 10 di *D. seriata* e 27 di *N. parvum*) ottenuti da tale materiale. Questi sono stati isolati da 28 delle 54 alterazioni analizzate, in maniera indipendente dal punto di prelievo (tronco, cordone o sperone), che nella maggior parte dei casi è stato individuato in vicinanza di una ferita da potatura. Oltre che per verificare la presenza di Botryosphaeriaceae in corrispondenza di alterazioni apparentemente collegate alle ferite da potatura, un altro obiettivo legato a questa modalità di prelievo del materiale legnoso è stato quello di osservare la distribuzione di diverse specie di Botryosphaeriaceae, o diversi ceppi della stessa specie, in relazione ai punti corrispondenti a ferite procurate in diversi periodi dell'anno. I risultati ottenuti non hanno evidenziato alcuna particolare relazione tra un particolare punto di prelievo e una data specie o ceppo, sebbene in nessun caso sia stata osservata la presenza di più di una specie, o di un ceppo, in corrispondenza della stessa alterazione. Inoltre, ad eccezione di una pianta, in cui sono state ritrovate tutte e tre le specie identificate in questo studio, la distribuzione di quelle maggiormente rappresentate, *D. seriata* e *N. parvum*, non è risultata omogenea tra le piante, ma bensì correlata al singolo corpo vegetale. Pch è stata ritrovata in 10 dei 54 campioni analizzati e, in 3 casi, il suo isolamento ha coinciso con quello di Botryosphaeriaceae. Anche la

presenza di questo fungo, osservata in 4 delle 5 piante esaminate, non è sembrata essere correlata al particolare tipo di campione.

L'analisi effettuata sul materiale di propagazione è stata caratterizzata da un basso livello di fertilità degli isolamenti, che nel caso di un lotto è stato dello 0%. Questa situazione, che è risultata indipendente dalla presenza o assenza di alterazioni, è forse dipesa, in tutto o in parte, dal fatto che la maggior parte del materiale esaminato, costituito da barbatelle pronte alla vendita, provenisse direttamente dalla frigoconservazione, pratica normalmente attuata dopo l'allestimento delle barbatelle. Solo nel caso di un lotto il tasso di fertilità degli isolamenti ha raggiunto il 50%, e proprio da tale materiale sono stati ottenuti gli unici 3 ceppi di Botryosphaeriaceae, rappresentati da *N. parvum*, mentre in nessun caso è stata isolata Pch. Il ritrovamento di *N. parvum* nel materiale di propagazione ha rappresentato la conferma del fatto che le specie di Botryosphaeriaceae, allo stesso modo di altri funghi coinvolti nelle malattie del legno della vite, possono essere presenti nelle giovani piante già prima del loro impianto in vigneto (Fourie & Halleen, 2004). Ciò indica che le infezioni possono avvenire anche durante le fasi di lavorazione in vivaio, o provenire direttamente dalle piante madri (Fourie & Halleen, 2003, 2004; Aroca *et al.*, 2006, 2009).

Le Botryosphaeriaceae identificate in questo studio (*B. dothidea*, *D. seriata* e *N. parvum*) sono state rinvenute in diverse aree viticole mondiali (van Niekerk *et al.*, 2006), così come in Italia (Cristinzio, 1978; Rovesti & Montermini, 1987; Carlucci *et al.*, 2009). Il ritrovamento di *B. dothidea* nel legno di vite, in associazione con striature brune e necrosi settoriale, è stato documentato in Spagna (Úrbez-Torres & Gubler, 2006; Martin & Cobos, 2007) e in California (Úrbez-Torres *et al.*, 2006). In Portogallo è stata isolata da barbatelle con mancato attecchimento dell'innesto (Phillips, 2002) e in Italia è stata ritrovata in associazione con imbrunimenti del legno in alcuni vigneti pugliesi (Carlucci *et al.*, 2009). *D. seriata*, la prima specie di Botryosphaeriaceae rinvenuta su vite in Italia (Cristinzio, 1978; Rovesti & Montermini, 1987), è stata ritrovata in associazione con la necrosi settoriale del legno (Castillo-Pando *et al.*, 2001; Phillips, 2002; Úrbez-Torres *et al.*, 2006) ma anche con legno apparentemente sano di barbatelle (van Niekerk *et al.*, 2004). Questa specie si è rivelata quella maggiormente isolata durante lo studio condotto in Sudafrica da van Niekerk *et al.* (2004) e, in associazione con i sintomi sopra citati, è stata ritrovata anche in Australia (Castillo-Pando *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2005; Savocchia *et al.*, 2007), California (Úrbez-Torres *et al.*, 2006),

Messico (Úrbez-Torres *et al.*, 2008) e Spagna (Martin & Cobos 2007). Ultimamente, la sua presenza è stata documentata anche nei vigneti pugliesi (Carlucci *et al.*, 2009). *N. parvum*, così come altre specie di Botryosphaeriaceae isolate dal legno di vite, risulta essere associata soprattutto alle striature brune e alla necrosi settoriale del legno, e in tali circostanze la sua presenza è stata documentata in Portogallo (Phillips, 2002; Rego *et al.*, 2009), in Sudafrica (van Niekerk *et al.*, 2004), in Spagna (Úrbez-Torres & Gubler, 2006) e in California (Úrbez-Torres *et al.*, 2006). In Spagna, il suo ritrovamento è stato documentato anche su piante deperienti di meno di cinque anni (Martin & Cobos, 2007), mentre in Italia, *N. parvum* è stata isolata in corrispondenza di varie alterazioni del legno, in alcuni vigneti pugliesi (Carlucci *et al.*, 2009). È importante sottolineare che *N. parvum* è ritenuta una delle Botryosphaeriaceae più virulente su vite (Phillips, 2002; van Niekerk *et al.*, 2004; Rego *et al.*, 2009; Laveau *et al.*, 2009; Úrbez-Torres & Gubler, 2009). Il rinvenimento di questa specie in 4 delle 5 piante adulte esaminate, ma anche nel materiale di propagazione prodotto in provincia di Firenze, indica che *N. parvum*, così come altre Botryosphaeriaceae, potrebbe essere coinvolta nello sviluppo di alterazioni del legno e nel deperimento delle piante di vite anche in Toscana.

Parte della ricerca relativa al presente capitolo è stata svolta presso il “Centro de Recursos Microbiológicos (CREM), Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa”, Caparica, Portogallo, sotto la supervisione del Prof. Alan J. L. Phillips.

## **CAPITOLO 3**

**Caratterizzazione del potenziale patogenetico di ceppi di  
Botryosphaeriaceae ottenuti da piante adulte  
e da materiale di propagazione di vite**

### **3.1. Riassunto**

Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare la patogenicità su vite da parte di 11 ceppi Botryosphaeriaceae ( 2 ceppi di *Botryosphaeria dothidea*, 1 di *Diplodia seriata* e 8 di *Neofusicoccum parvum*) ottenuti da piante adulte e da materiale di propagazione di vite. Le prove sono state condotte sia su piante adulte che su barbatelle e i rilievi hanno riguardato la formazione di alterazioni del legno e la comparsa di sintomi fogliari eventualmente riconducibili alla “Grapevine leaf stripe disease” (ex esca), malattia tracheomicotica caratterizzata da alterazioni fogliari che fanno assumere alla lamina il tipico aspetto tigrato. Nei saggi sono stati inclusi anche 2 ceppi di *Phaeoconiella chlamydospora* e 2 di *Phaeoacremonium aleophilum*, ritenuti gli agenti causali della malattia. La verifica della formazione di alterazioni del legno, che ha riguardato esclusivamente le piante adulte, è stata effettuata dopo 12 mesi in tralci di piante di 30 anni allevate con la tecnica dell’ “archetto toscano”, mentre, lo sviluppo di sintomi fogliari associati alla presenza degli inoculi artificiali, è stato verificato durante una stagione vegetativa nel caso delle piante adulte e in 2 stagioni vegetative nel caso delle barbatelle.

L’incidenza dei sintomi fogliari della “Grapevine leaf stripe disease” nel vigneto in cui erano presenti le piante adulte inoculate è risultata del 5% e la loro presenza (con la stessa percentuale) sulle piante inoculate non è apparsa in nessun modo correlata ad un particolare inoculo artificiale. Nel caso delle barbatelle non è stato osservato alcun sintomo fogliare tipico della “Grapevine leaf stripe disease”, o ad essa riconducibile. Inoltre, la mancata ripresa vegetativa o il disseccamento di alcune barbatelle, verificatisi soprattutto nel secondo anno della prova, anche in questo caso non sono apparsi essere correlati con la presenza di un dato inoculo.

I rilievi relativi alla formazione di alterazioni del legno hanno evidenziato la capacità di tutti i ceppi utilizzati di provocare necrosi, ma l’elevata variabilità tra le repliche di ogni tipo di inoculo non ha permesso di quantificare in maniera inequivocabile le eventuali differenze di virulenza esistenti tra i ceppi. Tuttavia, è stato possibile notare che le alterazioni di maggiore entità sono state prodotte dai 2 ceppi di *P. chlamydospora* e da un ceppo di *N. parvum*.

### 3.2. Introduzione

I funghi appartenenti alla famiglia delle Botryosphaeriaceae hanno una distribuzione cosmopolita e sono in grado di colonizzare piante monocotiledoni, dicotiledoni e gimnosperme (Barr, 1987; Denman *et al.*, 2000). Nelle piante legnose, questi funghi vengono spesso ritrovati in stretta associazione con necrosi dello xilema e deperimento di tralci, branche o dell'intera pianta (von Arx, 1987).

Nel caso di *Vitis* sp., dalle parti legnose di questa pianta sono state isolate specie apparentemente associate a vari sintomi: deperimento dell'intera pianta o parti di essa (tralci, cordoni o tronchi), mortalità dei germogli, striature brune e necrosi del legno, ritardo della ripresa vegetativa e altri ancora (van Niekerk *et al.*, 2006). Attualmente risultano essere 17 le specie di Botryosphaeriaceae ritrovate nel legno di vite e diverse prove di patogenicità condotte in varie parti del mondo hanno evidenziato che molte di queste sono in grado di provocare alterazioni del legno (Phillips, 1998; Castillo-Pando *et al.*, 2001; Larignon *et al.*, 2001; van Niekerk *et al.*, 2004; Auger *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Savocchia *et al.*, 2007; Úrbez-Torres *et al.*, 2007, 2008; Burruano *et al.*, 2008; Úrbez-Torres & Gubler, 2009). Tuttavia, il confronto dei risultati delle prove di patogenicità evidenzia che in molti casi, isolati della stessa specie hanno mostrato differente aggressività in esperimenti diversi. Comunque, allo stato attuale delle conoscenze, tra le specie che si sono mostrate più virulente, *Neofusicoccum parvum* risulta quella maggiormente diffusa e per la quale i risultati dei saggi di patogenicità hanno sempre evidenziato un'elevata aggressività degli isolati utilizzati (van Niekerk *et al.*, 2004; Laveau *et al.*, 2009; Rego *et al.*, 2009; Úrbez-Torres & Gubler, 2009).

In certi casi è stato attribuito a specie di Botryosphaeriaceae che colonizzano il legno di vite anche lo sviluppo di sintomi fogliari (Cristinzio, 1978; Larignon & Dubos, 2001; Larignon *et al.*, 2001) che ricordano da vicino quelli di un' importante malattia della vite, la "Grapevine leaf stripe disease" (Surico, 2009). Tale situazione si riferisce soprattutto ad una forma di "black dead arm" (BDA) osservata in Francia da Larignon & Dubos (2001) e attribuita a *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* e *N. parvum*. Tuttavia, a causa dell'estrema somiglianza dei sintomi fogliari osservati da Larignon & Dubos con quelli tipici della "Grapevine leaf stripe disease", alcuni autori hanno evidenziato una difficoltà oggettiva nel distinguere i sintomi della "Grapevine leaf stripe disease" dagli eventuali sintomi fogliari della BDA che per altro non sono, a differenza di quelli a carico dei tessuti legnosi interni, mai stati riprodotti nei saggi di patogenicità eseguiti con le diverse specie di Botryosphaeriaceae isolate da legno di vite. Gli unici

casi in cui è stata osservata l'associazione tra inoculo artificiale di Botryosphaeriaceae e la comparsa di sintomi fogliari si riferiscono agli studi condotti da Cristinzio (1978) e Rego *et al.* (2009). Nel primo caso, in seguito all'inoculazione artificiale di isolati di *D. seriata* furono riprodotti gli arrossamenti delle lamine fogliari osservati sulle piante naturalmente infette, mentre nello studio di Rego e colleghi è stata osservata la presenza di sintomi fogliari su barbatelle inoculate con diverse specie di Botryosphaeriaceae. In quest'ultimo caso, comunque, non è stata riportata alcuna descrizione dettagliata dei sintomi osservati.

D'altra parte, scarsi risultati si sono avuti anche nella riproduzione dei sintomi fogliari della "Grapevine leaf stripe disease" in seguito all'inoculazione dei funghi che ne sono considerati la causa, *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*; ad oggi infatti è uno solo il caso in cui tali sintomi sono risultati associati all'inoculo artificiale dei 2 funghi (Sparapano *et al.*, 2000).

Comunque, le Botryosphaeriaceae vengono spesso isolate dal legno di piante che presentano i sintomi fogliari tipici della "Grapevine leaf stripe disease" e in concomitanza di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* (Aroca *et al.*, 2006; Martin & Cobos, 2007; Carlucci *et al.*, 2009).

Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare la patogenicità su vite da parte di 11 ceppi Botryosphaeriaceae ottenuti da piante adulte e da materiale di propagazione di vite. Le prove sono state condotte sia su piante adulte che su barbatelle e i rilievi hanno riguardato la formazione di alterazioni del legno e la comparsa di sintomi fogliari eventualmente riconducibili alla "Grapevine leaf stripe disease". Al fine di confrontare le alterazioni del legno provocate dai ceppi di Botryosphaeriaceae, e gli eventuali sintomi fogliari ad essi associati, con quelli provocati dagli agenti della "Grapevine leaf stripe disease", nei saggi sono stati inclusi anche 2 ceppi di *P. chlamydospora* e 2 di *P. aleophilum*.

### **3.3. Materiali e Metodi**

#### **3.3.1. Ceppi utilizzati**

I ceppi di Botryosphaeriaceae utilizzati in questo studio (Tabella 1) sono stati scelti sulla base dei risultati ottenuti con un'analisi filogenetica effettuata per un totale di 43 isolati di Botryosphaeriaceae ottenuti da legno di vite. Tali ceppi sono stati isolati da piante di

vite ubicate in un vigneto dell'azienda agraria dell'Università di Firenze (“Villa Montepaldi”, San Casciano in Val di Pesa, FI) e da barbatelle prodotte da un vivaio della provincia di Firenze (Capitolo 2). Nel caso di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* sono stati utilizzati ceppi ottenuti da viti affette da “Grapevine leaf stripe disease” e collezionati presso la sezione di Patologia vegetale dell'Università di Firenze.

**Tabella 1.** Ceppi di Botryosphaeriaceae, *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* utilizzati per i saggi di patogenicità su piante adulte e barbatelle. Accanto alle sigle dei ceppi di *D. seriata* e *N. parvum* è riportato il gruppo filogenetico di appartenenza individuato in seguito ad analisi filogenetica (capitolo 2).

Ceppo	Origine
<i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	
PVFi-Pch22	collezione sez. di Patologia vegetale Firenze
PVFi-Pch52	collezione sez. di Patologia vegetale Firenze
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	
PVFi-Pal78	collezione sez. di Patologia vegetale Firenze
PVFi-Pal80	collezione sez. di Patologia vegetale Firenze
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	
PVFi-Bd3	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
<i>Diplodia seriata</i>	
PVFi-Ds2 (gruppo 1)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
PVFi-Ds7 (gruppo 2)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
<i>Neofusicoccum parvum</i>	
PVFi-Np8 (gruppo 1)	
PVFi-Np9 (gruppo 3)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
PVFi-Np10 (gruppo 1)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
PVFi-Np11 (gruppo 2)	barbatella cv. Sangiovese F9A 548/ 110R 180
PVFi-Np12 (gruppo 3)	barbatella cv. Sangiovese F9A 548/ 110R 180
PVFi-Np18 (gruppo 3)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
PVFi-Np23 (gruppo 1)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
PVFi-Np29 (gruppo 2)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,

### 3.3.2. Inoculazioni su piante adulte e barbatelle

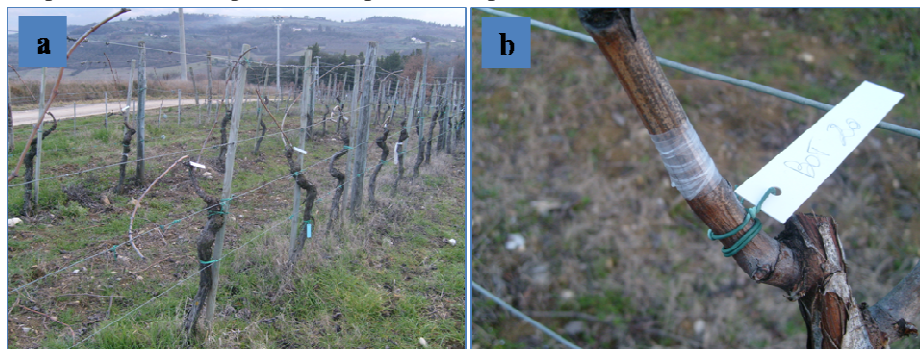
#### 3.3.2.1. Piante adulte

Oggetto di tale prova sono state 160 piante di 30 anni, cultivar Sangiovese, ubicate in un vigneto dell'azienda agraria dell'Università di Firenze (“Villa Montepaldi”, San Casciano in Val di Pesa, FI). In particolare, sono state utilizzate viti coltivate con la



tecnica dell' "archetto toscano", consistente nell'utilizzo due tralci di un anno come punto di partenza per la vegetazione successiva (Figura 1a). Questi tralci, che si dipartono direttamente dal tronco della pianta, al momento della potatura annuale vengono piegati ad archetto e fissati al filo di ferro che delinea il filare. L'allestimento della prova, avvenuto nel periodo 6 Febbraio 2008-15 Marzo 2008, è consistito nell'inoculo di micelio in ferite artificiali, provocate con l'ausilio di una lama sterile ed eseguite in modo che coinvolgessero il tessuto xilematico più esterno del primo internodo di uno dei 2 tralci. L'inoculazione è stata effettuata ponendo un tassello di PDA (brodo di patata-destrosio e agar) al 2% del diametro di 5 mm prelevato, con un punteruolo sterilizzato con fiamma, dal margine di colonie fungine in attiva crescita uniforme. Le ferite sono state poi chiuse mediante adagiamento del lembo di corteccia e successivo avvolgimento di parafilm (Figura 1b). Il micelio di ogni ceppo, così come il controllo (PDA sterile), è stato inoculato su 10 piante (repliche), separate in 2 gruppi di 5 unità attigue, distribuiti casualmente.

**Figura 1.** a) piante di 30 anni cultivar Sangiovese, allevate con la tecnica dell' "archetto toscano", utilizzate per i saggi di patogenicità; b) porzione di un tralcio, rappresentata dal primo internodo, protetta con parafilm dopo l'inoculazione.

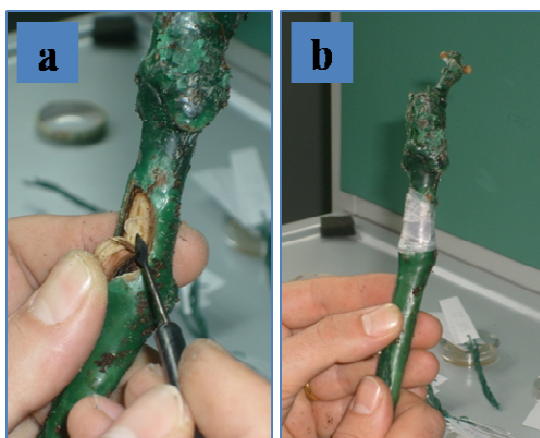


I rilievi hanno riguardato la comparsa di sintomi fogliari, eventualmente riconducibili a quelli della "Grapevine leaf stripe disease", e la formazione di alterazioni del legno. Al fine di verificare la presenza di sintomi fogliari associati ad un particolare inoculo artificiale, nel periodo Giugno-Settembre 2008 sono stati fatti sopralluoghi a cadenza bisettimanale per documentare eventuali situazioni degne di nota mentre, la verifica della formazione di alterazioni del legno è stata effettuata a distanza di 12 mesi dall'inizio della prova. Dopo il prelievo, i tralci inoculati sono stati condotti in laboratorio e sezionati longitudinalmente per verificare l'eventuale presenza di alterazioni del legno. I

relativi dati sono stati sottoposti ad analisi statistica delle medie, comparate mediante il test ANOVA (ANalysis Of VARIance) di Fisher per valori di  $P \leq 0.05$ . Inoltre, al fine di soddisfare il quarto postulato di Koch, per ogni tipo di inoculo, 2 tralci sono stati utilizzati per la prova di reisolamento del relativo inoculo artificiale. I tralci sottoposti a tale prova sono stati lavati con acqua corrente, disinfettati secondo le modalità descritte da Retief *et al.* (2006) e, dopo la rimozione della corteccia mediante l'utilizzo di una lama sterile, sono stati sezionati longitudinalmente per verificare l'eventuale presenza di alterazioni del legno. In seguito, dalle estremità distali delle alterazioni, 7 frammenti di legno sono stati prelevati asepticamente e posti in piastre Petri contenenti brodo di patata-destrosio e agar (PDA) al 2% (Difco laboratories Inc., Detroit, MI, USA), addizionato con solfato di streptomicina allo 0.015% (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, USA). Le piastre sono state incubate per circa 3 settimane, in assenza di luce, a 25°C. I risultati sono stati basati sul confronto dei morfotipi ottenuti con quelli dei ceppi inoculati.

### 3.3.2.2 *Barbatelle*

Per questa prova sono state utilizzate 220 barbatelle cultivar Sangiovese F9-A5-48/420 A-MI-Q-88, confezionate in un vivaio della provincia di Pisa. Gli inoculi, eseguiti con le stesse modalità descritte per le piante adulte (Figura 2), sono stati effettuati nel periodo 5 Marzo 2008-11 Aprile 2008.



**Figura 2.** Immagine raffigurante l'inoculazione mediante deposizione di un tassello di agar, contenete il micelio fungino, su una ferita procurata al di sotto del punto di innesto di una barbatella, (a); b), protezione del punto di inoculo mediante apposizione di parafilm.

Al fine di valutare l'effetto della quantità di inoculo o della contemporanea presenza di più tipi di inoculo, le barbatelle sono state usate anche per effettuare inoculazioni triplici di un singolo ceppo, o di 3 diversi ceppi, sul portinnesto della stessa unità di

propagazione (Tabella 2). Quando le inoculazioni triplici sono state effettuate utilizzando contemporaneamente ceppi di Botryosphaeriaceae, *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*, è stato tenuto conto anche della loro posizione relativa, per cui sono state considerate tutte le combinazioni in modo che ogni ceppo venisse inoculato nella posizione basale, centrale o apicale del portinnesto. Quando è stata procurata una sola ferita, il taglio è stato fatto 5 cm sotto il punto di innesto; nei casi in cui erano previste 3 inoculazioni sulla stessa piantina, le ferite aggiuntive sono state fatte a ~ 15 e 25 cm dal punto di innesto. Per ogni tipo di inoculo sono state allestite 5 repliche. Appena dopo l'inoculazione, le barbatelle sono state messe a dimora in vasi di plastica 30×20 cm, contenenti terriccio universale e agriperlite, e ubicate all'esterno, nei pressi del Dipartimento di Ortoflorofrutticoltura dell'Università di Firenze (Figura 3a). Inoltre, al fine di monitorare lo stato di salute delle barbatelle in assenza di ferite o di inoculo artificiale, 5 barbatelle, denominate TQ (tal quale), sono state messe a dimora e coltivate con le stesse condizioni di quelle inoculate. Le piantine sono state regolarmente irrigate nel periodo Giugno-Settembre mediante collegamento ad impianto di irrigazione automatica, consistita in 2 cicli giornalieri di 15 min (Figura 3b). Nello stesso periodo sono state effettuate due concimazioni utilizzando "Nitrophoska gold" (COMPO®) e condotti trattamenti anticrittogamici e antiparassitari preventivi e curativi con i prodotti QUADRIS (Syngenta®), CIMOXANIL (Bayer CropScience®), TIOVIT (Syngenta®), ed ENVIDOR (Bayer CropScience®), rispettando le indicazioni da etichetta.

I rilievi, che hanno riguardato la verifica della comparsa di sintomi fogliari attribuibili agli inoculi artificiali e lo stato generale di salute delle barbatelle, sono stati condotti, con cadenza bisettimanale, nel periodo Giugno-Settembre degli anni 2008 e 2009.

**Figura 3.** a), immagine raffigurante le 220 barbatelle dopo 40 gg dall'inoculazione; b), collegamento dell'impianto di irrigazione automatica.



**Tabella 2.** Descrizione delle inoculazioni effettuate sulle barbatelle. La sigla TQ (tal quale) è relativa a barbatelle messe a dimora senza aver procurato alcuna ferita, mentre il controllo è rappresentato da barbatelle inoculate con tasselli sterili di PDA al 2%. Le inoculazioni triplici relative ad un solo tipo di inoculo sono indicate con “x 3”, mentre, per quelle effettuate con 3 diversi tipi di inoculo sulla stessa barbatella, la sequenza delle sigle dei ceppi fungini indica, da sinistra a destra, la posizione basale, centrale o apicale del relativo punto di inoculo sul portinnesto della barbatella.

Tipo di inoculazione (tesi)	
Inoculazione singola	Inoculazione triplice
TQ	Controllo x 3
Controllo	PVFi-Pch52 x 3
PVFi-Pch22	PVFi-Pal80 x3
PVFi-Pch52	PVFi-Bd3 x 3
PVFi-Pal78	PVFi-Ds2 x 3
PVFi-Pal80	PVFi-Ds7 x 3
PVFi-Bd3	PVFi-Np8 x 3
PVFi-Ds2	PVFi-Np9 x 3
PVFi-Ds7	PVFi-Np11 x 3
PVFi-Np8	PVFi-Pch52 + PVFi-Bd3 + PVFi-Pal80
PVFi-Np9	PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80 + PVFi-Bd3
PVFi-Np10	PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52 + PVFi-Bd3
PVFi-Np11	PVFi-Pal80 + PVFi-Bd3 + PVFi-Pch52
PVFi-Np12	PVFi-Bd3 + PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80
PVFi-Np18	PVFi-Bd3 + PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52
PVFi-Np23	PVFi-Pch52 + PVFi-Ds7 + PVFi-Pal80
PVFi-Np29	PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80 + PVFi-Ds7
	PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52 + PVFi-Ds7
	PVFi-Pal80 + PVFi-Ds7 + PVFi-Pch52
	PVFi-Ds7 + PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80
	PVFi-Ds7 + PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52
	PVFi-Pch52 + PVFi-Np9 + PVFi-Pal80
	PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80 + PVFi-Np9
	PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52 + PVFi-Np9
	PVFi-Pal80 + PVFi-Np9 + PVFi-Pch52
	PVFi-Np9 + PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80
	PVFi-Np9 + PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52

### **3.4. Risultati**

#### **3.4.1. Piante adulte**

##### **3.4.1.1. Sintomi fogliari**

L'incidenza della "Grapevine leaf stripe disease" osservata nel vigneto considerato per i saggi di patogenicità su piante adulte è risultata pari al 5%. La presenza dei sintomi di questa malattia (Figura 4) sulle piante inoculate con i ceppi fungini di Botryosphaeriaceae, *P. chlamydospora*, *P. aleophilum*, così come in quelle inoculate con il controllo, non è apparsa correlata alla presenza di un particolare inoculo artificiale. Inoltre, quando questi sono stati osservati sulle piante inoculate non sono risultati associati al tralcio inoculato, essendo stati ritrovati anche su entrambi o sul solo tralcio non inoculato.



**Figura 4.** Tipica sintomatologia della "Grapevine leaf stripe disease" osservata su una foglia di un tralcio inoculato con il controllo.

##### **3.4.1.1. Alterazioni del legno**

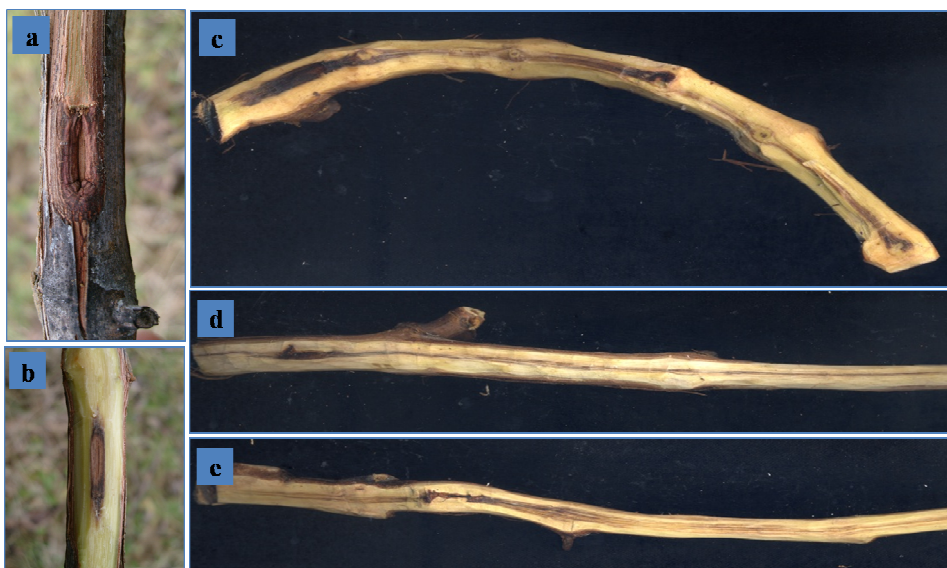
Tutte le alterazioni sviluppatesi a partire del punto di inoculo dei ceppi fungini sono risultate più estese di quelle osservate per il controllo, le quali, nella maggior parte dei casi, avevano un'entità corrispondente a quella della ferita procurata per l'inoculazione (Figura 5a e b; Tabella6). La tipologia delle alterazioni riscontrate non è apparsa specifica per un particolare fungo, infatti in tutti i casi, compreso il controllo, è stata osservata la necrotizzazione dello xilema. Alcune differenze sono state notate dal punto di vista della larghezza di tali alterazioni. Quelle osservate nella maggior parte dei tralci inoculati con i ceppi di Botryosphaeriaceae, sono apparse sotto forma di aree necrotiche non definite dai vasi xilematici (Figura 5c), invece, nei tralci inoculati con i ceppi di *P. chlamydospora*, le alterazioni erano costituite da necrosi interessanti un fascia definita, e

relativamente ristretta, di vasi xilematici (Figura 5d). Nei tralci inoculati con i ceppi di *P. aleophilum* sono state spesso osservate entrambe le situazioni, anche all'interno dello stesso tralcio (Figura 5e).

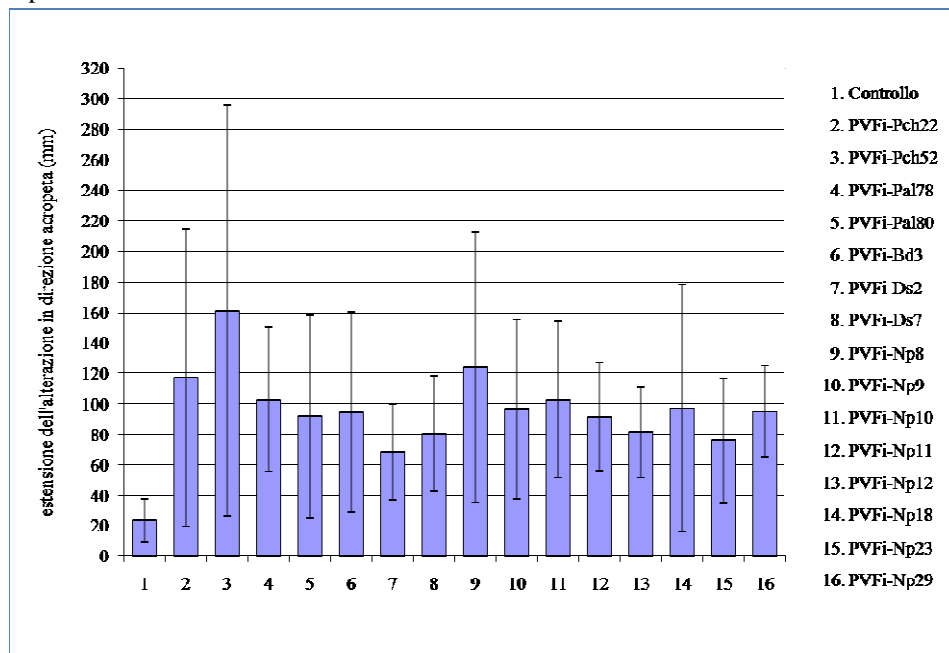
Sebbene le alterazioni osservate nei tralci inoculati con i ceppi fungini siano risultate più estese di quelle relative al controllo, l'elevata variabilità tra le repliche di ogni tipo di inoculo è risultata tale da non evidenziare nessuna differenza statisticamente significativa tra i ceppi. Comunque, le alterazioni più estese in assoluto sono state osservate nel caso del ceppo PVFi-Pch52 di *P. chlamydospora*, mentre, per quanto riguarda le Botryosphaeriaceae, i valori più elevati sono risultati quelli relativi al ceppo PVFi-Np8 di *N. parvum*.

La prova di reisolamento ha permesso di verificare la presenza di funghi con morfotipo correlato a quello del ceppo utilizzato per l'inoculazione in 11 casi, mentre per i 2 ceppi di *P. aleophilum*, 1 ceppo di *D. seriata* e di 1 di *N. parvum*, il relativo morfotipo non è stato reisolato (Tabella 3). Dai tralci inoculati con il controllo non è stato ottenuto nessun isolato fungino, mentre dai tralci inoculati con i ceppi fungini non sono stati isolati funghi con morfotipi differenti da quelli utilizzati per l'inoculo.

**Figura 5.** a), callo cicatriziale osservato in corrispondenza della ferita effettuata per l'inoculazione del controllo; b), striscia necrotica, corrispondente alla sola estensione della ferita, osservata su un tralcio inoculato con il controllo; c, d ed e; necrosi osservate all'interno di tralci inoculati con i ceppi PVFi-Np9 di *N. parvum* (c), PVFi-Pch52 di *P. chlamydospora* (d) e PVFi-Pal80 di *P. aleophilum* (e).



**Figura 6.** Estensione delle alterazioni, misurata in direzione acropeta, nei tralci inoculati con il controllo e con i 15 ceppi fungini. I valori rappresentano la media  $\pm$  SD di 10 repliche.



### 3.4.2. Barbatelle

I rilievi condotti nel periodo Giugno-Settembre degli anni 2008 e 2009 non hanno evidenziato alcuna presenza di alterazioni fogliari associate ad un particolare inoculo artificiale, così come non è stata osservata alcuna correlazione con un dato inoculo nel caso della mancata ripresa vegetativa o del disseccamento di alcune barbatelle. Quest'ultimo, osservato specialmente nell'estate 2009, sebbene sia stato verificato per 2 barbatelle inoculate con il ceppo PVNp8, uno dei quali verosimilmente dovuto al malfunzionamento dell'impianto di irrigazione, è stato osservato anche per una barbatella TQ e 2 barbatelle inoculate con il controllo.

**Tabella 3.** Risultati della prova di reisolamento effettuata per i saggi condotti sulle piante adulte. Per ogni tipo di inoculo sono stati analizzati 2 dei 10 tralci inoculati. I risultati sono stati basati sul riconoscimento dei morfotipi ottenuti.

Ceppo	Reisolamento morfotipo
Controllo	0
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (Pch)	
PVFi-Pch22	2
PVFi-Pch52	1
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	
PVFi-Pal78	0
PVFi-Pal80	0
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	
PVFi-Bd3	1
<i>Diplodia seriata</i>	
PVFi-Ds2 (gruppo 1)	0
PVFi-Ds7 (gruppo 2)	1
<i>Neofusicoccum parvum</i>	
PVFi-Np8 (gruppo 1)	2
PVFi-Np9 (gruppo 3)	2
PVFi-Np10 (gruppo 1)	2
PVFi-Np11 (gruppo 2)	1
PVFi-Np12 (gruppo 3)	0
PVFi-Np18 (gruppo 3)	1
PVFi-Np23 (gruppo 1)	2
PVFi-Np29 (gruppo 2)	2



**Tabella 4.** Risultati dei rilievi, effettuati nel periodo Giugno-Settembre 2008, riguardanti la comparsa di sintomi fogliari tipici della “Grapevine leaf stripe disease” (o ad essa riconducibili) e lo stato generale di salute delle barbatelle inoculate.

Tipo di inoculo (tesi)	
Inoculo singolo	Inoculo triplice
TQ	Controllo x 3
Controllo	PVFi-Pch52 x 3
PVFi-Pch22	PVFi-Pal80 3
PVFi-Pch52	PVFi-Bd3 x 3
PVFi-Pal78	PVFi-Ds2 x 3
PVFi-Pal80	PVFi-Ds7 x 3
PVFi-Bd3	PVFi-Np8 x 3
PVFi-Ds2	PVFi-Np9 x 3
PVFi-Ds7	PVFi-Np11 x 3
PVFi-Np8	PVFi-Pch52 + PVFi-Bd3 + PVFi-Pal80
PVFi-Np9	PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80 + PVFi-Bd3
PVFi-Np10	PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52 + PVFi-Bd3
PVFi-Np11	PVFi-Pal80 + PVFi-Bd3 + PVFi-Pch52
PVFi-Np12	PVFi-Bd3 + PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80
PVFi-Np18	PVFi-Bd3 + PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52
PVFi-Np23	PVFi-Pch52 + PVFi-Ds7 + PVFi-Pal80
PVFi-Np29	PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80 + PVFi-Ds7
	PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52 + PVFi-Ds7
	PVFi-Pal80 + PVFi-Ds7 + PVFi-Pch52
	PVFi-Ds7 + PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80
	PVFi-Ds7 + PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52
	PVFi-Pch52 + PVFi-Np9 + PVFi-Pal80
	PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80 + PVFi-Np9
	PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52 + PVFi-Np9
	PVFi-Pal80 + PVFi-Np9 + PVFi-Pch52
	PVFi-Np9 + PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80
	PVFi-Np9 + PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52

1a

\*1b

\* numero di piante (su un totale di 5) con mancata ripresa vegetativa (a) o disseccate (b)

**Tabella 4.** Risultati dei rilievi, effettuati nel periodo Giugno-Settembre 2009, riguardanti la comparsa di sintomi fogliari tipici della “Grapevine leaf stripe disease” (o ad essa riconducibili) e lo stato generale di salute delle barbatelle inoculate.

Tipo di inoculo (tesi)			
Inoculo singolo		Inoculo triplice	
TQ	*1b	Controllo x 3	
Controllo	2b	PVFi-Pch52	1b
PVFi-Pch22		PVFi-Pal80	1b
PVFi-Pch52		PVFi-Bd3 x 3	
PVFi-Pal78		PVFi-Ds2 x 3	
PVFi-Pal80		PVFi-Ds7 x 3	
PVFi-Bd3		PVFi-Np8 x 3	
PVFi-Ds2		PVFi-Np9 x 3	1b
PVFi-Ds7		PVFi-Np11 x 3	
PVFi-Np8	2b	PVFi-Pch52 + PVFi-Bd3 + PVFi-Pal80	
PVFi-Np9	1b	PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80 + PVFi-Bd3	
PVFi-Np10		PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52 + PVFi-Bd3	
PVFi-Np11		PVFi-Pal80 + PVFi-Bd3 + PVFi-Pch52	
PVFi-Np12		PVFi-Bd3 + PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80	
PVFi-Np18	1a	PVFi-Bd3 + PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52	
PVFi-Np23		PVFi-Pch52 + PVFi-Ds7 + PVFi-Pal80	
PVFi-Np29	1b	PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80 + PVFi-Ds7	
		PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52 + PVFi-Ds7	
		PVFi-Pal80 + PVFi-Ds7 + PVFi-Pch52	
		PVFi-Ds7 + PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80	
		PVFi-Ds7 + PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52	
		PVFi-Pch52 + PVFi-Np9 + PVFi-Pal80	
		PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80 + PVFi-Np9	
		PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52 + PVFi-Np9	2b
		PVFi-Pal80 + PVFi-Np9 + PVFi-Pch52	
		PVFi-Np9 + PVFi-Pch52 + PVFi-Pal80	
		PVFi-Np9 + PVFi-Pal80 + PVFi-Pch52	

\* numero di piante (su un totale di 5) con mancata ripresa vegetativa (a) o disseccate (b)

### **3.5. Discussione e Conclusioni**

Il presente lavoro ha riguardato la verifica della patogenicità su vite di 11 ceppi di Botryosphaeriaceae ottenuti da piante adulte e da materiale di propagazione di vite. Le prove sono state condotte sia su piante adulte che su barbatelle e i rilievi hanno riguardato la formazione di alterazioni del legno e la comparsa di sintomi fogliari eventualmente riconducibili alla “Grapevine leaf stripe disease”. Al fine di confrontare le alterazioni del legno provocate dai ceppi di Botryosphaeriaceae, e gli eventuali sintomi fogliari ad essi associati, con quelli provocati dagli agenti della “Grapevine leaf stripe disease”, nei saggi sono stati inclusi anche 2 ceppi di *P. chlamydospora* e 2 di *P. aleophilum*.

Riguardo alla malattia delle foglie tigrate (Grapevine leaf stripe disease) si pensa che all’origine dei suoi sintomi fogliari ci sia la produzione di fitotossine da parte dei due principali funghi che per ora ne sono considerati la causa, *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*. Tali fitotossine (scitalone, isosclerone e polisaccaridi complessi), trasportati dalla corrente linfatica, si accumulerebbero nelle foglie provocando i noti sintomi. Riguardo al possibile coinvolgimento delle Botryosphaeriaceae nello sviluppo dei sintomi fogliari della “Grapevine leaf stripe disease”, o ad essi riconducibili, alla base di tale ipotesi ci sono le numerose documentazioni del loro isolamento da piante con i sintomi fogliari di questa malattia, così come da piante che presentavano sintomi fogliari molto simili ma attribuiti ad una forma di BDA, osservata in Francia, e i cui agenti causali sono state ritenute *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* e *N. parvum* (Larignon & Dubos, 2001). Inoltre, polisaccaridi fitotossici sono stati isolati anche da filtrati colturali di *N. parvum* e *N. luteum* (Martos *et al.*, 2008) e un recente studio ha evidenziato la presenza di questo tipo di molecole nelle foglie di piante affette da “Grapevine leaf stripe disease” (Calamai *et al.*, 2009), mentre, a differenza da quanto osservato da Sparapano *et al.* (2007b), non è stata confermata la presenza dello scitalone e dell’isosclerone. Sulla base di tutto ciò, risulta quanto meno lecito ipotizzare il potenziale coinvolgimento delle Botryosphaeriaceae nei sintomi fogliari della “Grapevine leaf stripe disease”. Sfortunatamente, le prove condotte nel corso di questo studio non hanno apportato nuove informazioni a riguardo, infatti le piante adulte inoculate che hanno sviluppato i sintomi fogliari della malattia delle foglie tigrate nell’estate 2008 non hanno evidenziato alcuna correlazione con la presenza dell’inoculo artificiale di Botryosphaeriaceae, *P. chlamydospora* o *P. aleophilum* e nessuna particolare informazione è scaturita nemmeno dopo 2 cicli vegetativi delle barbatelle.

I rilievi riguardanti lo sviluppo di alterazioni nel legno dei tralci delle piante adulte hanno evidenziato la capacità dei ceppi utilizzati di provocare alterazioni più estese di quelle osservate nel caso del controllo. Tuttavia, gli elevati valori di deviazione standard non hanno permesso di quantificare in maniera inequivocabile le eventuali differenze di virulenza esistenti tra le specie. La variabilità tra le repliche dello stesso tipo di inculo è risultata infatti molto maggiore di quella osservata in seguito a prove di patogenicità condotte in maniera simile e in cui, nonostante la variabilità tra ceppi della stessa specie, è stato comunque possibile determinare dei diversi gradi di virulenza tra le diverse specie. Un esempio di questo tipo è dato dallo studio condotto in Francia da Laveau *et al.* (2009) in cui sono stati utilizzati ceppi di *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* e di *N. parvum*. In seguito a tale studio la specie più virulenta è risultata *P. chlamydospora*, seguita da *N. parvum* e da *P. aleophilum*. Comunque, analogamente a quanto osservato da Laveau e colleghi, anche i ceppi di *P. chlamydospora* utilizzati in questo studio hanno fatto registrare le alterazioni più estese.

Per quanto riguarda le specie di Botryosphaeriaceae, i risultati delle prove di patogenicità condotti in varie parti del mondo evidenziano che i ceppi di *N. parvum* risultano spesso tra quelli più virulenti. Il maggior numero di risultati congruenti in seguito a diversi esperimenti e la maggiore diffusione di *N. parvum* rispetto ad altri componenti della stessa famiglia pure dimostratisi molto aggressivi, fanno ritenere questa specie tra le Botryosphaeriaceae più virulente su vite. Sebbene non ci sia stata la possibilità di distinguere la virulenza nemmeno restringendo la visuale ai ceppi di Botryosphaeriaceae, le lesioni più estese nei tralci inoculati con questi funghi sono state osservate proprio relativamente ad un ceppo di *N. parvum*, la cui media è risultata molto simile a quella documentata da Úrbez-Torres & Gubler (2009) per un ceppo di inoculato su speroni di viti adulte.

Prove di patogenicità su vite condotte con ceppi di *B. dothidea* hanno evidenziato la capacità di questo fungo di produrre lesioni nel legno di barbatelle e piante adulte, sebbene il grado di virulenza osservato per questa specie non sia stato tra i più elevati (van Niekerk *et al.*, 2004; Úrbez-Torres & Gubler, 2009). I valori medi osservati per i 2 ceppi utilizzati in questo studio sono risultati molto simili a quelli della maggior parte dei ceppi di *N. parvum*, ma per entrambi sono state osservate le alterazioni di maggiore entità tra tutti i ceppi di Botryosphaeriaceae.

Per quanto riguarda *D. seriata*, nonostante l'elevata diffusione di questa specie, la sua patogenicità su vite rimane ancora da chiarire. Ciò è dovuto sia a casi in cui non è

stato ottenuto il completamento dei postulati di Koch (Radman *et al.*, 1981; Rovesti & Montermini, 1987; Bonfiglioli *et al.*, 2006) che a causa delle discrepanze tra i risultati ottenuti nelle diverse prove di patogenicità effettuate in diversi esperimenti (Phillips, 1998; Castillo-Pando *et al.*, 2001; van Niekerk *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Savocchia *et al.*, 2007; Úrbez-Torres *et al.*, 2008). Una situazione piuttosto comune sembra essere l'elevata discrepanza di virulenza tra gli isolati usati anche nello stesso studio (Larignon *et al.*, 2001; van Niekerk *et al.*, 2004; Úrbez-Torres *et al.*, 2008; Úrbez-Torres & Gubler, 2009). In molti casi comunque *D. seriata* si è dimostrata tra le Botryosphaeriaceae meno virulente e anche l'unico ceppo considerato in questo studio ha fatto rilevare le alterazioni meno estese rispetto a quelle osservate per i ceppi di *D. seriata* e *N. parvum*.

Concludendo, sebbene la comparazione tra i risultati ottenuti in questo studio non sia statisticamente valida, è stata comunque evidenziata la capacità dei ceppi di Botryosphaeriaceae utilizzati, così come di quelli di *P. chlamydospora* e di *P. aleophilum*, di provocare alterazioni del legno, confermando il loro potenziale ruolo di patogeni per la vite.

## **CAPITOLO 4**

**Verifica della produzione di enzimi esocellulari  
da parte di ceppi di Botryosphaeriaceae ottenuti da piante adulte  
e da materiale di propagazione di vite**

#### 4.1. Riassunto

L'associazione di specie di Botryosphaeriaceae a malattie del legno della vite è stata documentata in diverse aree viticole mondiali e diversi saggi di patogenicità ne hanno evidenziato il potenziale patogenetico. Scopo del presente studio è stato quello di verificare la produzione di alcuni enzimi esocellulari, alcuni dei quali considerati importanti fattori (o cofattori) di virulenza, in una selezione di 11 ceppi di Botryosphaeriaceae ottenuti da un vigneto della provincia di Firenze e da 2 lotti di materiale di propagazione commercializzati in Italia nel 2007 e nel 2008. I ceppi, 8 di *Neofusicoccum parvum*, 1 di *Botryosphaeria dothidea* e 3 di *Diplodia seriata*, erano rappresentativi dei gruppi filogenetici individuati in seguito all'analisi della sequenza dell'rDNA ITS1-5.8S-ITS2 (rDNA ITS) e di parte del gene codificante per il fattore di allungamento 1- $\alpha$  (EF 1- $\alpha$ ). Mediante saggi *in vitro* è stata determinata la capacità di degradazione dell'acido tannico e la produzione di poligalatturonasi, xilanasi, laccasi, manganese perossidasi, lignina perossidasi, lipasi,  $\beta$ -glucosidasi, endo-1,4- $\beta$ -glucanasi e la completa attività cellulase (eso-cellobioidrolasi +  $\beta$ -glucosidasi + endo-1,4- $\beta$ -glucanasi). I risultati hanno indicato che i ceppi considerati in questo studio sono in grado di produrre molti degli enzimi indagati. Infatti, solo i saggi per la xilanasi, la laccasi e la completa attività cellulase hanno dato esito negativo per tutti i ceppi. Inoltre, con un'unica eccezione, l'attività enzimatica non è sembrata essere associata ad alcuna specie né ad un particolare gruppo filogenetico. L'eccezione ha riguardato il saggio della degradazione dell'acido tannico, il quale ha dato esito positivo solo per i 3 ceppi di *N. parvum* appartenenti ad uno stesso gruppo filogenetico individuato all'interno di questa specie. La capacità di alcuni isolati di produrre un enzima ma non un altro suggerisce che essi potrebbero interagire tra di loro, o con altri organismi, per la colonizzazione del legno delle piante di vite.

#### 4.2. Introduzione

Le potenzialità fitopatogene dei funghi vengono studiate anche in relazione alla loro capacità di produrre metaboliti direttamente o indirettamente coinvolti nel processo di malattia (Mugnai *et al.*, 1997; Martos *et al.*, 2008). Tra questi metaboliti particolare enfasi viene data a quell'eterogeneo gruppo di enzimi esocellulari che consentono al patogeno di degradare i componenti della parete cellulare dell'ospite, come xilani, cellulosa, pectine (Santos *et al.*, 2006) e altri composti (St. Leger *et al.*, 1997) che

consentono al microrganismo quanto meno di ricavare dall'ospite nutrienti e di progredire in esso. Ne consegue anche che l'attività relativa di uno o più enzimi di questo tipo può influire sul grado di virulenza del'organismo produttore (Santos *et al.*, 2006).

Nel caso delle malattie del legno della vite (Surico *et al.*, 2006; van Niekerk *et al.*, 2006), prove atte a verificare l'attività di enzimi esocellulari sono state condotte soprattutto su ceppi di *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea* (Fischer, 2002), *Phaeomoniella chlamydospora* (Crous *et al.*, 1999) e di specie diverse di *Phaeoacremonium* (Crous *et al.*, 1996; Larignon & Dubos, 1997; Mugnai *et al.*, 1997; Marchi *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006), mentre, per quanto concerne le specie di Botryosphaeriaceae, saggi di questo tipo sono stati effettuati solo su alcuni ceppi di *Diplodia seriata*, analizzati da Mugnai *et al.* (1997). Altri lavori in cui specie di Botryosphaeriaceae sono state testate per la produzione di enzimi esocellulari sono relativi a ceppi di *Neofusicoccum ribis* e *Lasiodiplodia theobromae* (Saldanha *et al.*, 2007; Messias *et al.*, 2009), isolati da *Eucalyptus* spp., *Micropholis* spp., *Citrus* sp., *Annona muricata*, *A. squamosa*, *Solanum* sp. o da *Mangifera* sp. (Saldanha *et al.*, 2007).

Obiettivo del presente studio è stato quello di verificare, mediante saggi *in vitro*, la produzione di alcuni enzimi esocellulari in una selezione di ceppi di Botryosphaeriaceae ottenuti dal legno di piante adulte e da materiale di propagazione della vite.

### **4.3. Materiali e Metodi**

#### **4.3.1. Ceppi di Botryosphaeriaceae**

I ceppi utilizzati in questo studio (Tabella 1) sono stati scelti sulla base dei risultati ottenuti con un'analisi filogenetica effettuata per un totale di 43 isolati di Botryosphaeriaceae ottenuti da legno di vite. Tali ceppi sono stati isolati da piante di vite ubicate in un vigneto dell'azienda agraria dell'Università di Firenze ("Villa Montepaldi", San Casciano in Val di Pesa, FI) e da barbatelle prodotte da un vivaio della provincia di Firenze (capitolo 2).

#### **4.3.2. Verifica della produzione di enzimi esocellulari**

La produzione di enzimi esocellulari è stata saggiata in seguito ad inoculazione dei funghi in piastre Petri contenenti l'appropriato substrato di reazione. I saggi sono stati



eseguiti in base ai protocolli descritti nei riferimenti bibliografici riportati in tabella 2. La produzione degli enzimi saggiati è stata quantificata mediante misurazione dell'area (media  $\pm$  S.D.) dell'alone osservato nel mezzo di coltura contenente il substrato specifico. Tutti i saggi sono stati ripetuti tre volte utilizzando tre repliche per ceppo. I saggi sono stati eseguiti in base ai protocolli descritti nei riferimenti bibliografici riportati in tabella 2. Le differenze tra le medie sono state valutate mediante il test LSD (Least Significant Difference) di Fisher dopo aver rigettato l'ipotesi nulla (medie uguali) dell'analisi ANOVA (ANalysis Of VAriance) di Fisher per i confronti di più di 2 medie o del test *t* di Student per il confronto di 2 medie, per valori di  $P \leq 0.05$ .

**Tabella 1.** Ceppi di Botryosphaeriaceae utilizzati per la verifica della produzione di enzimi esocellulari. Accanto alle sigle dei ceppi di *D. seriata* e *N. parvum* è riportato il gruppo filogenetico di appartenenza individuato in seguito ad analisi filogenetica (capitolo 2).

Ceppo	Origine
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	
PVFi-Bd3	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
<i>Diplodia seriata</i>	
PVFi-Ds2 (gruppo 1)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
PVFi-Ds7 (gruppo 2)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
<i>Neofusicoccum parvum</i>	
PVFi-Np8 (gruppo 1)	
PVFi-Np9 (gruppo 3)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
PVFi-Np10 (gruppo 1)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
PVFi-Np11 (gruppo 2)	barbatella cv. Sangiovese F9A 548/ 110R 180
PVFi-Np12 (gruppo 3)	barbatella cv. Sangiovese F9A 548/ 110R 180
PVFi-Np18 (gruppo 3)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
PVFi-Np23 (gruppo 1)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,
PVFi-Np29 (gruppo 2)	vite di 12 anni, cv. Sauvignon blanc,

**Tabella 2.** Elenco dei riferimenti bibliografici in base ai quali sono stati eseguiti i saggi enzimatici.

Saggio	Riferimento bibliografico
1. capacità di degradazione dell'acido tannico	Bruno & Sparapano (2007a)
2. poligalatturonasi	Marchi <i>et al.</i> (2001)
3. pectina esterasi	Marchi <i>et al.</i> (2001)
4. xilanasi	St. Leger <i>et al.</i> (1997)
5. completa attività cellulase	Mugnai <i>et al.</i> (1997)
6. $\beta$ -glucosidasi	Mugnai <i>et al.</i> (1997)
7. endo-1,4- $\beta$ -glucanasi	Mugnai <i>et al.</i> (1997)
8. laccasi	Mugnai <i>et al.</i> (1997)
9. manganese perossidasi	Conesa <i>et al.</i> (2000)
10. lignina perossidasi	Conesa <i>et al.</i> (2000)
11. lipasi	Samad <i>et al.</i> (1988)

#### 4.4. Risultati

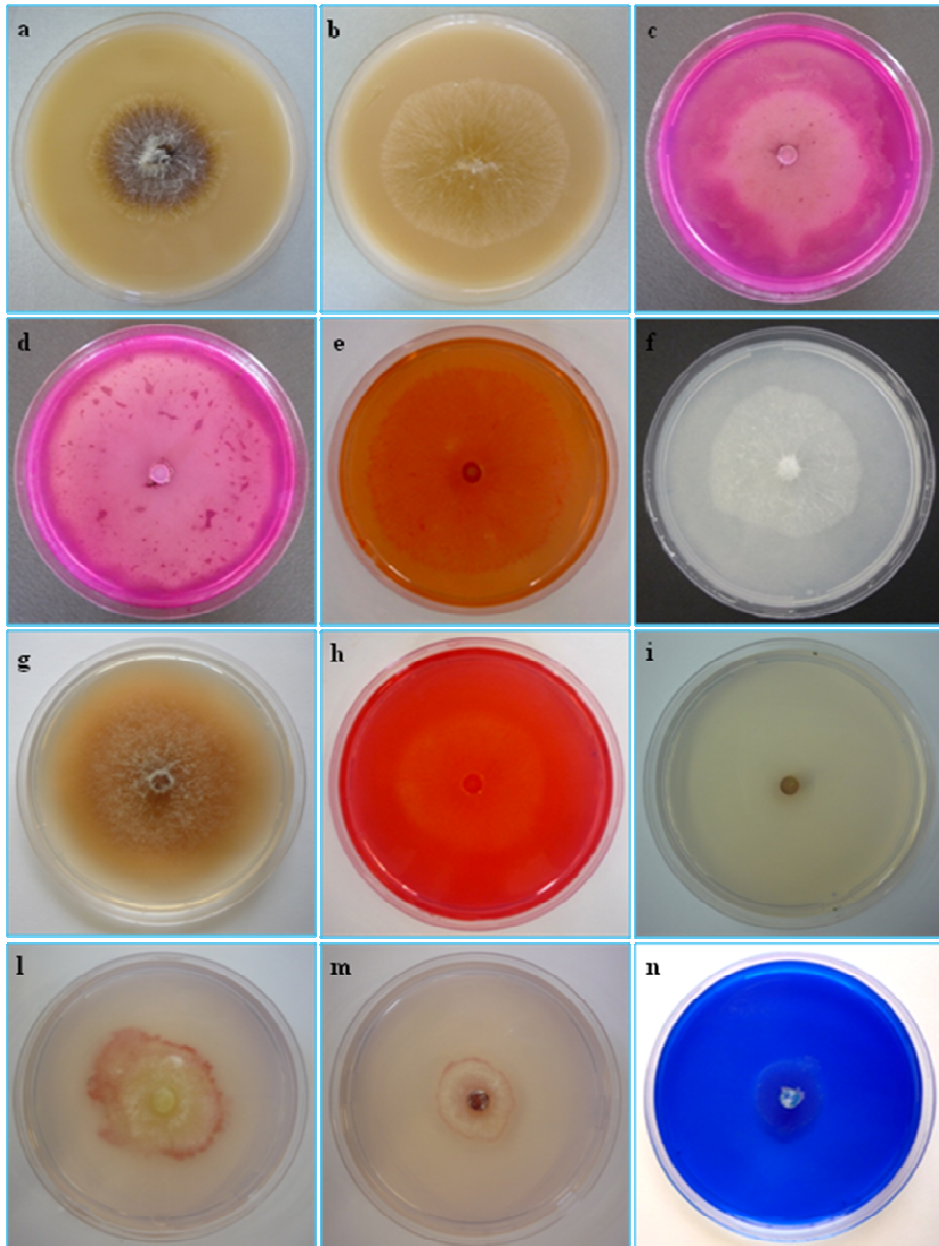
Tra gli 8 ceppi di *N. parvum* utilizzati nell'indagine, sono state osservate differenze significative in 5 degli 8 saggi enzimatici eseguiti (Tabella 3). Solo 3 ceppi di *N. parvum*, appartenenti ad uno stesso gruppo filogenetico individuato all'interno della specie (Tabella 1), hanno evidenziato l'attività di degradazione dell'acido tannico. Tuttavia, tale capacità è risultata differente per ognuno dei 3 ceppi. Fatta eccezione per PVFi-Np9 e PVFi-Np10, i restanti ceppi di *N. parvum* hanno invece mostrato la produzione di poligalatturonasi ma, anche in questo caso, la produzione di tale enzima è apparsa differente per ognuno di essi. La produzione di poligalatturonasi è stata osservata anche nell'unico ceppo di *B. dothidea* e nei 2 ceppi di *D. seriata* e, una differente attitudine alla produzione dell'enzima è stata verificata anche per quest'ultimi. Tutti i ceppi sono risultati positivi al saggio della pectina esterasi e, fatta eccezione per il ceppo PVFi-Np9 di *N. parvum*, tutti hanno evidenziato un'elevata e simile produzione dell'enzima. Totale assenza di produzione dell'enzima è stata invece osservata nel caso dei saggi per la xilanasi, la laccasi e la completa attività cellulase (esocellobiodrolasi +  $\beta$ -1,4-glucosidasi + endo-1,4- $\beta$ -glucanasi). In particolare, mentre nei saggi per la xilanasi e la completa attività cellulase è risultata comunque evidente la crescita delle colonie, nel caso della laccasi non si è verificata alcuna crescita miceliare nelle piastre contenenti il substrato specifico (Figura 1). Tutti i ceppi sono risultati positivi al saggio della  $\beta$ -

1,4-glucosidasi, per il quale, la maggiore produzione di enzima è stata osservata, seppur con una certa eterogeneità, in alcuni ceppi di *N. parvum*; nonostante che, il ceppo PVFi-Np9 sia risultato, in assoluto, quello che ha prodotto meno  $\beta$ -1,4-glucosidasi. Nel caso del saggio della endo-1,4- $\beta$ -glucanasi, l'unico ceppo che non ha evidenziato alcuna produzione di enzima è stato PVFi-Np9. Anche per questo saggio è stata notata un'eterogeneità, non correlata al gruppo filogenetico di appartenenza, nell'ambito degli altri ceppi di *N. parvum*, mentre l'attività enzimatica è apparsa pressoché simile tra i 2 ceppi di *D. seriata*. La produzione di manganese perossidasi è stata osservata in 4 ceppi di *N. parvum* (rappresentativi dei 3 gruppi filogenetici individuati nella specie), in quelli di *D. seriata* e nell'unico di *B. dothidea*, il quale, insieme al ceppo PVFi-Np29 di *N. parvum*, ha evidenziato la maggiore attività enzimatica. Solo PVFi-Np18 e PVFi-Np23 di *N. parvum* sono invece risultati positivi al saggio della lignina perossidasi. Infine, nel saggio della lipasi, gli unici ceppi che non hanno mostrato la produzione di questo enzima sono stati PVFi-Bd3 di *B. dothidea* e PVFi-Np10 di *N. parvum*, mentre, ad eccezione di PVFi-Np9 di *N. parvum* e PVFi-Ds7 di *D. seriata*, i restanti ceppi hanno evidenziato una discreta attività enzimatica, pur se con una certa variabilità tra le repliche.

**Tabella 3.** Enzimi esocellulari prodotti *in vitro* dai ceppi di Botryosphaeriaceae utilizzati in questo studio. I numeri da 1 a 11 indicano rispettivamente i saggi per la capacità di degradazione dell'acido tannico (1), poligalatturonasi (2), pectina esterasi, xilanasi (4), completa attività cellulastica(5),  $\beta$ -glucosidasi (6), endo-1,4- $\beta$ -glucanasi (7), laccasi (8), manganese perossidasi (9), lignina perossidasi (10) e lipasi (11). La produzione degli enzimi saggiati è stata quantificata mediante misurazione dell'area (media  $\pm$  S.D.) dell'alone osservato nel mezzo di coltura contenente il substrato specifico. Le diverse lettere presenti nella stessa colonna indicano differenze significative ( $P \leq 0.05$ ) tra i ceppi considerati nello stesso saggio enzimatico. Tutti i saggi sono stati ripetuti tre volte utilizzando tre repliche per ceppo.

Ceppo	Saggio enzimatico										
	1 (cm <sup>2</sup> )	2 (cm <sup>2</sup> )	3 (cm <sup>2</sup> )	4 (cm <sup>2</sup> )	5 (cm <sup>2</sup> )	6 (cm <sup>2</sup> )	7 (cm <sup>2</sup> )	8 (cm <sup>2</sup> )	9 (cm <sup>2</sup> )	10 (cm <sup>2</sup> )	11 (cm <sup>2</sup> )
<i>B. dothidea</i>											
PVFi-Bd3	0 a	30 $\pm$ 3 c	50 $\pm$ 0 b	0	0	15 $\pm$ 1 ab	20 $\pm$ 1 c	0	12 $\pm$ 1 e	0 a	0 a
<i>D. seriata</i>											
PVFi-Ds2	0 a	30 $\pm$ 2 c	50 $\pm$ 0 b	0	0	20 $\pm$ 2 bc	23 $\pm$ 2 cd	0	5 $\pm$ 3 c	0 a	21 $\pm$ 10 bcd
PVFi-Ds7	0 a	40 $\pm$ 3 d	51 $\pm$ 1 b	0	0	13 $\pm$ 3 a	20 $\pm$ 1 c	0	8 $\pm$ 2 d	0 a	15 $\pm$ 3 abc
<i>N. parvum</i>											
PVFi-Np8	0 a	54 $\pm$ 1 ef	50 $\pm$ 0 b	0	0	34 $\pm$ 3 d	20 $\pm$ 2 c	0	0 a	0 a	31 $\pm$ 10 def
PVFi-Np9	5 $\pm$ 1 b	0 a	35 $\pm$ 6 a	0	0	10 $\pm$ 3 a	0 a	0	0 a	0 a	8 $\pm$ 3 ab
PVFi-Np10	0 a	0 a		0	0	29 $\pm$ 1 d	26 $\pm$ 2 de	0	0 a	0 a	0 a
PVFi-Np11	0 a	41 $\pm$ 5 d	50 $\pm$ 0 b	0	0	33 $\pm$ 6 d	33 $\pm$ 1 f	0	5 $\pm$ 1 bc	0 a	29 $\pm$ 11 cde
PVFi-Np12	16 $\pm$ 2 d	49 $\pm$ 8 e	50 $\pm$ 0 b	0	0	46 $\pm$ 4 f	27 $\pm$ 1 e	0	0 a	0 a	46 $\pm$ 11 f
PVFi-Np18	10 $\pm$ 1 c	37 $\pm$ 7 d	50 $\pm$ 0 b	0	0	22 $\pm$ 5 c	9 $\pm$ 3 b	0	3 $\pm$ 0 b	3 $\pm$ 0 b	23 $\pm$ 9 bcd
PVFi-Np23	0 a	19 $\pm$ 3 b	50 $\pm$ 0 b	0	0	35 $\pm$ 2 d	20 $\pm$ 3 c	0	5 $\pm$ 0 c	5 $\pm$ 0 c	24 $\pm$ 3 cd
PVFi-Np29	0 a	57 $\pm$ 1 f	50 $\pm$ 0 b	0	0	40 $\pm$ 2 e	35 $\pm$ 2 f	0	13 $\pm$ 2 e	0 a	42 $\pm$ 17 ef

**Figura 1.** Esempi dei saggi effettuati per la verifica della produzione di enzimi esocellulari: **a)** degradazione dell'acido tannico (reazione positiva); **b)** degradazione dell'acido tannico (reazione negativa); **c)** poligalatturonasi (reazione positiva); **d)** pectina esterasi (reazione positiva); **e)** xilanasi (reazione negativa); **f)** completa attività cellulastica (reazione negativa); **g)**  $\beta$ -glucosidasi (reazione positiva); **h)** endo-1,4- $\beta$ -glucanasi (reazione positiva); **i)** laccasi (reazione negativa); **l)** manganese perossidasi (reazione positiva); **m)** lignina perossidasi (reazione positiva); **n)** lipasi (reazione positiva).



#### 4.5. Discussione e Conclusioni

I funghi fitopatogeni sono capaci di degradare diverse macromolecole che costituiscono i tessuti della pianta ospite come la cellulosa, le pectine, gli xilani, e la lignina (Binz & Canevascini, 1996; St. Leger *et al.*, 1997), quindi lo studio del corredo enzimatico di un organismo fitopatogeno può rappresentare un utile strumento per la caratterizzazione dei suoi fattori di virulenza.

Tra le sostanze fenoliche prodotte dal metabolismo secondario delle piante vi sono i tannini, noti per la loro capacità di inibire la crescita di molti microrganismi e per essere coinvolti nelle reazioni di difesa della pianta contro l'attacco di agenti patogeni diversi (Bhat *et al.*, 1998; Khanbabaee *et al.*, 2001). Nonostante le proprietà antimicrobiche di questi fenoli, molti funghi, lieviti e batteri riescono a crescere e a svilupparsi anche in loro presenza (Bradoo *et al.*, 1997; Mondal *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2005). È ben nota infatti la capacità di alcuni funghi di decomporre i gallotannini, un particolare gruppo di tannini definiti "idrolizzabili" (Baht *et al.*, 1998) e si ritiene che un ruolo importante nella loro degradazione lo abbia l'enzima tannasi (Bhat *et al.*, 1998; Khanbabaee *et al.*, 2001). La produzione di tannasi, osservata soprattutto in funghi dei generi *Aspergillus* e *Penicillium* (Bhat *et al.*, 1998; Khanbabaee *et al.*, 2001), è stata verificata anche nei funghi *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*. e *F. mediterranea*, coinvolti nel "Grapevine Phaeotracheomycosis complex" (Bruno & Sparapano, 2007a; Surico, 2009). Un substrato tipico della tannasi (tannino acil idrolasi) è rappresentato dall'acido tannico, infatti utilizzato come substrato specifico per determinare l'attività di questo enzima mediante spettrofotometria (Bruno & Sparapano, 2007a). Nel lavoro di Bruno & Sparapano (2007a), la produzione di tannasi da parte dei ceppi di *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* e *F. mediterranea*, è stata inizialmente confermata con tecniche spettrofotometriche e, quando gli stessi ceppi sono stati cresciuti su substrato agarizzato contenente acido tannico, è stata osservata la formazione di un alone bruno intorno alla colonia. Tuttavia, gli autori non hanno attribuito, in maniera diretta, la formazione dell'alone bruno alla singola azione della tannasi, ma hanno definito tale situazione come il risultato della degradazione dell'acido tannico. In particolare, la formazione dell'alone bruno è stata attribuita a fenomeni ossidativi a carico di un prodotto della reazione della tannasi, l'acido gallico. In seguito ad uno studio sulla produzione di tannasi da parte di specie di *Fusarium* (Tardelli, 2007) è stato precisato che la mera azione dell'enzima, su substrato agarizzato, viene visualizzata mediante la formazione di un alone chiaro e che la formazione di un alone bruno sia invece il risultato di

ossidazioni prodotte da enzimi appartenenti alla famiglia delle fenolossidasi, comunque ritenute importanti fattori di virulenza dei funghi fitopatogeni (Mugnai *et al.*, 1997). Tuttavia, in base alle informazioni reperite, non risulta chiaro se l'azione delle fenolossidasi sia o meno dipendente da quella eventuale della tannasi. Di conseguenza, nel caso delle Botryosphaeriaceae utilizzate in questo studio, la formazione dell'alone bruno, osservata per 3 ceppi di *N. parvum* appartenenti ad uno stesso gruppo filogenetico, è stata interpretata come un fenomeno di degradazione dell'acido tannico.

La poligalatturonasi e la pectina esterasi sono considerati importanti fattori di virulenza in quanto capaci di idrolizzare le sostanze pectiche, polisaccaridi strutturali presenti soprattutto nella lamella mediana e nella parete primaria delle cellule vegetali. Si ritiene che questi enzimi facilitino la diffusione del patogeno attraverso il tessuto connettivo (Starr, 1961) o i tessuti vascolari (Mann, 1962; Durrands & Cooper, 1988). Quasi tutti i ceppi utilizzati in questo lavoro di caratterizzazione hanno mostrato la capacità di produrli, capacità osservata anche in ceppi di *N. ribis* e *L. theobromae* isolati da *Eucalyptus* spp., *Micropholis* spp., *Citrus* sp., *Annona muricata*, *A. squamosa*, *Solanum* sp. o da *Mangifera* sp. (Saldanha *et al.*, 2007) e negli agenti della malattia di Petri e della "Grapevine leaf stripe disease", *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. (Marchi *et al.*, 2001; Surico, 2009).

Tutti i ceppi di Botryosphaeriaceae utilizzati in questo lavoro hanno dato reazione negativa nei saggi per la xilanasi, la completa attività cellulase (esocellobioidrolasi +  $\beta$ -glucosidasi + endo-1,4- $\beta$ -glucanasi) e la laccasi. Gli xilani occupano soprattutto la parete secondaria delle cellule dei tessuti legnosi, mentre costituiscono solo una piccola frazione della parete primaria. Rappresentano le emicellulose più abbondanti nelle Angiosperme (Binz & Canevascini, 1996), contribuendo alla rigidità della parete cellulare e quindi alla sua resistenza meccanica. L'attività xilanase è stata osservata da Santos e colleghi (2006) in ceppi di *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium angustius*, *P. aleophilum* e *Phomopsis viticola*. Sebbene i risultati abbiano indicato la mancata produzione di esocellobioidrolasi da parte di tutti i ceppi caratterizzati in questo lavoro (negativi al saggio per la completa attività cellulase), è risultata invece evidente la produzione degli altri 2 enzimi coinvolti nella degradazione della cellulosa,  $\beta$ -glucosidasi ed endo-1,4- $\beta$ -glucanasi. Questi risultati concordano con quelli ottenuti da Mugnai *et al.* (1997), che hanno osservato la mancanza della completa attività cellulase, contemporaneamente alla presenza di quella  $\beta$ -glucosidase, in funghi come *F. mediterranea*, *P. chlamydospora*, *P. aleophilum*, *Eutypa lata*, *D. seriata* e specie di

*Penicillium*. Analogamente, tutti i ceppi di *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp. e *P. viticola*, utilizzati da Santos *et al.*, (2006), hanno evidenziato la produzione di endo-1,4- $\beta$ -glucanasi. La laccasi è una fenolossidasi coinvolta nella degradazione della lignina (Reid, 1995), attività ritenuta essere tipica dei basidiomiceti agenti di carie bianca, come *F. mediterranea* (Mugnai *et al.*, 1997). Tuttavia, pur se con una metodica differente rispetto a quella utilizzata da Mugnai *et al.* (1997), la produzione di laccasi è stata osservata anche da parte di ceppi di *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp. e *P. viticola* (Santos *et al.*, 2006). La produzione di questo enzima è stata inoltre osservata anche da parte di alcuni ceppi di *N. ribis* e di *L. theobromae* isolati da *Eucalyptus* spp., *Micropholis* spp., *Citrus* sp., *Annona muricata*, *A. squamosa*, *Solanum* sp. o da *Mangifera* sp. (Saldanha *et al.*, 2007).

In alcuni funghi agenti di carie bianca, i componenti più importanti del sistema di degradazione della lignina sono rappresentati da due enzimi diversi dalla laccasi, la lignina perossidasi e la manganese perossidasi (Conesa *et al.*, 2000). La produzione di questi enzimi, sebbene Mugnai e colleghi (1997) l'abbiano osservata, oltre che in tutti i ceppi di *F. mediterranea*, anche in qualche ceppo di *P. aleophilum*, non è stata riscontrata nei ceppi di *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp. e *P. viticola* saggiati da Santos *et al.*, (2006). La produzione di queste perossidasi, e in particolare della manganese perossidasi, è stata invece osservata in molti ceppi di Botryosphaeriaceae considerati in questo studio, indicando che anche questi funghi potrebbero avere un ruolo nella degradazione della lignina. Infine, con l'eccezione di un ceppo di *B. dothidea* e uno di *N. parvum*, tutti gli altri ceppi utilizzati nel presente studio hanno mostrato un'attività lipasica, ovvero una capacità potenziale di degradare il plasmalemma delle cellule delle piante ospiti. Recentemente, tale attività è stata osservata anche in alcuni ceppi di *N. ribis* e di *L. theobromae*, isolati da *Eucalyptus* spp., *Micropholis* spp., *Citrus* sp., *Annona muricata*, *A. squamosa*, *Solanum* sp. o da *Mangifera* sp. (Messias *et al.*, 2009).

Molti dei ceppi di Botryosphaeriaceae utilizzati in questo studio sembrano dunque in grado di produrre, così come altri funghi implicati nelle malattie del legno della vite (Mugnai *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2006; Bruno & Sparapano, 2007), alcuni enzimi ritenuti importanti fattori (o cofattori, a seconda della combinazione pianta-patogeno considerata) di virulenza come poligalatturonasi, pectina esterasi (Marchi *et al.*, 2001),  $\beta$ -1,4-glucosidasi, endo-1,4- $\beta$ -glucanasi (Mugnai *et al.*, 1997) o manganese perossidasi



(Mugnai *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2006). Tale produzione avvalorerebbe, in qualche modo, l'attitudine fitopatogena delle specie esaminate e il loro coinvolgimento in malattie del legno della vite, con la sola evidente esclusione dei processi di carie. Tuttavia, la produzione dei diversi enzimi è apparsa, salvo poche eccezioni (poligalatturonasi, pectina esterasi,  $\beta$ -1,4-glucosidasi ed endo-1,4- $\beta$ -glucanasi) molto variabile da ceppo a ceppo. Ciò potrebbe, in un caso diminuire il ruolo, ai fini della patogenicità/virulenza, di questi enzimi oppure essere interpretato come la dimostrazione, indiretta, di quella grande variabilità della patogenicità/virulenza riscontrata da diversi autori fra le popolazioni di Botryosphaeriaceae.

La ricerca relativa al presente capitolo è stata svolta presso il “Centro de Recursos Microbiológicos (CREM), Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa”, Caparica, Portogallo, sotto la supervisione del Prof. Alan J. L. Phillips.

## CAPITOLO 5

In questo capitolo viene presentato il manoscritto dell' articolo:

**“Detection of Botryosphaeriaceae within grapevine woody tissues  
by nested PCR, with particular emphasis  
on the *N. parvum*/*N. ribis* complex”**

spedito alla rivista European Journal of Plant Pathology

**Detection of Botryosphaeriaceae within grapevine woody tissues by nested PCR, with particular emphasis on the *N. parvum/N. ribis* complex**

**Alessandro Spagnolo · Guido Marchi · Francesca Peduto · Alan J. L. Phillips and Giuseppe Surico**

A. Spagnolo (✉) · G. Marchi · F. Peduto · G. Surico

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie – Sezione di Patologia vegetale, Università degli Studi di Firenze, Piazzale delle Cascine 28, 50144 Firenze, Italy

e-mail: alessandro.spagnolo@unifi.it

A. J. L. Phillips

Centro de Recursos Microbiológicos, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

**Keywords**

grapevine decline · multiple infections · *Neofusicoccum parvum* · nursery propagating material · *Phaeoconiella chlamydospora* · sources of inoculum

**Abstract**

In this study two nested PCR protocols were performed to acquire new and more complete information on the epidemiology of the Botryosphaeriaceae species that have been up to now reported as potential agents of diseases of grapevine trunks and arms. One protocol had a narrow target range, to specifically detect the DNA of only *N. parvum* and taxonomically closely related species (*N. parvum/N. ribis* complex *sensu* Pavlic et al. 2009a) and another, with a wider range, to detect all sixteen taxa associated with various diseases of the grapevine trunk. By means of these two molecular tools we monitored the relative incidence in plants of commerce released on the Italian market in two different years by five different nurseries. Moreover in order to assess the adequacy of the newly developed methodologies and to evaluate the overall results, we also monitored the frequency of detection in the same samples of the tracheomycotic fungus *Phaeoconiella chlamydospora* whose presence in standing vines and propagating material has been frequently reported worldwide, often associated to Botryosphaeriaceae. The DNA of Botryosphaeriaceae, and specifically of the *N.*

*parvum/N. ribis* complex, was found in 14 and in 12 respectively of the 17 lots of nursery stock material examined, meanwhile that of *P. chlamydospora* was found in 5 of the same lots. Furthermore, the crossed data obtained by each PCR assay suggested, and the results of sequencing and phylogenetic analysis of amplicons confirmed, that most of the woody tissue samples that tested positive, were naturally infected by at least two different Botryosphaeriaceae species.

## **Introduction**

In recent years among the various fungi that are known to cause decline and other diseases of the grapevine trunk (Surico et al. 2006), increasing importance has been given to species in the Botryosphaeriaceae Theiss. & H. Syd. (Crous et al. 2006). The members of this family are cosmopolitan ascomycetes that occur worldwide as saprophytes, endophytes or pathogens on a vast number of gymnosperms, monocotyledons and dicotyledons, including *Vitis vinifera*. In the case of grapevine, until about 20 years ago only three Botryosphaeriaceae species were known to be involved in grapevine trunk diseases. *Diplodia mutila* (= *Botryosphaeria stevensii*) (Lehoczky 1974) and *Diplodia seriata* (= *B. obtusa*) (Cristinzio 1978; Rovesti and Montermini 1987), were regarded as the causal agents of the disease named black dead arm and *Lasiodiplodia theobromae* (= *B. rhodina*) (Hewitt 1988), was considered to be the causal agent of Diplodia cane dieback and bunch rot. However, in the last decade, data collected worldwide indicate that the situation is much more complex than previously thought, and to date 16 potentially phytopathogenic species have been isolated from declining grapevines (van Niekerk et al. 2006; Damm et al. 2007; Martin and Cobos, 2007; Úrbez-Torres et al. 2007; Carlucci et al. 2009). Most of these species have been associated with cases of dieback of the entire plant or of its parts (canes, arms), bud mortality, brown streaking or necrosis of the wood, grape rot, delayed bud burst (Lehoczky 1974; Úrbez-Torres et al. 2006; van Niekerk et al. 2006; Úrbez-Torres et al. 2008; Burruano et al. 2008;) as well as different leaf symptoms (Cristinzio 1978; Larignon and Dubos 2001; Larignon et al. 2001; Lecomte et al. 2005; Burruano et al. 2008; Larignon et al. 2009; Lecomte et al. 2009; Rego et al. 2009). Characterization of Botryosphaeriaceae as wood pathogens is complicated by several factors: 1) most, if not all, symptoms induced should be regarded as non specific since they may be induced by different Botryosphaeriaceae as well as by other pathogens such as *Eutypa lata* and

*Phomopsis viticola* (van Niekerk et al. 2006), or can be the manifestation of other diseases such as esca (Surico et al. 2006); 2) identification to species level of the potential causal agent is difficult especially when relying only on morphology (Phillips et al. 2005); 3) comparison of the results of separate pathogenicity tests carried out in different countries have indicated, as a whole, that within most of the species considered, the isolates likely differ considerably in their virulence (Laveau et al. 2009; Rego et al. 2009), thus it is difficult to evaluate the pathogenic potential of different taxa that may be found associated with grapevines (van Niekerk et al. 2004; Taylor et al. 2005; Savocchia et al. 2007; Úrbez-Torres and Gubler 2009). At present very little is known about the epidemiology of grapevine diseases caused by Botryosphaeriaceae (van Niekerk et al. 2006) as well as about the consistence and the degree of heterogeneity of the Botryosphaeriaceae that may coexist within the woody tissues of grapevines.

Until 2004 (Slippers et al. 2004), “*B. parva*” (now *Neofusicoccum parvum*) and “*B. ribis*” (now *N. ribis*) were considered to be part of the *B. dothidea* complex and thus the possibility that earlier reports may have been based on unreliable identifications cannot be ruled out. However, although the combined multi-gene genealogies used by Slippers et al. (2004) allowed the clear separation of the closely related species “*B. parva*” and “*B. ribis*”, the distinction of these two taxa continues to be difficult. Currently, *Neofusicoccum parvum* and *N. ribis* are regarded, together with three cryptic species isolated from *Syzygium cordatum* in South Africa, as forming a group, named the *N. parvum*/*N. ribis* complex (Pavlic et al. 2009a). To date, only *N. parvum* and *N. ribis* have been isolated from grapevine (Pascoe 1998; Phillips 2002; van Niekerk et al. 2004; Úrbez-Torres et al. 2006; Martin and Cobos 2007; Carlucci et al. 2009; Rego et al. 2009). *Neofusicoccum parvum* has been found associated with brown streaking and necrosis of wood (Phillips 2002; van Niekerk et al. 2006) and the results of pathogenicity tests, as well as the characterization of some of its virulence determinants, indicate that members of this species are among the most virulent on grapevine (Phillips 2002; van Niekerk et al. 2004; Martos et al. 2008; Laveau et al. 2009; Úrbez-Torres and Gubler 2009). *Neofusicoccum ribis* has been isolated only occasionally from grape bunch rots (Pascoe 1998) as well as from discoloured wood (Crous et al. 2000, cited by van Niekerk et al. 2004). Nevertheless, the results of pathogenicity tests on grapevine carried out with a strain isolated from *Ribes* sp. (van Niekerk et al. 2004), indirectly suggest that this species could also be an important wood pathogen of *Vitis* sp. (van Niekerk et al. 2006).

The first objective of the present study was to design and evaluate a polymerase chain reaction (PCR)-based diagnostic assay for use in the study of epidemiology of fungi belonging to the *N. parvum/N. ribis* complex *sensu* Slippers et al. (2009a) in grapevine. We first developed a nested PCR assay targeting the ITS1-5,8S-ITS2 rDNA (ITS rDNA) region and evaluated its specificity and sensitivity on: 1) DNA extracted from a range of microorganisms that have been recovered worldwide from grapevine (Carter 1991; Burr and Otten 1999; Mugnai et al. 1999; van Niekerk et al. 2006; Martin and Cobos 2007; Úrbez-Torres et al. 2007; Carlucci et al. 2009; Casieri et al. 2009) including members of different phylogenetic groups of the targeted species that may reside in the same agroecosystem; 2) DNA extracted from naturally infected grapevine woody tissues of standing vines and plants of commerce. Then, by adopting a simple but effective sampling procedure, we performed a survey to ascertain the role of nursery stock material as possible source of inoculum of the species comprising the *N. parvum/N. ribis* complex. Since currently the relative spread of the different Botryosphaeriaceae within Italian vineyards and nurseries is unknown, in order to assess the adequacy of the newly developed methodology and to estimate the relative diffusion of the *N. parvum/N. ribis* complex with respect to other fungal taxa, we employed in all our trials 2 other nested PCR assays. One assay was developed and optimized during this study to specifically amplify the DNA of all the species of the Botryosphaeriaceae, including *N. parvum* and *N. ribis*, that can be involved in grapevine decline and dieback. The second assay, was developed by Edwards et al. (2007) using the primer set Pch1/Pch2 (Tegli et al. 2000), to specifically amplify the DNA of the tracheomycotic fungus *Phaeoconiella chlamydospora* (Pch), which has been reported frequently from woody tissues of standing vines and propagation material world wide (Retief et al. 2006; Aroca et al. 2006; Edwards et al. 2007).

## **Materials and Methods**

### **Fungal strains**

To assess the specificity of the primer sets developed or employed in this study, 49 reference strains of 16 species of Botryosphaeriaceae were utilized in this study (Table 1). Forty two were originally isolated from the woody tissues of *Vitis* sp. in different continents (Africa, America, Europe and Oceania). However, in the case of *Dothiorella iberica*, *Dothiorella sarmentorum*, *Diplodia corticola* and *Neofusicoccum ribis*, well characterized strains isolated from grapevine were unavailable, and therefore reference strains from other hosts (*Quercus* sp., *Pyrus* sp. and *Ribes* sp.) were included. Moreover 30 reference strains belonging to 14 fungal species and two *Agrobacterium vitis* strains were also considered (Table 1). All fungi were grown in 30 ml of 2% potato dextrose broth (Difco laboratories Inc., Detroit, MI, USA) at 25 °C in the dark on a rotary shaker (100 rpm) for 7–14 days. Approximately 200 mg of actively growing mycelium were collected aseptically for subsequent DNA extraction.

**Table 1.** Fungal and bacterial reference strains and fungal isolates used in this study to verify the specificity of the primer sets BoitsA/BoitsB (Botryosphaeriaceae specific), NprcA/NprcB (*N. parvum*/*N. ribis* complex specific) and Pch1/Pch2 (*P. chlamydospora* specific).

Identity	Host and geographical origin	Collector	Amplification with each primer set		
			BoitsA/BoitsB (this work)	ParA/ParB (this work)	Pch1/Pch2 <sup>a</sup>
<b>Reference strains</b>					
<i>Botryosphaeria dothidea</i>					
UCD2190Mo	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+ <sup>b</sup>	-	-
UCD2255Mo	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	-	-
UCD2191	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	-	-
PVFi-Bd1	Grapevine; Italy	Rapetti S.	+	-	-
PVFi-Bd2	Grapevine; Italy	Natalini G.	+	-	-
<i>Diplodia mutila</i>					
M226	Grapevine; New Zealand	Jaspers M.	+	-	-
N1351	Grapevine; New Zealand	Jaspers M.	+	-	-
CSU-07-WP-TS23	Grapevine; Australia	Savocchia S.	+	-	-
CSU-07-WP-CV5	Grapevine; Australia	Savocchia S.	+	-	-
UCD1953SB	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	-	-
UCD2165OR	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	-	-
<i>Diplodia seriata</i>					
B121	Grapevine; New Zealand	Jaspers M.	+	-	-
N144	Grapevine; New Zealand	Jaspers M.	+	-	-
CSU-07-WP-DO4	Grapevine; Australia	Savocchia S.	+	-	-
CSU-07-WP-J10	Grapevine; Australia	Savocchia S.	+	-	-
UCD244Ma	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	-	-
UCD352Mo	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	-	-
UCD2161	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	-	-
PVFi-Ds1	Grapevine; Italy	Natalini G.	+	-	-
<i>Diplodia corticola</i>					
CBS112077	<i>Quercus suber</i> ; Spain	Luque J.	-	-	-
CBS112076	<i>Quercus suber</i> ; Spain	Luque J.	-	-	-



**Table 1. (continued)**

Identity	Host and geographical origin	Collector	Amplification with each primer set		
			BoitsA/BoitsB (this work)	ParA/ParB (this work)	Pch1/Pch2 <sup>a</sup>
<b>Reference strains</b>					
<i>Dothiorella iberica</i>					
CBS 115035	Oak; Spain	Luque J.	+	-	-
CBS 115041	Oak; Spain	Luque J.	+	-	-
<i>Dothiorella sarmentorum</i>					
CBS 120.41	Pear; USA	Wollenweber H.W.	+	-	-
<i>Dothiorella viticola</i> 573 (anamorph of <i>S. Viticola</i> )					
	Grapevine; Spain	Luque J.	+	-	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>					
CBS 124060	Grapevine; Italy	Burruano S.	+	-	-
UCD205Co	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	-	-
UCD2193	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	-	-
UCD1014BC	Grapevine; Mexico	Úrbez-Torres J.R.	+	-	-
<i>Lasiodiplodia plurivora</i>					
CBS 121103	Grapevine; South Africa	Halleen F.	+	-	-
<i>Neofusicoccum australe</i>					
Kat-1	Grapevine; New Zealand	Jaspers M.	+	-	-
Mel-1	Grapevine New Zealand	Jaspers M.	+	-	-
CSU-07-WP-FF24	Grapevine; Australia	Savocchia S.	+	-	-
CSU-07-WP-M2	Grapevine; Australia	Savocchia S.	+	-	-
<i>Neofusicoccum luteum</i>					
N-1	Grapevine; South Africa	Halleen F.			
	Grapevine; New Zealand	Jaspers M.	+	-	-
M(8)4	Grapevine; New Zealand	Jaspers M.	+	-	-
UCD2057Te	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	-	-
UCD2090Te	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	-	-

**Table 1. (continued)**

Identity	Host and geographical origin	Collector	Amplification with each primer set		
			BoitsA/BoitsB (this work)	ParA/ParB (this work)	Pch1/Pch2 <sup>a</sup>
<b>Reference strains</b>					
<i>Neofusicoccum parvum</i>					
CBS 117923	Guava; Venezuela	Cedeno L.	+	+	-
G22a3	Grapevine; New Zealand	Jaspers M.	+	+	-
B2141	Grapevine; New Zealand	Jaspers M.	+	+	-
UCD2205Mo	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	+	-
UCD2280Mo	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	+	-
UCD2194	Grapevine; USA	Úrbez-Torres J.R.	+	+	-
<i>Neofusicoccum ribis</i>					
CBS 115475 (CMW7772)	<i>Ribes</i> sp. USA	B. Slippers & G. Hudler	+	+	-
<i>Neofusicoccum viticlavatum</i>					
CBS 112878	Grapevine; South Africa	Hallen F.	+	-	-
<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>					
CBS110887	Grapevine; South Africa	van Niekerk J.	+	-	-
<i>Phaeobotryosphaeria porosa</i>					
CBS110574	Grapevine; South Africa	van Niekerk J.	+	-	-
<i>Spencermartinsia viticola</i>					
CBS 117009	Grapevine; Spain	Luque J.	+	-	-
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>					
PVFi-Pal72	Grapevine; Italy	Bertelli E.	-	-	-
PVFi-Pal80	Grapevine; Italy	Bertelli E.	-	-	-
PVFi-Pal86	Grapevine; Italy	Mugnai L.	-	-	-
PVFi-Pal94	Grapevine; USA	Van der Water L.	-	-	-
PVFi-Pal95	Grapevine; USA	Mugnai L.	-	-	-
CBS 631.94	Grapevine; Italy	Mugnai L.	-	-	-

**Table 1. (continued)**

Identity	Host and geographical origin	Collector	Amplification with each primer set		
			BoitsA/BoitsB (this work)	ParA/ParB (this work)	Pch1/Pch2 <sup>a</sup>
<b>Reference strains</b>					
<i>Phaeoacremonium angustius</i>					
PVFi-Pang29	Grapevine; Italy	Bertelli E.	-	-	-
CBS 249.95	Grapevine; USA	Larignon P.	-	-	-
<i>Phaeoacremonium inflatipes</i>					
CBS 391.71	Oak; USA	Halliwell L.S.	-	-	-
CBS 100818	Olive; Italy	Frisullo S.	-	-	-
<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>					
CBS 498.94	Human; USA	Kwong-Chung K.J.	-	-	-
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>					
PVFi-Pch36	Grapevine; Italy	Bertelli E.	-	-	+
PVFi-Pch44	Grapevine; Italy	Mugnai L.	-	-	+
CBS 229.95	Grapevine; Italy	Mugnai L.	-	-	+
PVFi-Pch128	Grapevine; Italy	Bertelli E.	-	-	+
PVFi-Pch132	Grapevine; Italy	Mugnai L.	-	-	+
<i>Bionectria ocralucea</i>					
PVFi-Bn1	Grapevine; Italy	this study	-	-	-
PVFi-Bn2	Grapevine; Italy	this study;	-	-	-
<i>Cylindrocarpon destructans</i>					
Cyl 204.03	Grapevine;NewZealand	Jaspers M.	-	-	-
Cyl 207.03	Grapevine;NewZealand	Jaspers M.	-	-	-
<i>Phomopsis viticola</i>					
PVFi-ph1	Grapevine; Italy	Mugnai L. .	-	-	-
PVFi-ph3	Grapevine; Italy	Mugnai L.	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>					
PVFi-Bc3	Grapevine; Italy	Mugnai L. .	-	-	-

**Table 1. (continued)**

Identity	Host and geographical origin	Collector	Amplification with each primer set		
			BoitsA/BoitsB (this work)	ParA/ParB (this work)	Pch1/Pch2 <sup>a</sup>
<b>Reference strains</b>					
<i>Aspergillus sp.</i>					
PVFi-As1	Grapevine; Italy	Mugnai L.	-	-	-
<i>Alternaria sp.</i>					
PVFi-A11	Grapevine; Italy	Mugnai L.	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>					
PVFi-Pn5	Grapevine; Italy	Mugnai L.	-	-	-
<i>Eutypa lata</i>					
PVFi-EI04	Grapevine; Croatia	Peduto F.	-	-	-
PVFi-EI12	Grapevine; Italy	Mugnai L.	-	-	-
<i>Fomitiporia mediterranea</i>					
PVFi-Fom200.03	Grapevine; Italy	Mugnai L.	-	-	-
PVFi-Fom201.03	Grapevine; Italy	Marchi G.	-	-	-
<i>Agrobacterium vitis</i>					
ICMP 12847	Grapevine; Japan	Sawada H.	-	-	-
PVFi-Av5	Grapevine;NewZealand	Peduto F.	-	-	-

**Table 1. (continued)**

Identity	Host	Collector	Amplification with each primer set		
			BoitsA/BoitsB (this work)	ParA/ParB (this work)	Pch1/Pch2 <sup>a</sup>
<b>Botryosphaeriaceae Isolates recovered in this study</b>					
<i>B. dothidea</i>					
PVFi-Bd3	Standing vine	this study	+	-	-
PVFi-Bd4	Standing vine	this study	+	-	-
PVFi-Bd5	Standing vine	this study	+	-	-
<i>D. seriata</i>					
PVFi-Ds2	Standing vine	this study	+	-	-
PVFi-Ds3	Standing vine	this study	+	-	-
PVFi-Ds4	Standing vine	this study	+	-	-
PVFi-Ds5	Standing vine	this study	+	-	-
PVFi-Ds6	Standing vine	this study	+	-	-
PVFi-Ds7	Standing vine	this study	+	-	-
PVFi-Ds8	Standing vine	this study	+	-	-
PVFi-Ds9	Standing vine	this study	+	-	-
PVFi-Ds10	Standing vine	this study	+	-	-
PVFi-Ds11	Standing vine	this study	+	-	-
<i>N. parvum</i>					
PVFi-Np2	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np3	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np4	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np5	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np6	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np7	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np8	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np9	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np10	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np11	Dgrc 2007	this study	+	+	-
PVFi-Np12	Dgrc 2007	this study	+	+	-

**Table 1. (continued)**

Identity	Host	Collector	Amplification with each primer set		
			BoitsA/BoitsB (this work)	ParA/ParB (this work)	Pch1/Pch2 <sup>a</sup>
<b>Botryosphaeriaceae Isolates recovered in this study</b>					
PVFi-Np13	Dgrc 2007	this study	+	+	-
PVFi-Np14	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np15	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np16	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np17	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np18	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np19	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np20	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np21	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np22	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np23	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np24	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np25	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np26	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np27	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np28	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np29	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np30	Standing vine	this study	+	+	-
PVFi-Np31	Standing vine	this study	+	+	-

<sup>a</sup>Tegli *et al.*, 2000.

<sup>b</sup>+ and – indicates the presence or the absence of the expected diagnostic amplicon.

### **Plant material**

Five standing vines (cv. Sauvignon blanc) were uprooted from a twelve years old commercial vineyard in the province of Florence (Italy). Five dormant grafted rooted cuttings (dgrc 2007) were chosen randomly from each of 3 lots (different combinations of cvs. and/or rootstocks) produced by nurseries B (central Italy) and from one lot produced by nursery E (France) in 2007. Vines and dgrc were washed under tap water, cross sectioned, surface disinfected as described by Retief et al. (2006), and the bark was removed with a sterile scalpel. The sections of the trunk and arms (standing vines) or rootstock trunk of the dgrc 2007 were then cut longitudinally and the different types of wood discolouration noted (Fig. 1). Samples consisting of wood chips (average weight  $98 \pm 20$  mg) were taken, in the case of standing vines, from the most representative wood discolourations (Fig. 1a, b, c and d), while in the case of dgrc 2007, samples were taken both from discoloured (Fig. 1e) and non-discoloured wood (Fig. 1f). In total 54 samples of woody tissue from standing vines and 45 from dgrc 2007, of which 24 were from discoloured woody tissues and 21 were from non-discoloured woody tissue, were subjected to DNA extraction or to direct fungal isolation.

To determine the possibility that nursery stock material may act as a potential source of inoculum, thirteen lots of dgrc (different combinations of cvs. and/or rootstocks) ready to be commercialized in Italy by four national nurseries [A and B, (central Italy); C and D (northern Italy)] and one French nursery (E), were inspected in 2008 (dgrc 2008). From each lot of material, a minimum of five dgrc's were chosen randomly, the scions and the roots removed with sterile pruning sheers and the rootstock trunk was surface disinfected as described above. Each of the five trunks of dgrc was cut into segments approximately 5–7 cm in length and five segments, one from each rootstock trunk, were randomly chosen and decorticated with a sterile scalpel. The resulting woody tissues comprised the pooled sample to be analysed (average weight  $13.7 \pm 5.84$  g). Based on the size of each sampled lot, the sampling procedure was replicated from 1 to 9 times, obtaining, as a whole, 50 pooled samples for DNA extraction. Ten canes were taken from 2 wild *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* vines located in the World Wildlife Fund (WWF) Conservation Area of the Burano Lake in Tuscany (Grosseto, Italy) and processed as described above.

**Fig. 1.** Examples of the wood discolourations that were found within the arms or the trunk of 12 year old grape cv. Sauvignon blanc vine (**a** and **b**, longitudinal sections; **c** and **d**, cross sections,) or within the discoloured rootstock trunk of a dormant grafted rooted cutting (**e**) collected from nursery B in 2007 (dgrc 2007); **f**, non discoloured woody tissues of a dormant grafted rooted cutting. In most of the cases the discolouration process originated in correspondence of a pruning wound.



#### **Isolation and characterization of Botryosphaeriaceae and Pch from plant material**

To evaluate the sensitivity and the specificity of the nested PCR assays and to evaluate, at molecular level, the degree of heterogeneity between the isolates of the *N. parvum/N. ribis* complex that exist in the same environment, wood chips (min. 10, max. 36) were taken from the discoloured woody tissues of standing vines and from the woody tissues with or without discolourations of the dgrc 2007. The chips were placed on 2% potato dextrose agar PDA (Difco laboratories Inc., Detroit, MI, USA) amended with 0.015% streptomycin sulfate (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, USA) and incubated at 25°C in the dark for up to 3 weeks. From each piece of discoloured wood, up to 4 monoconidial isolates were obtained from the colonies whose morphology resembled that of Botryosphaeriaceae and tentatively identified to species level by sequence analysis of the ITS rDNA according to Úrbez-Torres et al. (2006) with minor modifications. Subsequently a selection of the isolates that on the basis of this initial screening could be ascribed to species belonging to the *N. parvum/N. ribis* complex,



were further characterized by sequencing parts of the  $\beta$ -tubulin (BT) (Úrbez-Torres et al. 2006) and translation elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) (van Niekerk et al. 2004) genes, and subsequent phylogenetic analysis. Pch isolates were identified on the basis of the morphological characteristics of the colony.

### **DNA extraction**

Fungal mycelia and wood chip samples were directly ground with sterile inert sand and liquid nitrogen in a sterile ceramic mortar with the addition of 800  $\mu$ l of the AP1 buffer of the DNeasy Plant Minikit (Qiagen N.V., Venlo, Netherlands). The pooled woody tissue samples from dgrc 2008 were homogenized for 3 min in 100 ml of sterile phosphate buffer (0.05M, pH 7.2) using a refrigerated Waring blender (Waring Products, Torrington, CT, USA). One ml of homogenate was centrifuged for 5 min at  $1000 \times g$  and the supernatant was transferred in a new sterile tube and centrifuged again for 10 min at  $9200 \times g$ . In all cases further steps of DNA extraction were carried out with the DNeasy Plant Minikit according to the manufacturer's instructions. The purified DNA was amplified with the universal primer set ITS5/ITS4 (White et al. 1990) to ensure that the DNA had been successfully extracted and that no PCR inhibitors were present. Amplified DNA was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Primers design and set up of two nested PCR assays**

The ITS rDNA sequences from the 16 Botryosphaeriaceae species reported from grapevine were retrieved from the International Nucleotide Sequence Database (INSD; <http://www.insdc.org/>). Nucleotide sequences were aligned with CLUSTALX (<http://www.clustal.org/>) and adjusted manually when necessary. On the basis of the information retrieved, 2 primer sets were designed within the regions flanked by the universal primers ITS5 and ITS4 (White et al. 1990): NprcA (5'-AACTCCAGTCAGTGAAGT-3') and NprcB (5'-CCGAGGTCAACCTTGAGAAAT-3') to specifically amplify a region of 372 bp in the species belonging to the *N. parvum/N. ribis* complex (Pavlic et al. 2009a); BoitsA (5'-GACCATCAAACCTCCAGTCAG-3') and BoitsB (5'-AAAGTTCAGAAGGTTTCGTCCGG-3') to specifically amplify a region varying from 359 to 365 bp in the species of the Botryosphaeriaceae that were considered in this work. Their theoretical specificity was tested *in silico* using Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>).

As the quantity of target DNA in the naturally infected samples was expected to be low, nested PCR specific assays were set up. PCR reagents were purchased from Fermentas International Inc., (Burlington, Ontario, Canada) and primers were synthesized by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). All PCR reactions contained the following reagents in a final volume of 25  $\mu$ l: 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP's mix, 1x DreamTaq™ Buffer (MgCl<sub>2</sub> 2mM +KCl +(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 0.2  $\mu$ M of each primer, 1.25 U of DreamTaq™ DNA Polymerase and 2  $\mu$ l of DNA template. Reaction mixtures were assembled on ice and performed in a preheated thermal cycler (Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The first round of the nested PCR, in common to both assays, was carried out with the universal primer set ITS5/ITS4 (White et al. 1990). Thermal cycling conditions for this amplification were 3 min at 94°C followed by 30 cycles, each of which consisted of: 30 sec at 94°C, 30 sec at 50°C, 30 sec at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C. The resulting PCR products as well as the negative controls of PCR were diluted 1:100 with double distilled sterile water (ddsw) and 2  $\mu$ l were used as template in the second round of PCR, carried out with the primer set NprcA/NprcB in the case of the *N. parvum/N. ribis* complex specific assay or with the primer set BoitsA/BoitsB in the case of the Botryosphaeriaceae specific assay. Thermal cycling conditions for the amplification with the primer set NprcA/NprcB were: 5 min at 94°C followed by 40 cycles, each of which consisted of: 45 sec at 94°C, 30 sec at 61°C, 30 sec at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C. Thermal cycling conditions for the amplification with the primer set BoitsA/BoitsB were the same as for NprcA/NprcB except that 35 cycles instead of 40 were used. First round PCR products were also amplified with the primer set Pch1/Pch2 reported as specific for Pch (Tegli et al. 2000), according to the PCR conditions described by Edwards et al. (2007).

All amplified PCR products were resolved by electrophoresis at 100 Vcm<sup>-1</sup> in 2% agarose (IBI-Shelton Scientific, Peosta, IA, USA) gels in 1x Tris-borate-EDTA, buffer stained with ethidium bromide (0.5  $\mu$ gml<sup>-1</sup>), and visualized under a UV transluminator (Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Fragment size was estimated using the Mass Ruler DNA Ladder low range (Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Canada). To reduce the risk of cross-contamination, all manipulations (DNA extraction, PCR reactions set up and electrophoresis) were performed in separate rooms with dedicated tools. Filter pipette tips were always used.

### **Theoretical sensitivity of the nested PCR assays**

The genomic DNA concentration of *N. parvum* PVFi-Np9, *Spencermartinsia viticola* CBS 117009 and Pch PVFi-Pch36 (Table 1) was measured using a DyNA Quant 200 fluorometer (Hofer Inc., Holliston, MA, USA) and 1:10 serial dilutions were made with dds. The sensitivity of the nested PCR was estimated at the maximal dilution titer by using the NprcA/NprcB, BoitsA/BoitsB and Pch1/Pch2 primer sets, respectively, both in single step and nested PCR.

### **Sequencing and Phylogenetic analyses**

PCR products were purified with the EXOSAP mix (USB Europe GmbH, Stauf, Germany) in accordance with manufacturer's instructions and sequenced on a ABI prism 310 CE system (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), using the ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 1.1 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Chromatograms, including sense and antisense sequences, were edited and assembled manually to obtain single consensus sequences. Primer sequences were removed and identity searches were performed on the INSD database.

Bayesian analyses were performed for each one of the ITS-rDNA, BT and EF1- $\alpha$  data sets and, after checking their congruence by means of the partition homogeneity test as implemented in PAUP\* v.4.0b10 (Swofford 2002), on the concatenated ITS-rDNA and EF1- $\alpha$  data sets, including at least one reference sequence of each of the species of the Botryosphaeriaceae that have been reported from grapevine. When needed the reference sequences of Botryosphaeriaceae isolated from other hosts were also considered. Sequences were aligned with Clustalw using the alignment option in Mega 4.1 (Tamura et al. 2007) and the analyses were performed with MrBayes v 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) using *B. dothidea* CMW8000 (acc. numbers: AY236949, AY236927, AY236898) as the outgroup. Default settings were changed as follows: substitution rate=2, nucleotide frequencies=equal, 25% of the trees and sampled generations discarded. Three independent runs were performed for each dataset to check the congruence of the results. The resulting consensus trees were edited with Figtree v 1.2.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

To confirm the usefulness of the BoitsA/BoitsB and NprcA/NprcB assays for detecting the presence of their respective molecular targets within the total DNA extracted from naturally infected grapevine tissues, 42 (10 from standing vines, 10 from dgrc 2007, 20 from dgrc 2008 and 2 from *V. vinifera* subsp. *sylvestris*) and 15 (4 from

standing vines, 4 from dgrc 2007, 5 from dgrc 2008 and 2 from *V. vinifera* subsp. *sylvestris*) amplicons respectively, were independently subjected to sequence and phylogenetic analysis as described above, using *Guignardia bidwelli* CBS 111145 (acc. number EU683672) as the outgroup.

### **Statistical analysis**

Positive and negative ratios observed for each of the 3 independent nested PCR assays or for fungal isolation, were compared as unordered  $R \times C$  contingency tables using the two-tailed “Fisher-Freeman-Halton” exact test as implemented by StatXact (CYTEL Software Corporation, Cambridge, MA, USA). Differences between compared groups were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$ .

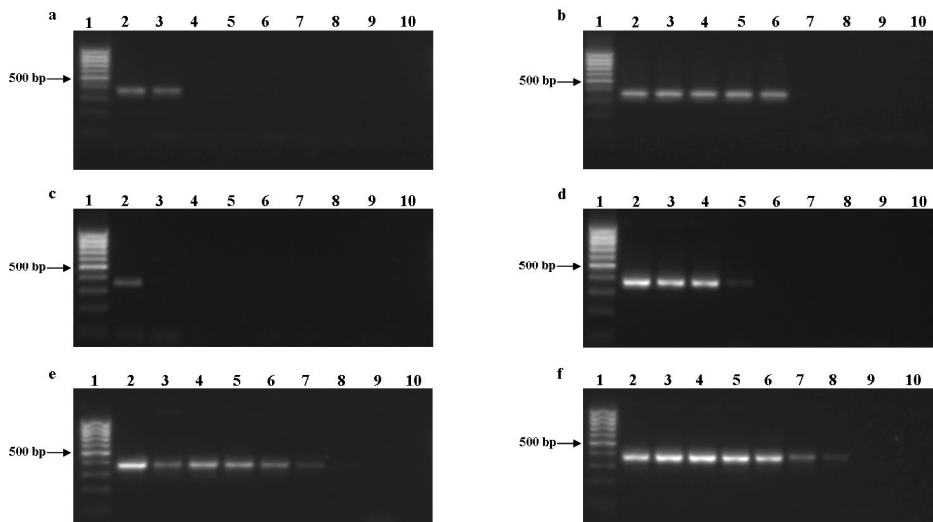
## **Results**

### **Evaluation of theoretical specificity and sensitivity of the 3 nested PCR assays**

Both the primers NprcA and NprcB showed a theoretical identity equal to 100% toward their respective target regions, whereas the values of identity between the primers BoitsA and BoitsB and their respective target regions were variable. All the DNA's extracted from reference strains or fungi isolated during this study, were successfully amplified with the universal primer set ITS5/ITS4. The primer sets NprcA/NprcB (*N. parvum*/*N. ribis* complex specific), BoitsA/BoitsB (Botryosphaeriaceae specific) and Pch1/Pch2 (Pch specific), always discriminated correctly between target and non target DNAs (Table 1). The theoretical sensitivity of the nested PCR assay with the primer set BoitsA/BoitsB when applied to the DNA in aqueous solution of *N. parvum* PVFi-Np9 was 1 pg (Fig. 2b), 3 dilution factors below the detection limit registered for this primer set when applied in single step PCR reaction (Fig. 2a). When DNA of *Spencermartinsia viticola* CBS117009, the species of Botryosphaeriaceae that among those considered had shown the lowest theoretical identity with the primers BoitsA and BoitsB, was used, the detection limit was 10 pg (Fig. 2d) and 10 ng (Fig. 2c) in nested and single step PCR, respectively. In the case of the NprcA/NprcB primer set the detection limit was 100 and 10 fg of the DNA of *N. parvum* PVFi-Np9 in nested and single step PCR, respectively (Figs. 2e and 2f). In the case of the Pch1/Pch2 primer set it was 1 pg and 100 fg of the

DNA of the strain PVFi-Pch36 in nested and single step PCR, respectively (data not shown).

**Fig. 2.** Theoretical sensitivity of the BoitsA/BoitsB (Botryosphaeriaceae specific) and NprcA/NprcB (*Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex specific) primer sets developed in this study. Single step PCR amplifications (**a** and **c**) and nested PCR amplifications (**b** and **d**) with the primer set BoitsA/BoitsB using the DNA of *N. parvum* strain PVFi-Np9 (**a** and **b**) or of *Spencermartinsia viticola* strain CBS 117009 (**c** and **d**). Single step PCR amplification (**e**) and nested-PCR amplification (**f**) with the primer set ParA/ParB using known quantities of the DNA of *Neofusicoccum parvum* strain PVFi-Np9. Lane 1: 1Kb Mass Ruler DNA Ladder Low Range (Fermentas); lanes 2 to 9: 10 ng to 1 fg of target DNA used as template; lane 10: PCR negative control.



### Isolation and characterization of the Botryosphaeriaceae and Pch

Fungal isolations from discoloured wood sampled from 5 standing vines indicated the presence of Botryosphaeriaceae and Pch-like morphotypes in all and four of the plants analyzed, respectively. Their overall frequencies of isolation were 51.8% and 18.5%, respectively (Fig. 3a), and both morphotypes could be isolated from 5.5% of the discoloured sampled. With the same analysis on discoloured and non-discoloured woody tissue samples from dgrc 2007, Botryosphaeriaceae-like morphotypes were isolated from only 12.5% of the samples of discoloured wood, while Pch-like morphotypes could never be isolated (Fig. 3b). Based on the sequence analysis of the ITS rDNA, 43

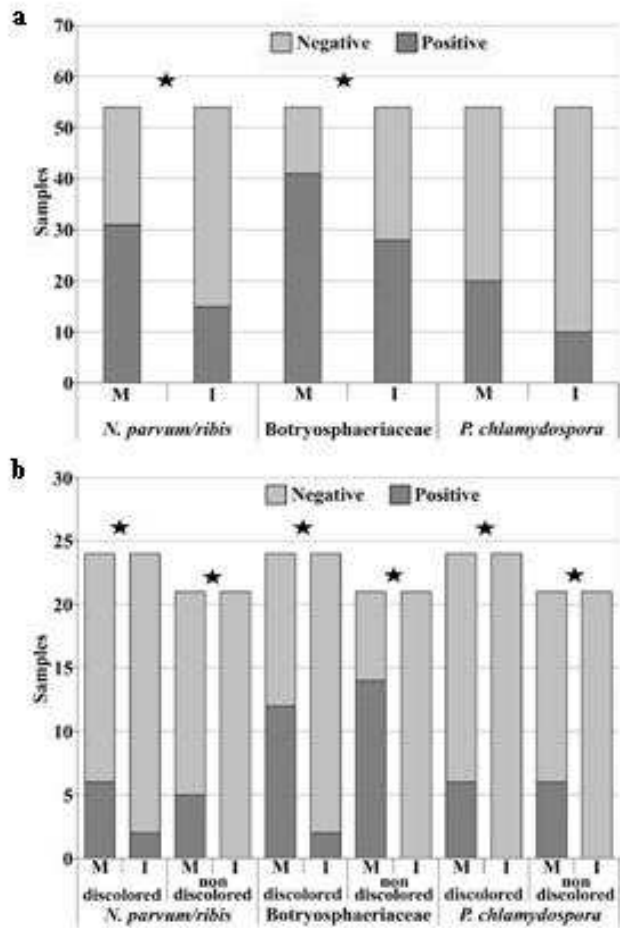
Botryosphaeriaceae monoconidial isolates were obtained from 28 wood discolourations of standing vines, of which 30 could be ascribed to *N. parvum*, 10 to *D. seriata* and 3 to *B. dothidea* (Table 1). Different species of Botryosphaeriaceae were isolated from the same plant but never together from the same sample of discoloured wood (data not shown). In the case of dgrc 2007, all three Botryosphaeriaceae monoconidial isolates analyzed were ascribed to *N. parvum* (Table 1). BT and EF1- $\alpha$  individual gene sequences, always confirmed the preliminary identification of all the *N. parvum* isolates. As a whole, two groups of sequences resulted for each one of the ITS (acc. numbers GU187981–GU188010) and EF 1- $\alpha$  (acc. numbers GU188011–GU188040) sequence analyses whereas BT sequences were identical for all the isolates (data not shown). Results of the partition homogeneity test indicated that there was no significant incongruence ( $P=0.133$ ) between the EF 1- $\alpha$  and ITS rDNA data sets, and when they were combined, the existence in the sampled material of 3 distinct phylogenetic groups of *N. parvum* were evident (Fig. 4). Two out of three phylogenetic groups were present both in standing vines and dgrc 2007 (Table 1, Fig. 4). In the case of standing vines, although the members of the three phylogenetic groups could be isolated from the same plant, they were never isolated together from the same wood discolouration (data not shown).

### **Evaluation of adequacy and reliability of the 3 nested-PCR assays to detect target DNA's in naturally infected samples**

With respect to fungal isolation, when the nested PCR assays were applied to the total DNA extracted from the naturally infected tissues, a significant increase in the frequency of detection of the different targeted organisms was always observed both in the case of standing vines (Fig. 3a) and of dgrc 2007 (Fig. 3b) independently, in this latter case, from the status (discoloured or non discoloured) of the sampled tissues. Evidence of the coexistence of DNA of different taxa within the same host tissues, was found when the result obtained for each sample by means of three independent PCR assays were crossed (Fig. 5). Considering as a whole 43 (standing vines) and 27 (dgrc 2007) samples whose DNA could be amplified by at least one of the three taxon-specific assays, 18.6% (standing vines) and 25.9% (dgrc 2007) were recorded as infected either by only Pch (samples that tested positive to only the Pch1/Pch2 assay) or only by species of the Botryosphaeriaceae other than those ascribable to the members of the *N. parvum/N. ribis* complex (samples that tested positive to only the BoitsA/BoitsB assay). None tested

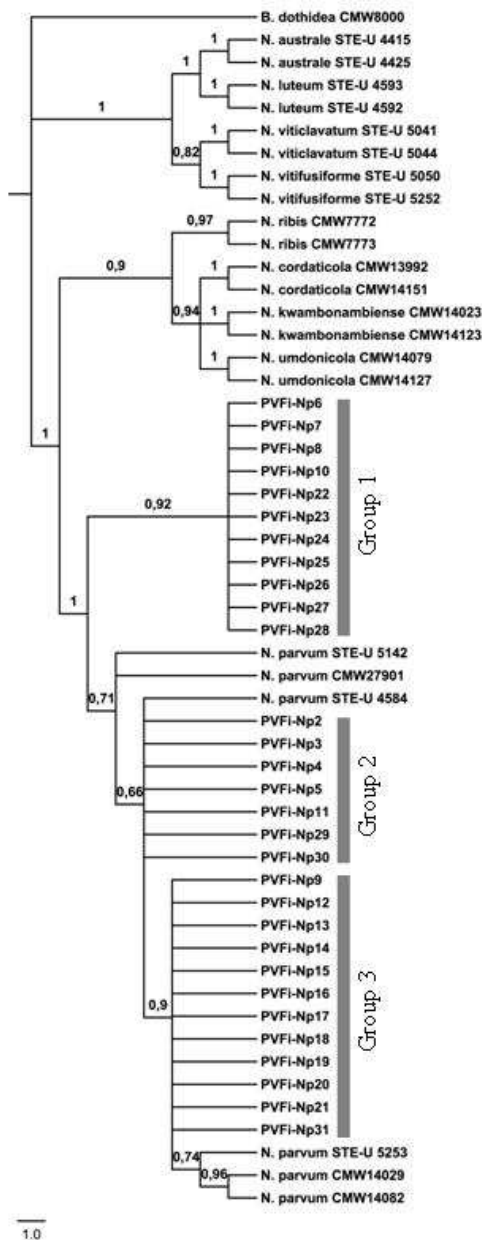
positive for the presence of only members of the *N. parvum/N. ribis* complex (none of the samples tested positive to only the NprcA/NprcB assay). The frequencies of recovery of samples that tested positive to two independent PCR assays were, 48.8% (standing vines) and 55.5% (dgrc 2007), which indicated that the DNA of Pch was present in the same samples together with that of Botryosphaeriaceae other than those ascribable to the *N. parvum/N. ribis* complex (samples that tested positive to both BoitsA/BoitsB and Pch1/Pch2 assays and negative to the NprcA/NprcB assay), but not together with that of only the *N. parvum/N. ribis* complex (none of the samples tested positive to both NprcA/NprcB and Pch1/Pch2 assays and negative to the BoitsA/BoitsB assay). Finally, 32.5% (standing vines) and 18.5% (dgrc 2007) of the samples tested positive to all three nested PCR assays. As the BoitsA/BoitsB primer set may also amplify the DNA of the members of the *N. parvum/N. ribis* complex, further analyses were carried out in order to evaluate how frequently the samples that tested positive to both the BoitsA/BoitsB and NprcA/NprcB independent assays, were infected by different Botryosphaeriaceae. To do so, we estimated the frequency of occurrence of the DNA of members of the *N. parvum/N. ribis* complex together with that of other Botryosphaeriaceae by means of sequence analysis of 20 amplicons produced by means of the BoitsA/BoitsB assay (Fig. 6a) whose DNA templates (10 extracted from standing vines and 10 from dgrc 2007) had tested positive also to the NprcA/NprcB assay (Fig. 6b). Chromatograms of good quality were obtained in 18 out of 20 cases (two chromatograms could not be used given the presence of more than one sequence) and the comparisons of the derived nucleotide sequences with the INSD database showed that in only one case (standing vines) the BoitsA/BoitsB primer set had amplified the DNA of *N. parvum*. The result of the phylogenetic analysis (Fig. 7a) confirmed that DNA of *D. seriata* (8 out of 9 samples from standing vines and 5 out of 9 samples from dgrc 2007) and of *B. dothidea* (4 samples out of 9 from dgrc 2007) were present together with that of *N. parvum/N. ribis* complex as the NprcA/NprcB assay had indicated and the sequencing and phylogenetic analyses of 8 of the amplicons produced (4 from standing vines and 4 from dgrc 2007), confirmed (Fig. 7b).

**Fig. 3.** Detection of *N. parvum*/*N. ribis*, Botryosphaeriaceae and *P. chlamydospora* in naturally infected woody tissues samples by means of 3 independent nested-PCR specific assays (M) and direct fungal isolation (I). In the case of standing vines (**a**), the samples subjected to analysis were taken only from discoloured woody tissues, meanwhile in the case of the dgrc 2007 (**b**) both from discoloured and non discoloured woody tissues. An asterisk above a pair of vertical bars indicates a statistically significant differences ( $P \leq 0.05$ ) in the frequencies of positive samples between detection methodologies, based on a “Fisher-Freeman-Halton” exact test analysis.





**Fig. 4.** Bayesian consensus phylogram (15002 sampled trees) reconstructed from the concatenated ITS-rDNA and EF1- $\alpha$  data sets of 30 *N. parvum* strains isolated in this study from standing vines and dgrc 2007. Support values are posterior probabilities (the probability that the clade is correct, given the data and the model parameters). The tree was rooted to *B. dothidea* strain CMW8000 (acc. numbers: AY236949, AY236927). The bar represents 0.008 changes. The presence of 3 different phylogenetic groups within the isolated strains is highlighted with grey bars.



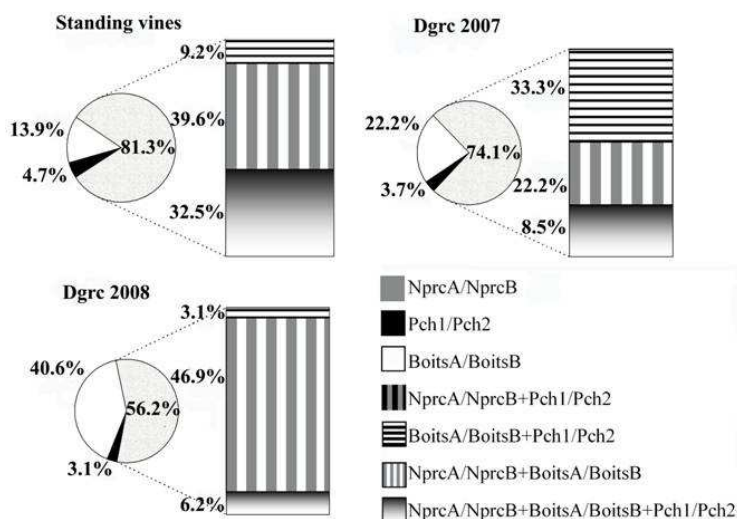
### **Epidemiological survey on plants of commerce**

The result of the epidemiological survey carried out in 2008 on the pooled samples of woody tissues from 13 lots of dgrc (Fig. 8), revealed, as a whole, the presence of DNA of *N. parvum/N. ribis* complex, Botryosphaeriaceae, and Pch in 10 (Fig. 8a), 12 (Fig. 8b) and 4 (Fig. 8c) of them, respectively. Moreover, considering the results of each independent PCR assay, the only frequencies of detection that were found to be different were those relative to the *N. parvum/N. ribis* DNA (NprcA/NprcB assay) between different nurseries ( $P= 0.000$ ) and to the Botryosphaeriaceae DNA (BoitsA/BoitsB assay) between the different lots of dgrc 2008 produced by nursery A ( $P=0.004$ ). Nevertheless, when the observed detection frequency of each of the 13 lots were compared in the same analysis, they were not significant ( $P=0.074$ ,  $P=0.105$  and  $P=0.424$  for the BoitsA/BoitsB, NprcA/NprcB and Pch1/Pch2 assays, respectively).

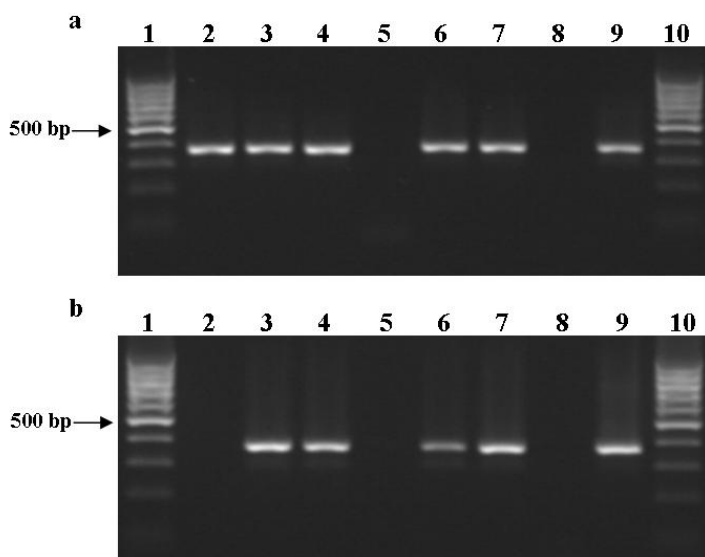
In a total of 50 samples analyzed, 32 tested positive to at least one of the 3 nested PCR assays (Fig. 5). Of these 3.1% were found to be infected only by Pch (samples that tested positive to only the Pch1/Pch2 assay) meanwhile 40.6 % were infected only by species of Botryosphaeriaceae other than those ascribable to the *N. parvum/N. ribis* complex (samples that tested positive to only the BoitsA/BoitsB assay). None were positive for the presence of only the *N. parvum/N. ribis* complex (none of the samples were positive to only the NprcA/NprcB assay). Fifty percent of the samples tested positive to two independent assays, of which 3.1 % tested positive to the BoitsA/BoitsB and Pch1/Pch2 assays and 46,9% to both the NprcA/NprcB and BoitsA/BoitsB assays. Finally, only 6,2% of the samples that could be scored as naturally infected, were positive to all the 3 nested PCR assays. Of the 20 amplicons obtained with the BoitsA/BoitsB assay that were subjected to sequencing, only 1 chromatogram could not be used on account of the presence of more than one sequence. The results of sequencing and phylogenetic analysis indicated that in 16 out of 19 samples examined DNA of the *N. parvum/N. ribis* complex was present together with that of other Botryosphaeriaceae (*D. seriata*, 9 samples out of 19; *B. dothidea* 6 samples out of 19; *Dothiorella sarmentorum* 1 samples out of 19). Meanwhile in 3 cases out of 19 the 2 assay both detected the same type of DNA (Figs. 7a and 7b). Finally, the presence of both *Diplodia mutila* and *Neofusicoccum australe* (BoitsA/BoitsB assay) DNA, together with that of

members of the *N. parvum*/*N. ribis* complex could be detected in the cane samples collected from *V. vinifera* subsp. *sylvestris* (Figs. 7a and 7b).

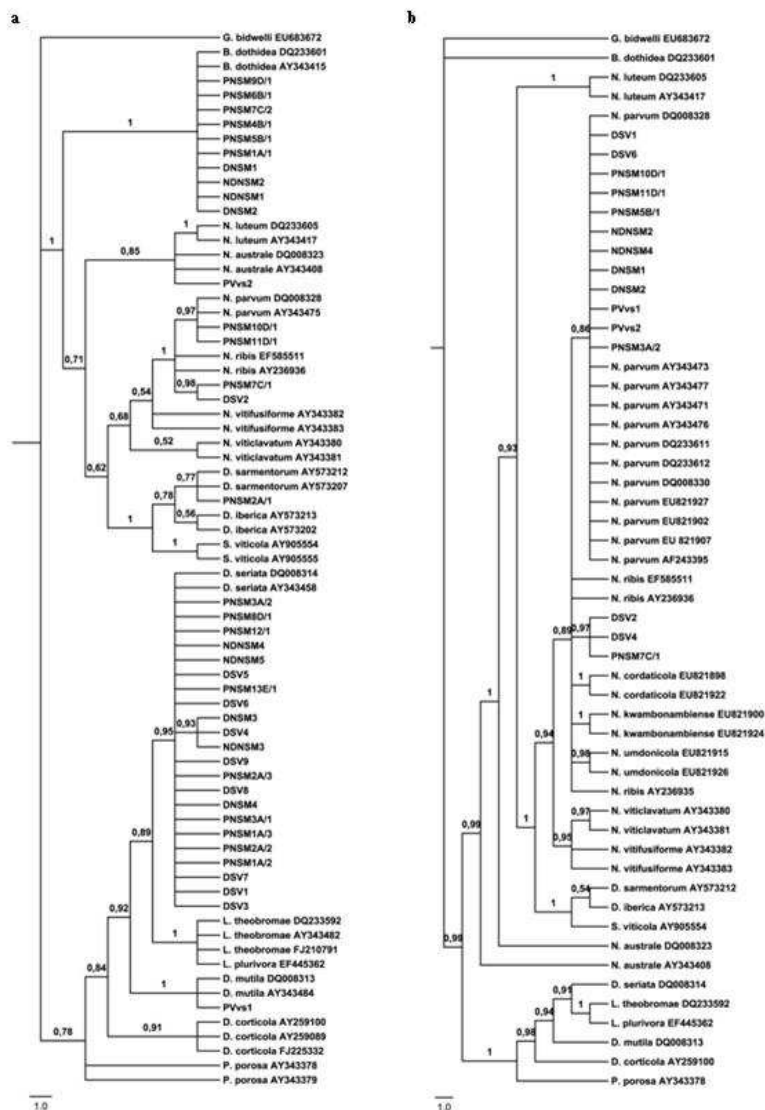
**Fig. 5.** Frequencies of detection of naturally infected grapevine tissues samples that tested positive to only one, two or to all three primers sets (NprcA/NprcB; BoitsA/B; Pch1/Pch2) used in this study.



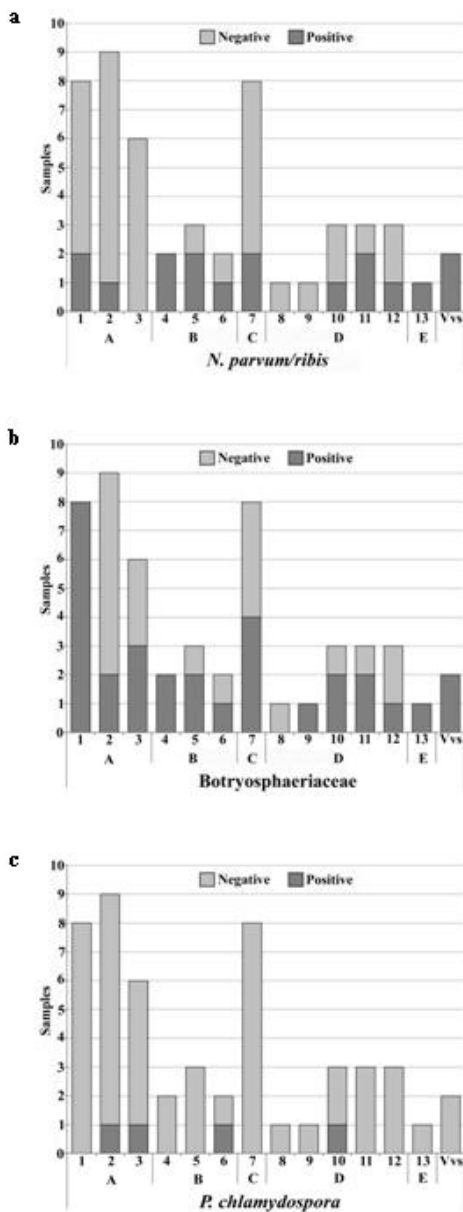
**Fig. 6.** Results of the amplifications obtained with the BoitsA/BoitsB (a) and the NprcA/NprcB (b) assays. Total DNA was extracted from discoloured woody tissues of standing vines and nursery stock material (dgrc 2007) and from pooled woody tissues of nursery stock material (dgrc 2008). Lane 1 and 10: 1Kb Mass Ruler DNA Ladder low range (Fermentas); lanes 2, 3: standing vines; lanes 4, 5: dgrc 2007; lanes 6, 7: dgrc 2008; lane 8: PCR negative control; lane 9: *N. parvum* strain PVFi-Np9.



**Fig. 7.** Bayesian consensus phylograms (15002 sampled trees) reconstructed from the portions of the ITS1-5.8-ITS2 nucleotide sequences amplified, from the total DNA extracted from 39 (a) and 15 (b) grapevine samples of different origin, by means of nested PCR using the BoitsA/BoitsB (a) or the NprcA/NprcB (b) assays, respectively. Support values are posterior probabilities (the probability that the clade is correct, given the data and the model parameters). The tree was rooted to *Guignardia bidwelli* strain CBS 111645 (EU683672). The bars represent 0.9 (a) and 1.0 (b) changes. Origin of DNA samples: DSV, discoloured woody tissues from standing vine; NDNSM, non discoloured woody tissues from nursery stock material; DNSM, discoloured woody tissues from nursery stock material; PNSM, pooled woody tissues from nursery stock material; PVVs, pooled woody tissues from *V. vinifera* subsp. *sylvestris* canes.



**Fig. 8.** Detection of *N. parvum*/*N. ribis* (a), Botryosphaeriaceae (b) and *P. chlamydospora* (c) in naturally infected woody tissues samples by means of 3 independent nested-PCR specific assays. From 1 to 9 of pooled samples of woody tissues were taken from each of thirteen lots (1-13) of dgrc produced by 5 nurseries (A, B, C, D and E) in 2008 and from canes of *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (Vvs). An asterisk above a pair of vertical bars indicates a statistically significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between lots, based on a “Fisher-Freeman-Halton” exact test analysis.



## Discussion

In this study two molecular protocols for the detection of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine plants were performed. One allowed the identification of the DNA of the *N. parvum*/*N. ribis* complex (*N. parvum* is one if not the most aggressive Botryosphaeriaceae species on grapevine), the other the DNA of all the 16 Botryosphaeriaceae species up to now isolated from grapevines. The two protocols plus one specific for Pch (Edwards et al. 2007), the main agent of the grapevine leaf stripe disease (ex esca) and of Petri disease (Surico 2009), usually found associated with Botryosphaeriaceae species in diseased grapevine plants (Aroca et al. 2006; Martin and Cobos, 2007), proved to be efficient, sensitive and reliable when used with naturally infected grapevine materials, thus demonstrating the usefulness of the detection method for rapid and accurate assessment of tissue infection/contamination by Botryosphaeriaceae species and Pch. Results obtained allowed some interesting considerations, both of practical and basic importance that may be relevant in studying the epidemiology of Botryosphaeriaceae fungi.

Up to now comparisons of sequence data for the ITS-rDNA region, alone or supported by sequence data from different loci, have been used to analyse inter and intra specific relationships in the Botryosphaeriaceae (Slippers et al. 2004; Crous et al. 2006; Phillips et al. 2008; Pavlic et al. 2009a). Nevertheless when the type specimens of *N. parvum* and *N. ribis* were considered in the same phylogenetic analysis, nucleotide sequence data from three gene regions were necessary to separate the two taxa (Slippers et al. 2004). In subsequent studies, when more isolates from different hosts and/or locations were considered, many did not cluster clearly with either of these species (Farr et al. 2005; Slippers et al. 2005; Pavlic et al. 2007). In recent years *N. parvum* and *N. ribis* have been alternatively considered as *sensu lato* groups (Slippers 2003), one species (Sakalidis 2004), and as a species complex to which three new cryptic species have been recently ascribed (Pavlic et al. 2009a, 2009b). At present in Italy the distribution of the different Botryosphaeriaceae species in grapevine as well as their degree of intra specific variability, is yet to be determined. A recent survey carried out in Apulian vineyards showing esca symptoms (Carlucci et al. 2009) revealed that, on the whole, at least 9 species of Botryosphaeriaceae, including, *N. parvum*, could be isolated from brown discoloured wood. Moreover, in our restricted survey of just 5 plants in a Tuscan vineyard, at least 3 distinct phylogenetic groups of *N. parvum* could be detected, suggesting that on a regional or national scale a greater level of heterogeneity is likely to

exist. Given the background, the nested PCR NprcA/NprcB assay performed can at the same time discriminate within the heterogenic pool of different Botryosphaeriaceae and cover the variability that it is known to exist within the *N. parvum*/*N. ribis* complex. As a matter of fact the analysis of the material under study the DNA of fungi belonging to *N. parvum*/*N. ribis* complex was detected in 2 of the 4 lots of nursery stock material examined in 2007 and in 10 of the 13 examined in 2008.

Another question that arises after examining data collected worldwide (van Niekerk et al. 2004; Taylor et al. 2005; Úrbez-Torres et al. 2006; Savocchia et al. 2007), is how frequently the different Botryosphaeriaceae that are involved in grapevine trunk disease, may colonize the same plant or, possibly, the same tissues. If we assume that “organisms are not equal” (Hubbell 2001; Whitfield 2002), then if it was shown that different Botryosphaeriaceae routinely co-exist within the same tissues, then they are the causal agents of different diseases, or their respective interactions with the host, have to be somehow different. This hypothesis is indirectly supported by the results of pathogenicity tests recently carried out in France and Portugal in which several strains of different Botryosphaeriaceae isolated from different geographical regions were used (Laveau et al. 2009; Rego et al. 2009); for all the species considered, aggressiveness was highly variable between isolates. To this regard the Botryosphaeriaceae specific nested PCR BoitsA/BoitsB assay allowed us to evaluate the extent of the phenomenon of co-occurrence of the DNA of the *N. parvum*/*N. ribis* complex together with that of the different Botryosphaeriaceae that cause wood diseases within the same tissues. When the amplicons produced by the BoitsA/BoitsB and NprcA/NprcB assays using as template the DNA samples that had tested positive to both, were sequenced and analyzed, the overall results indicated that most likely the DNA of *D. seriata* (59.5 %), *B. dothidea* (27 %) *D. sarmentorum* (2.7 %) in the cases of nursery stock samples and *Vitis vinifera* standing vines, and *D. mutila* and *N. australe* in the case of *V. vinifera* subsp. *sylvestris*, were present together with that of *N. parvum*. All these species, as well as *N. parvum*, have been isolated in the past from vines showing symptoms of decline (van Niekerk et al. 2004; Úrbez-Torres et al. 2006; Martin and Cobos 2007), and the results of pathogenicity tests have shown that they may cause brown streaking and necrosis of the wood (Larignon et al. 2001; van Niekerk et al. 2004; Taylor et al. 2005; Savocchia et al. 2007; Úrbez-Torres and Gubler 2009). *Diplodia mutila*, *D. seriata* e *N. parvum* are also considered the causal agents of a form of black dead arm reported in France (Larignon et al. 2009), characterized by foliar symptoms resembling those of esca (Surico et al. 2006;

Larignon et al. 2001, 2009). In conclusion, this study indicates that PCR amplification of the DNA of the organisms within the *N. parvum/N. ribis* complex with the ITS-rDNA derived NprcA/NprcB primer set is a sensitive and specific method for detection of these potentially phytopathogenic fungi. Our data have clearly demonstrated that these techniques offer considerable advantages over culture-dependent detection in terms of time, reproducibility, low detection limits, and costs. Thus it may be useful for the early detection of low levels of infection of nursery stock material or epidemiological studies. Moreover, by examining plants of commerce released by different nurseries in different years, we have shown that nursery stock material plays a primary role as source of inoculum of *N. parvum* and perhaps of other species of the complex, but also of other Botryosphaeriaceae that can cause grapevine decline and dieback, as well as Pch. Very recently, Aroca et al (2009) reported for the first time another Botryosphaeriaceae species from rootstock mother vines in Spain, named *Neofusicoccum mediterraneum*. Nevertheless, given the existence of remarkable levels of variability also in terms of virulence within each taxon, then it becomes clear that only by unraveling at molecular level the nature of their determinants of virulence, it will become possible to assess if an open Pandora box is currently threatening viticulture .

### **Acknowledgements**

Research study was commissioned from ARSIA-Toscana (Regional Agency for Development and Innovation in Agriculture and Forestry) by fourteen administrative Regions and autonomous province, and financed with funds provided by the Ministero per le Politiche Agricole e Forestali (Ministry for Agricultural and Forestry Policy) to implement the inter-Regional Project “Grapevine esca: research and experiment in the nursery and in the field for prevention and cure”.

Thanks are due to all nurseries and the Stazione Sperimentale per la Viticoltura Sostenibile S.r.l. of Gaiole in Chianti (Siena, Italy) for their collaboration and for generously providing the propagation material that was used in this work, and the WWF of the Burano Lake Conservation Area (Grosseto, Italy) for allowing us to sample *V. vinifera* subsp. *sylvestris* plants.

A. Phillips was financed by grant number SFRH/BCC/15810/2005 from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) Portugal and project number PPCDT/AGR/56140/2004 from FCT.

Authors would like to thank Prof. Marlene Jaspers, Dr. Jordi Luque, Prof. Sandra



**Capitolo 5.** Detection of Botryosphaeriaceae within grapevine woody tissues by nested PCR, with particular emphasis on the *N. parvum*/*N. ribis* complex

Savocchia and Dr. José Ramon Úrbez-Torres, who kindly provided some fungal strains.



## **CAPITOLO 6**

### **Conclusioni**

In questo lavoro di tesi è stato affrontato con approccio olistico il complesso e variegato problema delle Botryosphaeriaceae che si rinvencono nel legno di vite e si è anche cercato di raccogliere elementi volti a chiarire il possibile coinvolgimento di questi funghi nella più nota malattia del mal dell'esca o malattia delle foglie tigrate (Grapevine leaf stripe disease), nome, quest'ultimo, di recente proposto da Surico (2009) per la sindrome tracheomicotica del complesso esca. In particolare, dopo la caratterizzazione di 43 ceppi ottenuti da un vigneto della provincia di Firenze e da barbatelle prodotte da un vivaio della stessa zona, una selezione di questi è stata utilizzata in saggi di patogenicità effettuati sia su piante adulte che su barbatelle. I rilievi relativi hanno riguardato la formazione di imbrunimenti nel legno e la comparsa di sintomi fogliari, eventualmente riconducibili a quelli della "Grapevine leaf stripe disease". Inoltre, gli stessi ceppi utilizzati nelle prove di patogenicità sono stati saggiati anche per la produzione di alcuni enzimi che, in patogeni conclamati, sono apparsi talvolta legati alla loro virulenza e/o alla capacità di progredire nell'ospite. Infine, con lo scopo di acquisire maggiori informazioni riguardanti la diffusione di questi funghi nel legno di vite, sono stati approntati due protocolli molecolari per la diagnosi, rispettivamente, di *Neofusicoccum parvum* (e delle specie strettamente correlate) e di tutte le 17 specie, compresa *N. parvum*, ad oggi rinvenute nel legno delle piante di vite.

L'applicazione dei protocolli molecolari ha permesso di individuare le specie di Botryosphaeriaceae maggiormente presenti nel legno di piante di vite in Toscana e in barbatelle provenienti da cinque diversi vivai, quattro italiani e uno francese. In particolare, la specie più presente, sia in piante adulte che nel materiale di propagazione, è risultata *N. parvum*. Più occasionale è risultata invece la presenza di *Botryosphaeria dothidea* e *Diplodia seriata*, così come di *P. chlamydospora*. Questi risultati sono stati supportati anche da quelli relativi all'isolamento diretto da tessuti alterati e/o apparentemente sani. Infatti, la caratterizzazione dei 43 isolati, 40 ottenuti da piante adulte e 3 da barbatelle, hanno permesso di identificare 3 ceppi di *Botryosphaeria dothidea*, 10 di *Diplodia seriata* e 30 di *N. parvum*. L'abbondante presenza di *N. parvum*, ritenuta tra le Botryosphaeriaceae più virulente su vite, indica che lo stato fitosanitario dei vigneti toscani potrebbe essere molto più preoccupante di quanto si pensasse in precedenza. Recentemente, *N. parvum* è stata ritrovata anche nei vigneti pugliesi (Carlucci *et al.*, 2009), ma, a differenza di quanto osservato nel presente lavoro, Carlucci e colleghi hanno ritrovato altre 8 specie di Botryosphaeriaceae, comprese *B. dothidea* e *D. seriata*, associate ad alterazioni del legno di piante che presentavano i

sintomi fogliari tipici della malattia delle foglie tigrate. Le motivazioni di tale differenza potrebbero essere date dal fatto che nel lavoro di Carlucci *et al.* sono state probabilmente esaminate più piante provenienti da diversi vigneti. Non sono poi da sottovalutare la diversa origine del materiale di propagazione; il loro diverso stato fitosanitario e, non ultimo, le diverse caratteristiche climatiche delle due regioni, dalle quali potrebbe essere dipeso l'insediamento di più specie nei vigneti pugliesi.

L'analisi filogenetica relativa ai ceppi di *N. parvum*, basata sulle sequenze ITS, BT e EF 1- $\alpha$ , ha indicato la presenza di 3 gruppi filogenetici. Tuttavia, le differenze osservate tra i 3 gruppi non sono state ritenute sufficienti per considerarli appartenenti a 3 diverse specie. Piuttosto, tali differenze hanno evidenziato che i tre gruppi sono probabilmente rappresentati da ceppi di *N. parvum* che si stanno evolvendo separatamente, confermando l'esistenza della variabilità osservata tra i componenti del complesso *N. parvum/N. ribis* (Pavlic *et al.*, 2009a). Inoltre, i risultati dell'analisi morfologica, sebbene abbiano evidenziato una generale minore lunghezza dei conidi rispetto a quella tipica (Phillips, 2002), hanno comunque confermato che tutti presentano le caratteristiche morfologiche attribuibili a questa specie e che le differenze morfometriche osservate tra i ceppi PVFi-Np, non correlate con l'appartenenza ad un particolare gruppo filogenetico, rappresentano una caratteristica già osservata per *N. parvum*, così come per gli altri componenti del "*N. parvum/N. ribis* complex" (Pavlic *et al.*, 2009a).

Le differenze osservate a livello molecolare tra i ceppi di *N. parvum* non hanno avuto alcun riscontro con i saggi di patogenicità. In particolare, in quelli riguardanti le piante adulte, non solo non sono state osservate sostanziali differenze di virulenza, in termini di entità di alterazioni del legno, ma l'elevata variabilità tra le repliche di ogni inoculo non ha permesso nemmeno di quantificare, in maniera inequivocabile, eventuali differenze di virulenza tra le specie. Questo risultato è in disaccordo con quelli ottenuti in altri studi, nei quali, sebbene sia stata osservata una elevata variabilità tra ceppi della stessa specie, è stato comunque possibile compilare delle graduatorie di virulenza riferite ai diversi taxa. Un esempio è rappresentato dal lavoro di Laveau *et al.* (2009), in cui la specie più virulenta si è rivelata *P. chlamydospora*, seguita da *N. parvum* e da *P. aleophilum*. Riguardo ai risultati ottenuti nel presente lavoro, sembra invece che essi siano stati influenzati più dalla risposta della singola pianta che dalla presenza di un particolare inoculo artificiale. In accordo con i risultati della maggior parte di altri studi è invece apparso lo sviluppo di sintomi fogliari, non osservati né sulle piante adulte né sulle

barbatelle. Solo in seguito ad un recente lavoro condotto in Portogallo da Rego *et al.* (2009) infatti, sono stati riportati sintomi fogliari su barbatelle inoculate con specie di Botryosphaeriaceae, sebbene tali sintomi non siano stati specificati.

I saggi enzimatici hanno indicato che molti dei ceppi di Botryosphaeriaceae utilizzati sono capaci di produrre enzimi che favoriscono la loro progressione nei tessuti della pianta ospite, come poligalatturonasi o pectina esterasi, e altri utili per la degradazione di macromolecole organiche, come  $\beta$ -1,4-glicosidasi o endo-1,4- $\beta$ -glucanasi. Sebbene la verifica della presenza di tali enzimi non sia sufficiente a provare la virulenza di questi funghi, la loro produzione, osservata in altri patogeni conclamati (Mugnai *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2006) avvalorerebbe, in qualche modo, l'attitudine fitopatogena delle specie esaminate e il loro coinvolgimento in malattie del legno della vite. Fatta eccezione per la capacità di degradazione dell'acido tannico, risultata associata ad un singolo gruppo filogenetico dei 3 di *N. parvum*, la produzione degli altri enzimi saggiati non è apparsa essere correlata ad un particolare gruppo filogenetico di questa specie. Inoltre, a parte alcuni enzimi come poligalatturonasi, pectina esterasi,  $\beta$ -1,4-glicosidasi o endo-1,4- $\beta$ -glucanasi, prodotti dalla maggior parte dei ceppi di Botryosphaeriaceae saggiati, la produzione di altri enzimi è risultata molto variabile da ceppo a ceppo. Ciò potrebbe, in un caso diminuire il ruolo, ai fini della patogenicità/virulenza, di questi enzimi, oppure essere interpretato come la dimostrazione, indiretta, di quella grande variabilità della patogenicità/virulenza riscontrata da diversi autori fra le popolazioni di Botryosphaeriaceae (Laveau *et al.*, 2009; Rego *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda la malattia delle foglie tigrate e di un possibile coinvolgimento delle Botryosphaeriaceae nella sua eziologia si pensa che all'origine dei sintomi fogliari ci sia essenzialmente la produzione di fitotossine da parte dei due principali funghi che per ora ne sono considerati la causa, *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*. Tali fitotossine (scitalone, isosclerone e polisaccaridi complessi), trasportati dalla corrente linfatica, si accumulerebbero nelle foglie provocando i noti sintomi. Tuttavia, in opposizione a precedenti osservazioni del gruppo di lavoro di Bruno e Sparapano (2007b), nelle foglie di vite è stata rilevata la presenza dei soli polisaccaridi (Calamai *et al.*, 2009). Inoltre, polisaccaridi fitotossici si è visto essere prodotti anche da *N. parvum* (Martos *et al.*, 2008). Si aggiunga che specie di Botryosphaeriaceae, come hanno dimostrato questo lavoro di tesi e altri, sono molto presenti nel legno di vite, tanto quanto *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*, e che talvolta esse si trovano associate a questi ultimi due funghi, così come confermato per *P. chlamydospora* e specie di

Botryosphaeriaceae con i metodi molecolari sviluppati in questo lavoro. Questi elementi, certamente non sono sufficienti per sostenere un coinvolgimento delle Botryosphaeriaceae nell'eziologia della malattia delle foglie tigrate della vite, ma lasciano tuttavia aperta la via a maggiori approfondimenti inseguendo l'ipotesi che la tigratura fogliare nel complesso esca sia determinata, non da uno specifico fungo, ma dall'accumulo nelle foglie di una congerie di sostanze proveniente da patogeni diversi.

## Bibliografía

- Alves, A., Correia, A., Luque, J., & Phillips, A. J. L. (2004). *Botryosphaeria corticola* sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph *Diplodia mutila*. *Mycologia*, 96, 598–613.
- Alves, A., Phillips, A. J. L., Henriques, I., & Correia, A. (2005). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. *FEMS Microbiology Letters*, 245, 221–229.
- Alves, A., Phillips, A. J. L., Henriques, I., & Correia, A. (2007). Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology*, 158, 112–121.
- Alves, A., Crous, P.W., Correia, A., & Phillips A. J. L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*, 28, 1–13.
- Aroca, A., García-Figueres, F., Bracamonte, L., Luque, J., & Raposo, R. (2006). A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 195–202.
- Aroca, A., Raposo, R., Gramaje, D., Armengol, J., Marius, S., & Luque, J. (2008) First report of *Lasiodiplodia theobromae* associated with decline of grapevine rootstock mother plants in Spain. *Plant Disease*, 92, 832–832.
- Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J., & Raposo, R. (2009). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoconiella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*.
- Auger, J., Esterio, M., & Pérez, I. (2004). First report of *Phaeoconiella chlamydospora* on *Vitis vinifera* and French American Hybrids in Chile. *Plant Disease*, 88, 1285.
- Barr, M. E. (1987). Prodomus to the class Loculoascomycetes. Published by the author, Amherst, MA.
- Bester, W. & Fourie, P. H. (2005). Fungicide sensitivity of selected *Botryosphaeria* species from grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 44, 119.
- Bester, W., Crous, P. W., & Fourie, P. H. (2007). Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology*, 36, 73–77.



- Binz, T., & Canevascini, G. (1996). Xylanases from the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49, 159–175.
- Blodgett, J. T., & Stanosz, G. R. (1995). *Sphaeropsis sapinea* and host water stress in a red pine plantation in central Wisconsin. *Phytopathology*, 85, 1044.
- Bradoo, S., Gupta, R., & Saxena, R. K. (1997). Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochemistry*, 32, 135–9.
- Bruno, G., & Sparapano, L. (2005). Degradazione di resveratrolo e acido tannico da parte di *Phaeoconiella chlamydozoora*, *Phaeoconium aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea*, funghi associati al mal dell'esca della vite. *Micologia Italiana*, 33, 34–52.
- Bruno, G., & Sparapano, L. (2007a). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69, 182–194.
- Bruno, G., & Sparapano, L. (2007b). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: II. Characterization of biomolecules in xylem sap and leaves of healthy and diseased vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69, 195–208.
- Burr, T. J., & Otten, L. (1999). Crown gall of grape: biology and disease management. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 53–80.
- Burruano, S., Mondello, V., Conigliaro, G., Alfonzo, A., Spagnolo, A., & Mugnai, L. (2008). Grapevine decline in Italy caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytopathologia Mediterranea* 47, 132–136.
- Calamai, L., Mattii, G. B., Mugnai, L., & Surico, G. (2009). Physiological alterations in esca-diseased vines and the detection of scytalone and isosclerone in the tiger-striped vine leaves. *Phytopathologia mediterranea*, 49, 168.
- Carlucci, A., Lops, F., Raimondo, M. L., Gentile, V., Mucci, M., & Frisullo S. (2009). The *Botryosphaeria* species from vineyards of Apulia. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 180.
- Carter, M. V. & Price, T. V. (1974). Biological control of *Eutypa armeniacae* 2. Studies of the interaction between *E. armeniacae* and *Fusarium lateritium* and their

- relative sensitivities to benzimidazole chemicals. *Australian Journal of Agricultural Research*, 25, 105–119.
- Carter, M. V. (1991). Eutypa dieback. (In R. C. Pearson & A. C. Goheen (Eds.), *Compendium of Grape Diseases*, (pp.32–34). St. Paul: APS PRESS, The American Phytopathological Society).
- Casieri, L., Hofstetter, V., Viret, O., & Gindro, K. (2009). Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 73–83.
- Castillo-Pando, M., Somers, A., Green, C. D., Priest, M. & Sriskanthades, M. (2001). Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. *Australasian Plant Pathology*, 30, 59–63.
- Chen, W. Q., Morgan, D. P., Felts, D., & Michailides, T. J. (2003). Antagonism of *Paenibacillus lentimorbus* to *Botryosphaeria dothidea* and biological control of panicle and shoot blight of pistachio. *Plant Disease*, 87, 359–365.
- Choueiri, E., & Jreijiri, F. (2006) Occurrence of grapevine declines and first report of black dead arm associated with *Botryosphaeria obtusa* in Lebanon. *Plant Disease*, 90, 115.
- Conesa, A., Van Den Hondel, C., & Punt, P. (2000). Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3016–3023.
- Copes, W. E., & Hendrix, F. F. Jr., (2004). Effect of temperature on sporulation of *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtusa* and *B. rhodina*. *Plant Disease*, 88, 292–296.
- Cristinzio, G. (1978). Gravi attacchi di *Botryosphaeria obtusa* su vite in provincia di Insernia. *Informatore Fitopatologico* 6, 21–23.
- Crous, P. W., Gams, W., Wingfield, M. J., & van Wyk, P. S. (1996). *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia*, 88, 786–796.
- Crous, P. W., & Gams, W. (1999). *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et. comb. nov., the causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 112–118.
- Crous, P. W., & Palm, M. E. (1999). Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *Sydowia*, 51, 167–175.

- Crous, P. W., Denman, S., Taylor, J. E., Swart, L., & Palm, M. E. (2004). Cultivation and diseases of Proteaceae: Leucadendron, Leucospermum and Protea. *CBS Biodiversity Series*, 2, 1–228.
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Phillips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. & Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55, 235–253.
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., & Phillips, A. J. L. (2007). *Neofusicoccum mediterraneum*. *Fungal Planet*, 19.
- Damm, U., Crous, P. W. & Fourie, P. H. (2007). Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodyplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia*, 99, 664–680.
- De Wet, J., Burgess, T., Slippers, B., Preisig, O., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2003). Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycological Research*, 107, 557–566.
- Decoin, M. (2001). Grapevine products: news on withdrawals and restrictions. *Phytoma*, 543, 28–33.
- Denman, S, Crous, P. W., Taylor, J. E., Kang, J-C., Pascoe, I., & Wingfield, M. J. (2000). An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, 45, 129–140.
- Durrands, P. K., & Cooper, R. M. (1988). Selection and characterization of pectinase-deficient mutants of the vascular wilt pathogen *Verticillium albo-atrum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 32, 343–362.
- Edwards, J., Constable, F., Wiechel, T., & Salib, S. (2007). Comparison of the molecular tests-single PCR, nested PCR and quantitative PCR (SYBR<sup>®</sup>Green and TaqMan<sup>®</sup>) for detection of *Phaeoemoniella chlamydospora* during grapevine nursery propagation. *Phytopathologia Mediterranea*, 46, 58–72.
- Farr, D. F., Elliott, M., Rossman, A. Y., & Edmonds, R. L. (2005). *Fusicoccum arbuti* sp. nov. causing cankers on Pacific madrone in western North America with notes on *Fusicoccum dimidiatum*, the correct name for *Scytalidium dimidiatum* and *Nattrassia mangiferae*. *Mycologia*, 97, 730–741.

- Ferreira, J. H. S., Matthee, F. N. & Thomas, A. C. (1991). Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, *81*, 283–287.
- Fischer, M., (2002). A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress* *1*, 315–324.
- Fourie, P. H., & Halleen, F. (2003). Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology*, *32*, 47–52.
- Fourie, P. H., & Halleen, F. (2004). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, *33*, 313–315.
- Fourie, P. H., & Halleen, F. (2005). Integrated strategies for pro-active management of grapevine trunk diseases in nurseries. *Phytopathologia Mediterranea*, *44*, 111.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N., & Hickey, D. A. (2007). DNABarcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, *23*, 167–172.
- Halleen, F., Crous P. W., & Petrini, O. (2003). Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology*, *32*, 47–52.
- Hewitt, W. B. (1988). Diplodia Cane Dieback and Bunch Rot. (In R. C. Pearson & A. C. Goheen (Eds.), *Compendium of Grape Diseases*, (pp.25–26). St. Paul: APS PRESS, The American Phytopathological Society).
- Hubbell, S. P. (2001). *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography*. (Princeton: Princeton University Press).
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, *17*, 754–755. DOI 10.1093/bioinformatics/17.8.754.
- John, S., Scott, E. S. Wicks, T. J. & Hunt, J. S. (2004). Interactions between *Eutypa lata* and *Trichoderma harzianum*. *Phytopathologia Mediterranea*, *43*, 95–104.
- KeXiang, G., XiaoGuang, L., RunFang, G., BaoJian, G., & TianBo, Z. (2002). Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on five plant pathogenic fungi. *Journal of Shandong Agricultural University*, *33*, 42.

- Larignon, P., & Dubos, B. (1997). Etude du mode de dégradation du bois de vigne par les champignons impliqués dans le syndrome de l'esca. *European Journal of Plant Pathology* 103, 147–157.
- Larignon, P., & Dubos, B. (2001). The villainy of black dead arm. *Wines & Vines* 82, 86–89.
- Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L., & Dubos, B. (2001). Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 40, S336–S342.
- Larignon, P., Fontaine F., Farine S., Clément, C., & Bertsch, C. (2009). Esca et Black Dead Arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne. *C. R. Biologies*, 332, 765–783.
- Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S., & Guérin-Dubrana, L. (2009). Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 32–46.
- Lazzizzera, C., Frisullo, S., Alves, A., & Phillips, A. J. L. (2008). Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drupe rot of olives in southern Italy. *Plant Pathology*, 57, 948–956.
- Leavitt, G. (2003). The occurrence, distribution, effects and control of *Botryodiplodia theobromae* on *Vitis vinifera* in California, Arizona and Northern Mexico. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 155
- Lecomte, P., Leyo, M., Louvet, G., Corio-Costet, M. F., Gaudillère, J. P., & Blancard, D. (2005). Le black dead arm, genèse des symptômes. *Phytoma* 587, 29–37.
- Lecomte, P., Darrietort, G., Liminana, J. M., Louvet, G., Muramendaraz, A., Legorboru, F. J., Choueiri, E., Jreijiri F., & Fermaud, M. (2009). Revisiting esca symptoms in the vineyard: results of a four-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 175.
- Lehoczky, J. (1974). Black Dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 9, 319–327.
- Luchi, N., Pinzani, P., Pazzagli, M., & Capretti, P. (2009). Detection of Botryosphaeriaceae species by real-time PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 163.
- Lummerzheim, M., Morello, L. G., & Mas, A. (2008). A multiplex PCR assay detecting several Ascomycetes responsible for grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 161.

- Luque, J., Martos, S., & Phillips, A. J. L. (2005). *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with *Dothiorella* anamorph. *Mycologia*, *97*, 1111–1121.
- Lyubun, Y. V., Kosterin, P. V., Zakharova, E. A., Shcherbakov, A. A., & Fedorov, E. E. (2002). Arsenic-contaminated soils: phytotoxicity studies with sunflower and sorghum. *Journal of Soils and Sediments*, *2*, 143–147.
- Ma, Z. H., & Michailides, T. J. (2002). A PCR-based technique for identification of *Fusicoccum* sp. from pistachio and various other hosts in California. *Plant Disease*, *86*, 515–520.
- Ma, Z., Luo, Y., & Michailides, T. J. (2003). Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from pistachios in California. *Journal of Phytopathology*, *151*, 312–322.
- Mann, B. (1962). Role of pectic enzymes in the *Fusarium* wilt syndrome of tomato. *Transactions of the British Mycological Society*, *45*, 160–178.
- Marchi, G., Roberti, S., Dovidio, R., Mugnai, L., Surico, G. (2001). Pectic enzymes production by *Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopatologia Mediterranea*, *40*, S407–S416.
- Martin, M. T. & Cobos, R. (2007). Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopatologia Mediterranea* *46*, 18–25.
- Martos, S., Andolfi, A., Luque, J., Mugnai, L., Surico, G., & Evidente, A. (2008). Production of phytotoxic metabolites by five species of Botryosphaeriaceae causing decline on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. *European Journal of Plant Pathology*, *121*, 451–461.
- Martos, S., Torres, E., Garcia, F., & Luque, J. (2009). Detection of Botryosphaeriaceae species occurring on grapevines in Spain by cooperational PCR coupled with dot blot hybridization. *Phytopathologia Mediterranea*, *48*, 162.
- Messias, J. M., Z. da Costa, B., M.G. de Lima, V., Dekker, R. F. H., Rezende, M. I., Krieger, N., & Barbosa, A. M. (2009). Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, *45*, 426–431.
- Michailides, T. J., (1991). Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. *Phytopathology*, *81*, 566–573.

- Michailides, T. J., & Morgan, D. P. (1993). Spore release by *Botryosphaeria dothidea* in pistachio orchards and disease control by altering the trajectory angle sprinklers. *Phytopathology*, 83, 145–152.
- Milholland, R. D. (1988). Macrophoma Rot. (In R. C. Pearson & A. C. Goheen (Eds.), *Compendium of Grape Diseases*, (p.24). St. Paul: APS PRESS, The American Phytopathological Society).
- Milholland, R. D. (1991). Muscadine grapes: some important diseases and their control. *Plant Disease*, 75, 113–117.
- Mondal, K. C., Banejee, R., & Pati, B. R. (2000). Tannase production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, 9, 767–9.
- Mugnai, L., Surico, G., & Sfalanga, A., 1997. Produzione di enzimi esocellulari da parte di funghi del legno di viti colpite dal ‘‘mal dell’ esca’’. *Micologia Italiana*, 1, 11–22.
- Mugnai, L., Graniti, A., & Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive disease of grapevines. *Plant Disease* 83, 404–417.
- Munkvold, G. P. & Marois, J. J. (1993). Efficacy of natural epiphytes and colonizers of grapevine pruning wounds for biological control of *Eutypa dieback*. *Phytopathology*, 83, 624–629.
- Pascoe, I. (1998). Trunk diseases of grapevines – perspectives from a tour of California. *The Australian Grapegrower & Winemaker*, 417, 68–71.
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T.A., Gryzenhout M., & Wingfield, M.J. (2004). *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology*, 50, 313–322.
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A., & Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to Eucalyptus. *Plant Pathology*, 56, 624–636.
- Pavlic D., Slippers, B., Coutinho, T. A., & Wingfield, M. J. (2009a). Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: A case of study on the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51, 259–268.
- Pavlic D., Slippers, B., Coutinho, T. A., & Wingfield, M. J. (2009b). Molecular and phenotypic characterisation of three phylogenetic species discovered within the *N. parvum*/*N. ribis* complex. *Mycologia*, 101, 636–647.

- Phillips, A. J. L., & Lucas, M. T. (1997): The taxonomic status of *Macrophoma ftaccida* and *Macrophoma reniformis* and their relationship to *Botryosphaeria dothidea*. *Sydowia*, 49, 150–159.
- Phillips, A. J. L. (1998). *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology* 146, 327–332.
- Phillips, A. J. L. (2000). Excoriose, cane blight and related diseases of grapevines: a taxonomic review of the pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 341–356.
- Phillips, A. J. L. (2002). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 41, 3–18.
- Phillips, A. J. L., Fonseca, F., Pova, V., Castilho, R., & Nolasco, G. (2002). A reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp. nov. *Sydowia* 54, 59–77.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Correia, A. & Luque, J. (2005). Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*, 97, 513–529.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Pennycook, S. R., Johnston, P. R., Ramaley, A., Akulov, A., & Crous, P. W. (2008). Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia*, 21, 29–55.
- Pusey, P. L., & Bertrand, P. F. (1993). Seasonal infection of non wounded peach bark by *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology*, 83, 825–829.
- Ramsdell, D. C., & Milholland, R. D. (1988). Black Rot (In R. C. Pearson & A. C. Goheen (Eds.), *Compendium of Grape Diseases*, (pp.15–17). St. Paul: APS PRESS, The American Phytopathological Society).
- Rego, C., Vaz, A., Nascimento, T., Cabral A., & Oliveira, H. (2009). Diseases incited by Botryosphaeriaceae fungi in Portuguese vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, 181.
- Reid, I. (1995). Biodegradation of lignin. *Canadian Journal of Botany*, 73, S1011–S1018.
- Retief, E., McLeod A., & Fourie, P. H. (2006). Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine nursery. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 331–339.



- Rigling, D. (1995). Isolation and characterization of *Cryphonectria parasitica* mutants that mimic a specific effect of hypovirulence-associated dsRNA on laccase activity. *Canadian Journal of Botany*, 73, 1655–1661.
- Rovesti, L., & Montermini, A. (1987). A grapevine decline caused by *Sphaeropsis malorum* widespread in the province of Reggio-Emilia. *Informatore Fitopatologico*, 37, 59–61.
- Sakalidis, M. (2004). Resolving the *Botryosphaeria ribis* – *B. parva* species complex; a molecular and phenotypic investigation. Honors thesis, School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Western Australia.
- Saldanha, R. L., Garcia, J. E., Dekker, R. F. H., Vilas-Boas, L. A., & Barbosa, A. M. (2007). Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 259–264.
- Samad, M. Y. A., Razak, C. N., Salleh, A. B., Zin Wan Yunus, W. M., Ampon, K., & Basri, M. (1988). A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 9, 51–56.
- Santos, C., Fragoeiro, S., Valentim, H., & Phillips A. J. L. (2006). Phenotypic characterization of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoconiella* strains isolated from grapevine: enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses. *Scientia Horticulturae*, 107, 123–130.
- Savocchia, S., Laurent, E. N., Stodart, B. J. & Steel, C. C. (2005). Botryosphaeria canker and sensitivity to fungicides *in vitro*. In: *Proceedings of the Joint Congress of the Southern African Society for Plant Pathology, African Mycological Association and Medical Mycology in Africa*, 23– 26 January 2005, Hartenbos Beach Resort, Mossel Bay, South Africa, 88 (abstract).
- Savocchia, S. S., Stodart, C. C., & Somers, B. J. (2007). Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis*, 46, 27–32.
- Schoeneweiss, D. F. (1981). The role of environmental stress in diseases of woody plants. *Plant Disease*, 65, 308–314.
- Seifert, K. A., Gams, W., Crous, P. W., & Samuels, G. J. (2000). Molecules, morphology and classification: towards monophyletic genera in Ascomycetes. *Studies in Mycology*, 45, 1–4.

- Slippers, B. (2003). Taxonomy, phylogeny and ecology of botryosphaeriaceous fungi occurring on various woody hosts. PhD Dissertation, Department of Microbiology and Plant Pathology, University of Pretoria, South Africa
- Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2004a). Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*, *96*, 83–101.
- Slippers, B., Fourie, G., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J., (2004b). Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. *Mycologia*, *96*, 1030–1041.
- Slippers, B., Summerell, B. A., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield B. D., & Wingfield, M. J. (2005). Preliminary studies on *Botryosphaeria* species from *Wollemia nobilis* and related southern hemisphere conifers in Australasia and South Africa. *Australasian Plant Pathology*, *34*, 213–220.
- Slippers, B., & Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, *21*, 90–106.
- Slippers, B., Smit, W. A., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2007). Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology*, *56*, 128–139.
- Smith, H., Wingfield, M. J., & Petrini, O. (1996a). *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus nitens* in South Africa. *Forest Ecology and Management*, *89*, 189–195.
- Smith, H., Wingfield, M. J., Crous, P. W., & Coutinho, T. A. (1996b). *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. in South Africa. *South African Journal of Botany*, *62*, 86–88.
- Smith, D. R., Stanosz, G. R. (2006). A species-specific PCR assay for detection of *Diplodia pinea* and *D. scrobiculata* in dead red and jack pines with collar rot symptoms. *Plant Disease*, *90*, 307–313.
- Sparapano, L., Bruno, G., & Graniti, A. (2000). Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea*, *39*, 169–177.

- Sparapano, L., Bruno, G., & Graniti, A. (2001). Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, *40*, S376–S386.
- St. Leger, R., Joshu, L., & Roberts, D. (1997). Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology*, *143*, 1983–1992.
- Starr, M. P. (1961). Pectin and galacturonate metabolism of phytopathogenic bacteria. *Recent Advances in Botany*, *7*, 632–635. University of Toronto Press, Toronto, Canada.
- Surico, G., Mugnai L., & Marchi, G. (2006). Older and more recent observations on esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea*, *45*, S68–S86.
- Surico, G. (2009). Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, *48*, 5.
- Swart, W. J., Wingfield, M. J. (1991). Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. *Plant Disease*, *75*, 761–766.
- Swofford DL., (2002). PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), version 4.0b10 (Alvitec). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, *24*, 1596–1599.
- Tardelli, F. (2007). Indagini sulla produzione di tannasi extracellulari in specie di *Fusarium*: aspetti fisiologici e biochimici. Tesi di laurea specialistica. <http://etd.adm.unipi.it/theses/available/etd-01052007-150205/> Università di Pisa, Facoltà di Agraria.
- Taylor, A., Hardy, G. E. St J., Wood P., & Burgess, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, *34*, 187–195.
- Tegli, S., Bertelli, E., & Surico, G. (2000). Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea*, *39*, 134–149.
- Tomaz, I. L., & Rego, M. C. N. F. (1990). Fungos do complexo responsável pelo declínio das videiras em Portugal. *Vida Rural*, *1493*, 12–20.

- Úrbez-Torres, J. R., & Gubler, W. D. (2006). Occurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea*, and *B. parva* associated with grapevine trunk diseases in Castilla y León region, Spain. *Plant Disease*, *90*, 835.
- Úrbez-Torres J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M., & Gubler, W. D. (2006). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*, *90*, 1490–1503.
- Úrbez-Torres, J. R., Gubler, W. D., & Luque, J. (2007). First report of *Botryosphaeria iberica* and *Botryosphaeria viticola* associated with grapevine decline in California. *Plant Disease*, *91*, 772.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J. C., Guevara J., & Gubler, W. D. (2008). Identification and Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, *92*, 519–529.
- Úrbez-Torres, J. R., & Gubler, W. D. (2009). Pathogenicity and epidemiology of Botryosphaeriaceae from grapevines in California. *Plant Disease*, *93*, 584–592.
- van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H. & Halleen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, *96*, 781–798.
- van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Halleen F. & Crous, P. W. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, *45*, S43–S54.
- von Arx, J. A., & Müller, E. (1954). Die Gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. *Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz*, *11*, 1–434.
- von Arx, J. A., & Müller, E. (1975). A re-evaluation of the bitunicate ascomycetes with keys to families and genera. *Studies in Mycology*, *9*, 1–159.
- von Arx, J. A. (1987). Plant-pathogenic Fungi. J. Cramer, Berlin, Germany.
- White, T. J., Bruns, T., Lee S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. (In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). San Diego: Academic Press.)
- Whitfield, J. (2002). Ecology: Neutrality versus the niche. *Nature*, *417*, 480–481.
- Wood, P. M., & Wood, C. E. (2005). Cane dieback of dawn seedless table grapes (*Vitis vinifera*) in Western Australia caused by *Botryosphaeria rhodina*. *Australasian Plant Pathology*, *34*, 393–395.

- Wunderlich, N., Savocchia, S., Steel, C. C., Ash, G. J., Rman, H. (2009). Identification of *Botryosphaeria* spp. and first report of *Dothiorella viticola* (“*Botryosphaeria viticola*”) associated with bunch rot in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 162.
- Zhou, S., & Stanosz, G. R. (2001). Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8SrDNA sequences. *Mycologia*, 93, 516-527.
- Zhou, S., Smith, D. R., & Stanosz, G.R. (2001). Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycological Research*, 105, 919–926.