



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA UBALDO MONTELATI

DOTTORATO IN BIOTECNOLOGIE MICROBICHE AGRARIE
CICLO XXIII

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie – Sezione di Protezione delle piante
Settore scientifico disciplinare AGR/012

***BOTRYOSPHAERIACEAE* IN PIANTE FORESTALI: ANALISI DI UN PROBLEMA
EMERGENTE**

Coordinatore del Dottorato: Ch.mo Prof. Paolo Capretti

Tutore : Ch.mo Prof. Alessandro Ragazzi

Cotutore : Ch.mo Prof. Salvatore Moricca

Dottorando : Andrea Uccello

30 Dicembre 2010

Declaration

I hereby declare that this submission is my own work and that, to the best of my knowledge and belief, it contains no material previously published or written by another person nor material which to a substantial extent has been accepted for the award of any other degree or diploma of the university or other institute of higher learning, except where due acknowledgment has been made in the text.

30/12/2010

Andrea Uccello

A copy of the thesis will be available at <http://www.diba.unifi.it/>

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.

30/12/2010

Andrea Uccello

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

Ad Annabella.

*Se non ci fossi stata tu nella mia vita
questo lavoro non sarebbe mai esistito*

Ringraziamenti

Dopo quattro anni mi ritrovo a scrivere delle righe di ringraziamento. Allora era per la tesi di laurea e, guardandomi indietro, vedevo raggiunto un traguardo e lo volevo condividere con la gente che mi aveva reso una persona ricca (una ricchezza che i soldi non possono comprare).

Oggi, quella ricchezza di allora è rimasta intatta, semmai il mio “patrimonio umano” è ulteriormente cresciuto e tutto ciò mi fa sentire una persona incredibilmente fortunata.

Tale patrimonio è costituito, innanzitutto, dalla mia famiglia, da sempre fonte di valori e insegnamenti, forte sostegno emotivo ed esempio di combattività, una nave che niente e nessuno potrà mai affondare.

Nella mia “doppia esistenza”, canicattinese e fiorentina, ho avuto la fortuna di incontrare gente splendida, che mi ha dato tanto e a cui spero di aver offerto qualcosa pure io; si dice che gli amici si contano sulle dita di una sola mano, io so solo che a me non bastano tutti e quattro gli arti.

Quindi vorrei ringraziare di essere semplicemente quello che sono gli amici di Canicattini, tantissimi da non poterli elencare, con un pensiero di riguardo verso i miei compagni d'avventura nei Playfire/Perciazzuska, che riempiono di musica i miei momenti a casa: Johnny, frontman carismatico e grande intrattenitore; Peppe, che è un architetto e pure interista, ma io sono uno che perdona; Pierino, il mio giocattolo preferito; Santi M., perchè in una rock band serve la figura del playboy; Santi A., nipotino talentuoso, ometto con gli attributi.

Un pensiero forte va agli amici conosciuti a Firenze, la mia seconda famiglia: Mizzy, impareggiabile maestro, uomo dalla saggezza infinita; Giulia, anche se mi tratta sempre male; Fuko e Sullo, versione moderna di “La bella e la bestia”; Nik e le sue maledette sorprese; l'entità unica, conosciuta al mondo come “i faentini”, Franz, Mauri, Lara, Loretta, Luchino, Riccardo, Pallino e tutti gli altri, tutti a modo loro prototipi dell'uomo del futuro; il Betta, che riesce a mettere al repentaglio la mia supremazia nel campo delle scemenze; Fumetto e Bobore, grandi coinquilini ma, soprattutto, grandi amici; Giovanni, che è sempre pronto a dare tutto se stesso al prossimo.

Le persone splendide che ho conosciuto al lavoro: Cecilia, che è uno spasso; Tamara, che mi sopporta; Francesca e Celeste, che sono scappate ma non abbastanza da riuscire ad evitarmi; Guido, che è stato sempre al gioco e che si è fatto apprezzare per lo spirito goliardico.

Un abbraccio pubblico lo voglio dare a Elena, che in mezzo a tanti cazziatoni ci ha infilato preziosi consigli e tanto affetto.

Non posso dimenticare il Tatti, anche lui affetto da interismo e altre patologie strane, tipo l'attrazione fatale per i giocattoli Apple, però è un amico sincero, una persona cui sono bastati pochi attimi per instaurare un reciproco feeling.

Dulcis in fundo, voglio ringraziare dal più profondo del cuore colui che rappresenta la cosa più preziosa che mi rimane di questi anni: Alessandro (Italo, Franco) Spagnolo, prima grande collega, poi grande compagno di casa, ma soprattutto grandissimo uomo e grandissimo amico.

I miei amici al FABI, Mike e Bernard che mi hanno accolto, James, Didier, Alvaro, Lorenzo e tutta l'altra gente incontrata, era un piacere alzarsi per andare al lavoro.

Un caloroso pensiero va ai colleghi dell'Università di Palermo: la Prof.ssa Burruano, non solo per il fondamentale aiuto nelle analisi istologiche della mia tesi, ma soprattutto perchè è una bella persona e perchè mi ha fatto sentire, con il suo fare materno, sempre a casa mia; Gaetano, Antonio, Sandra, Ezio e Luca, che mi hanno aiutato, che mi hanno accolto e che mi hanno fatto stare davvero bene.

Un doveroso ringraziamento va ai miei tutori, il Prof. Ragazzi e il Prof. Moricca, perchè hanno mostrato tanta pazienza nei miei confronti, soprattutto in questi ultimi due mesi, e perchè da loro ho imparato molte cose, a livello professionale e umano, di cui terrò sempre conto.

Mi sono tenuto per ultima una persona molto speciale, colei che ha reso possibile il "parto" di questo lavoro. Annabella sei un'amica straordinaria, una sorella di fatto, se oggi mi trovo di fronte ad un nuovo obiettivo conseguito è solo per la tua voglia di avermi vicino nuovamente. In tutto il mio tesoro, tu sei la gemma più luminosa.

Infine, mi si perdoni la presunzione (ma è la prima volta in vita mia che lo faccio), un ringraziamento voglio rivolgerlo a me stesso, questi anni sono stati difficili da tanti punti di vista, ma mia testa e il mio fisico hanno vacillato molte volte, ma sono sempre rimasto in piedi, sempre con la capacità di sdrammatizzare, ridere sulle mie sfortune per poi darmi una mossa e riprendere in mano la situazione. Sarò anche nano (quindi una carogna di sicuro, direbbe De Andrè), ma ho le spalle ben larghe e la vita dovrà faticare un bel po' se mi vuole affossare.

Keep on rockin' in the free world!!

Andrea

Indice

Riassunto.....	1
Abstract.....	6
1 – Introduzione.....	10
1.1 – Le <i>Botryosphaeriaceae</i>	11
1.2 – Descrizione del caso di studio.....	14
1.2.1 – Boscoincittà.....	14
1.2.2 – Parco Nord.....	14
1.3 – Obiettivi della ricerca.....	16
Bibliografia.....	18
2 – Analisi del processo infettivo.....	21
2.1 – Introduzione.....	22
2.2 – Materiali e metodi.....	24
2.2.1 – Infezione artificiale.....	24
2.2.2 – Raccolta dei dati climatici.....	26
2.2.3 – Analisi istologiche.....	26
2.3 – Risultati e discussione.....	28
2.3.1 – Prove di infezione artificiale – Anno 2007.....	28
2.3.2 – Prove di infezione artificiale – Anno 2009.....	29
2.3.3 – Analisi istologiche.....	31
2.4 – Conclusioni.....	33
Bibliografia.....	35
Appendice.....	39
3 – Ecotipi e serie climatiche: una possibile interpretazione.....	
della diffusione e della virulenza delle <i>Botryosphaeriaceae</i>	51
3.1 – Introduzione.....	52
3.2 – Materiali e metodi.....	54
3.2.1 – Allestimento della collezione di isolati.....	54
3.2.2 – Prove di crescita.....	54
3.2.3 – Elaborazioni statistiche.....	55
3.2.4 – Raccolta dei dati climatici.....	55
3.3 – Risultati e discussione.....	57
3.3.1 – Prove di crescita.....	57
3.3.2 – Serie climatiche.....	58

3.4 – Conclusioni.....	63
Bibliografia.....	65
Appendice.....	69
4 – Impiego di metodi molecolari per approcci di.....	
diagnostica applicati alle <i>Botryosphaeriaceae</i>	76
4.1 – Introduzione.....	77
4.2 – Materiali e metodi.....	79
4.2.1 – Estrazione del DNA.....	79
4.2.2 – Amplificazione del DNA.....	80
4.2.3 – Sequenziamento ed analisi del DNA.....	80
4.2.4 – Analisi RFLP della regione ITS.....	81
4.2.5 – Analisi filogeografica della regione ITS di <i>Diplodia seriata</i>	82
4.3 – Risultati e discussione.....	83
4.3.1 – Identificazione molecolare degli isolati.....	83
4.3.2 – Analisi RFLP dellITS.....	84
4.3.3 – Analisi filogeografica della regione ITS di <i>Diplodia seriata</i>	85
4.4 – Conclusioni.....	86
Bibliografia.....	88
Appendice.....	92
5 – Conclusioni.....	105

Riassunto

Le *Botryosphaeriaceae* Theiss. & Syd. sono una famiglia di ascomiceti (*Botryosphaeriales*, *Incertae sedis*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*, *Fungi*) comprendente più di 2000 specie, ampiamente diffuse negli ecosistemi compresi fra i climi temperati e tropicali. Pur essendo conosciute da tempo quali saprofiti ed endofiti di piante legnose, un numero crescente di specie appartenenti a questa famiglia è stato accostato a sindromi patologiche, dapprima su piante di interesse agrario e, solo in tempi recenti, su piante forestali.

Dallo studio di questi microrganismi, quali entità fitopatogene, si è riscontrato che la virulenza delle specie con potenziale patogenetico possa rimanere inespressa anche per lunghi periodi, per poi manifestarsi nel momento in cui l'ospite attraversa una fase di stress fisiologico, con la conseguente riduzione di efficienza dei meccanismi di difesa. Fra i fattori abiotici maggiormente connessi alle manifestazioni virulente delle *Botryosphaeriaceae*, vi sono quelli da stress idrico, legate per lo più all'andamento delle precipitazioni ed alla temperatura atmosferica.

Per questo motivo, la recente comparsa di numerose sindromi legate alla presenza di specie appartenenti a questa famiglia, è stata posta in correlazione con i cambiamenti climatici in atto per via dell'aumento di temperature registrato e della diminuzione, o comunque dell'alterazione nella distribuzione stagionale, delle precipitazioni. Nonostante sia opinione diffusa che la componente abiotica abbia un ruolo fondamentale nell'influenzare l'equilibrio fra *Botryosphaeriaceae* ed ospiti, in bilico fra endofitismo e patosismo, poco è stato fatto per approfondire questo aspetto della ricerca, soprattutto in contesti forestali dove, a differenza delle colture agrarie, l'apporto idrico per le piante ospiti dipende esclusivamente dall'andamento stagionale delle precipitazioni.

Il presente lavoro trae spunto da un caso di studio sito nella città di Milano e composto da due differenti parchi urbani: Parco Nord e Boscoincittà; il primo è un classico parco urbano, progettato secondo criteri estetici e non selvicolturali, ricco di specie esotiche, costituenti consociazioni vegetali artificiali, e privo di corsi d'acqua; il secondo parco è stato concepito con criteri più naturalistici, è quasi esclusivamente composto da specie autoctone ed è ricco di laghi artificiali e canali

idrici. Nonostante le profonde differenze fra i due parchi, dai primi anni 2000 entrambi i soprassuoli sono stati colpiti da un diffuso deperimento, coinvolgente più specie (sia fra le autoctone che fra le esotiche) e privo di una sintomatologia omogenea, una situazione rientrante nella definizione di “sindrome ad eziologia complessa”.

In virtù di ciò, è stata effettuata un’indagine sulla micoflora endofitica presente nei soprassuoli, con l’intento di verificare se vi fossero delle specie fungine correlate agli ospiti in deperimento. Alla fine di questa fase, durata due anni (2007-2008), è stato possibile individuare, quali organismi maggiormente associati agli stati di deperimento, due specie afferenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae*: *Botryosphaeria dothidea* e *Diplodia seriata*.

Sulla base di queste risultanze, si è proceduto ad isolamenti mirati, riguardanti esclusivamente morfotipi riconducibili a questa famiglia di ascomiceti, e ad identificazioni più approfondite (basate sulla morfologia delle strutture riproduttive), allo scopo di approfondire le informazioni sulla presenza di tali microrganismi all’interno del caso di studio: oltre alle specie sopra menzionate, altre cinque specie sono state identificate, evidenziando come, all’interno dei due soprassuoli, vi sia un vero e proprio universo di *Botryosphaeriaceae*. Questi isolati, integrati da altri di differente origine geografica, sono andati a costituire la collezione fungina utilizzata in questo studio.

Sono state effettuate due differenti prove di infezione artificiale, su semenzali di due anni ed in pieno campo, per saggiare le capacità patogenetiche delle tre specie più importanti rinvenute all’interno del caso di studio: *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* e *Neofusicoccum parvum*. L’evoluzione delle lesioni, durante il periodo di sperimentazione, è stata confrontata con l’andamento stagionale di alcuni parametri climatici (precipitazioni, temperature medie giornaliere ed umidità media giornaliera), al fine di raccogliere indicazioni sull’influenza della componente abiotica nel processo infettivo.

Data l’importanza dei fattori ambientali nel processo infettivo, sono state approntate delle prove di crescita, su tre substrati diversi ed a tre differenti temperature, mirate a caratterizzare i differenti ecotipi, sia a livello inter che intraspecifico, di una collezione di isolati di differente provenienza geografica.

Per gli stessi, sono state ricostruite le serie climatiche dei luoghi di isolamento degli ultimi 30 anni. Questi dati sono stati confrontati alla ricerca di “pattern” climatici comuni che avessero corrispondenze con gli ecotipi individuati.

Dopo la preliminare identificazione morfologica, tramite tecniche di PCR sono state amplificate e sequenziate le regioni ITS e, per quelle specie ove questa non era sufficiente per una chiara identificazione, EF-1 α degli isolati in collezione; il confronto di queste sequenze con quelle depositate nei database ha permesso di confermare, ed in pochi casi correggere, le identificazioni operate su base morfologica. I campioni di ITS amplificati sono stati sottoposti a digestione enzimatica (ITS-RFLP), sia reale che tramite software, ed i risultati sono stati confrontati con le informazioni ottenute dai diversi ecotipi. Oltre ciò, sono state raccolte sequenze della regione ITS, depositate nei database, di isolati di *Diplodia seriata* provenienti da luoghi geograficamente distanti: con queste è stato ricostruito un network filogeografico di una specie per la quale non erano presenti degli studi sulle dinamiche di diffusione mondiale.

Con questa ricerca si è tentato di fornire qualche elemento in più nella conoscenza della biologia di questi complessi patogeni, soprattutto in contesti forestali, con la convinzione che il primo strumento di lotta, nei confronti di microrganismi così complessi, debba essere necessariamente la piena conoscenza degli stessi.

Lavori correlati alla tesi

Moricca S., Uccello A., Zini E., Campana F., Gini R., Selleri B., Tucci R., Anderloni S., Pirelli P., Ragazzi A. 2008. Spread and virulence of *Botryosphaeria dothidea* on broadleaved trees in urban parks of northern Italy. *Journal of Plant Pathology*. **90** (2, Supplement): pp. 452.

Moricca S., Uccello A., Ragazzi A. 2008. Altered incidence and distribution range of some phytopathogens in Mediterranean woods. In: *Proceedings of the IUFRO Working Party 7.03.10 “Methodology of Forest Insect and Disease Survey in Central Europe”*, Štrbské Pleso, Slovakia, September 15-19, 2008: 15 -19.

Moricca S., Uccello A., Ragazzi A. 2010. Micocenosi endofitiche in foreste urbane sottoposte a stress ambientale. *Micologia Italiana* **39** (1): 47-56.

Moricca S., Uccello A., Turco E., Ginetti B., Ragazzi A. In stampa. Multiple *Botryosphaeriaceae* infection in forest trees: synergistic or antagonistic interaction? In: *Atti del Convegno S.I.Pa.V. 2010*, Firenze 14-17 settembre 2010.

Moricca S., Uccello A., Ginetti B., Ragazzi A. In stampa. Synergistic action of oomycetes and fungal pathogens in the decline of oak stands. In: *Proceedings of the 6th Meeting “Integrated Protection in Quercus spp. Forests”*, Tempio Pausania (OT) 4-8 ottobre 2010.

Lavori in pubblicazione

I tre capitoli centrali della tesi, opportunamente rivisti e tradotti in inglese, saranno sottomessi come pubblicazioni su riviste internazionali.

Corsi frequentati ed attività svolte presso altri istituti

Corsi frequentati

- Introductory phylogenetics workshop – FABI (Pretoria, South Africa) – 19-21 ottobre 2009;
- Advanced phylogenetics workshop – FABI (Pretoria, South Africa) – 26-30 ottobre 2009

Attività svolte all'estero

Stage di 6 mesi (16 ottobre 2009 – 15 aprile 2010) presso il Forest and Agricultural Biotechnology Institute (FABI) dell'Università di Pretoria, Repubblica Sudafricana. Durante lo stage sono stati svolte le prove di crescita riportate nel capitolo 3 e i lavori di biologia molecolare riportati nel capitolo 4.

Attività svolte in Italia

I lavori di analisi istologica della presente ricerca sono stati svolti presso l'Università degli Studi di Palermo, presso il Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo (Dipartimento di Scienze Entomologiche, Fitopatologiche, Microbiologiche e Zootecniche), sotto la supervisione della Prof.ssa Santella Burruano.

Tali attività sono state svolte in due stage, rispettivamente dal 30/03/2009 al 04/04/2009 e dal 22/06/2010 al 25/06/2010.

Abstract

Botryosphaeriaceae Theiss. & Syd. in an ascomycetes family (*Botryosphaeriales*, *Incertae sedis*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*, *Fungi*) including more than 2000 species, largely worldwide spread from tropical to temperate ecosystems. Although they are well known from long time as saprophytes and endophytes in woody plants, a growing number of species belonging to this fungal family it's been linked to pathological syndromes, earlier for agricultural plants and, recently, in forest trees.

From studies about these microorganisms as plant pathogens, emerged that virulence, in potentially pathogenic species, can be unexpressed for long time, until host undergo physiological stress conditions, with the consequential reduction of defenses by host. Main abiotic factor linked to *Botryosphaeriaceae* virulence is water stress, primarily due to rainfall distribution and air temperature; this is the reason why many syndromes connected to the presence of botryosphaeriaceous fungi are linked to Climate Change, that is determining a raising in air temperature and is altering, and often decreasing, rainfall distribution. Even if is well accepted the idea that abiotic factors has a fundamental role in affecting the equilibrium between *Botryosphaeriaceae* and their hosts, oscillating between endophytism and pathosism, just a little has been done to deep investigate this issue, mostly in forest contexts where, unlike agricultural stands, water supply is due exclusively by seasonal distribution of rainfall.

This work originates from a case study in the city of Milan and it is made by two different urban parks: Parco Nord and Boscoincittà; the first one is the classic urban park, conceived by aesthetic criteria, instead of selvicultural ones, rich in exotic trees, assembled in artificial vegetal associations, lacking in water streams; the second one was projected in a more naturalistic way because is almost completely made by native trees and there is an abundant presence of water streams and some artificial lakes. Despite the deep differences between the two parks, since the early 2000's, in both cases, a spread decline is affecting trees, extended to different species (both native and exotic ones), without a

homogeneous symptomatology, falling within the definition of “complex etiology syndrome”.

To investigate about the reasons of the decline, fungal endophytes inhabiting both healthy and decline trees were investigated, to search for the species linked to the decline. At the end of this stage, lasted two years (2007 – 2008), it's been possible to check, as fungal species mainly linked to declining hosts, two different ascomycetes belonging to *Botryosphaeriaceae*: *Botryosphaeria dothidea* and *Diplodia seriata*.

Based on these preliminary results, selective isolations were made to search strains belonging to *Botryosphaeriaceae* morphotypes; then, the isolates collected were identified on the basis of the reproductive structures morphology, to check the number of botryosphaeriaceous species living in the case study: in addition to the species previously identified, five other species were found, depicting a bunch of *Botryosphaeriaceae* involved in trees decline. These isolates, integrated by several other ones from other places of the world, became the fungal collection used in this work.

Two different artificial infection trials were made, in open field and on two years old seedlings, to test the pathogenicity for three of the most important species found in the case study: *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum*. Lesions evolution, since inoculation to the end of the experimentations, was compared to the most important climatic parameters (rainfall, air temperature and humidity) to better understand the role of abiotic factors in virulence expressed by isolates tested.

Due to the importance of abiotic factors in *Botryosphaeriaceae* infective process, growth tests were conducted for all isolates in the collection, on three different media and at three different temperatures, in order to characterize different ecotypes. For the same isolates, climatic series of the last 30 years, for each place of isolate provenience, were build, to search for common patterns linkable to different ecotypes found.

After the preliminary morphological identification, PCR reactions were made to amplify and to carry out the sequences of ITS region, and EF-1 α where ITS is not enough to proceed to a proper identification, of the isolates in the collection; comparing these sequences to those deposited in on line databases

allowed to confirm, or to correct, previous morphological identifications. Amplified ITS regions were digested by restriction enzymes (ITS-RFLP), and ITS sequences previously obtained were submitted on line for a virtual RFLP; results were compared to the informations obtained for the ecotypes previously defined. Furthermore, ITS sequence of different geographic provenances of *Diplodia seriata* were collected from databases; these data were used to build a phylogeographic network for a species whose still unknown the dynamics of their worldwide spread.

This research is an attempt to investigate about biology of these complex pathogens, mostly in forest contexts, starting from the assumption that the primarily defense strategy, against such complex microorganisms, it should be the complete knowledge of them.

Papers related to the Thesis

- Moricca S., Uccello A., Zini E., Campana F., Gini R., Selleri B., Tucci R., Anderloni S., Pirelli P., Ragazzi A. 2008. Spread and virulence of *Botryosphaeria dothidea* on broadleaved trees in urban parks of northern Italy. *Journal of Plant Pathology*. **90** (2, Supplement): pp. 452.
- Moricca S., Uccello A., Ragazzi A. 2008. Altered incidence and distribution range of some phytopathogens in Mediterranean woods. In: *Proceedings of the IUFRO Working Party 7.03.10 "Methodology of Forest Insect and Disease Survey in Central Europe"*, Štrbské Pleso, Slovakia, September 15-19, 2008: 15 -19.
- Moricca S., Uccello A., Ragazzi A. 2010. Micocenosi endofitiche in foreste urbane sottoposte a stress ambientale. *Micologia Italiana* **39** (1): 47-56.
- Moricca S., Uccello A., Turco E., Ginetti B., Ragazzi A. In stampa. Multiple *Botryosphaeriaceae* infection in forest trees: synergistic or antagonistic interaction? In: *Atti del Convegno S.I.Pa.V. 2010*, Firenze 14-17 settembre 2010.
- Moricca S., Uccello A., Ginetti B., Ragazzi A. In stampa. Synergistic action of oomycetes and fungal pathogens in the decline of oak stands. In: *Proceedings*

of the 6th Meeting “Integrated Protection in Quercus spp. Forests”, Tempio Pausania (OT) 4-8 ottobre 2010.

Papers to be submitted

Chapters 2,3 and 5 will be translated in English and submitted to an international journal. Decision is still in progress.

Activities in other labs

Courses attended

- Introductory phylogenetics workshop – FABI (Pretoria, South Africa) – 19-21 ottobre 2009;
- Advanced phylogenetics workshop – FABI (Pretoria, South Africa) – 26-30 ottobre 2009

Foreign activities

Six months stage (October 16th 2009 – April 15th 2010) in Forest and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, South Africa. During the stage, part of the work in this Thesis was done (Chapter 3: growth rates trial; Chapter 4)

Activities in labs in Italy

Histological analysis were made in S.En.Fi.Mi.Zo Department, University of Palermo, under the supervision of Prof. Santella Burruano. That work was made in two different stages: from March 30th 2009 to April 4th 2009 and from June 22th 2010 to June 25th 2010.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 LE *BOTRYOSPHAERIACEAE*

Le *Botryosphaeriaceae* Theiss. & P. Syd. sono una famiglia di ascomiceti (*Botryosphaeriales*, *Incertae sedis*, *Dothideomycetes*) conosciuta già nella seconda metà del XIX secolo (Cesati e De Notaris, 1863; Saccardo, 1877) e composta da entità che per lungo tempo sono stati considerate saprofiti di piante legnose. Il nome della famiglia deriva dalla forma sferica del peritecio, che può essere uni o multiloculare, le cui pareti sono formate da più strati di cellule. Gli aschi sono bitunicati, pedunculati o sessili, di forma clavata; le ascospore sono ialine o pigmentate, possono presentare un setto o nessuno e sono di forma variabile da fusoidi a ellissoidali (Crous *et al.*, 2006).

I teleomorfi delle *Botryosphaeriaceae*, comunque, sono piuttosto rari da osservare in natura e presentano una variabilità di caratteri ridotta e scarsamente informativa a livello tassonomico; per questo motivo, la tassonomia di queste è stata ricostruita principalmente in base ai caratteri delle strutture riproduttive degli anamorfi, facilmente isolabili ed inducibili alla fruttificazione, per la maggior variabilità mostrata, che ha offerto più caratteri utili all'identificazione e caratterizzazione. Una prima revisione dell'inquadramento tassonomico di questi ascomiceti è stata operata, a distanza di molti anni dalla prima classificazione, da von Arx e Müller (1954), i quali hanno ridotto molte specie al rango di sinonimi, ingenerando notevoli margini di incertezza sulla reale identità degli isolati citati nella letteratura antecedente tale revisione.

Tale incertezza è rimasta anche nella letteratura susseguente, molto spesso per la riconduzione di anamorfi al teleomorfo sbagliato, ingenerando confusione riguardo alla variabilità di ogni singola specie, alla sua distribuzione e alle eventuali associazioni con gli ospiti (Slippers e Wingfield, 2007), comportando una maggiore cautela nella consultazione della bibliografia esistente.

Per risolvere definitivamente le controversie legate alla tassonomia di questi ascomiceti, sfruttando i vantaggi offerti dalle tecniche legate all'uso della PCR negli studi filogenetici, è stata operata una completa revisione dell'inquadramento tassonomico delle specie afferenti a questa famiglia (Jacobs e Rehner, 1998; Denman *et al.*, 2000; Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008). In tale revisione, per evitare errori futuri nel collegamento degli anamorfi con i rispettivi

teleomorfi, è stato scelto di mantenere un nome unico per specie, valevole sia per la forma conidica che per quella perfetta; nella decisione del nome da attribuire a ciascuna specie sono stati mantenuti molto spesso i nomi dell'anamorfo, in quanto è la forma in assoluto più frequente in natura e perché per molte specie ancora non se ne conosce la forma perfetta.

L'utilizzo, sempre più diffuso, della PCR quale metodo diagnostico ha inoltre consentito di identificare specie nuove e scoprire che alcune di quelle note sono in realtà dei complessi di specie (Slippers *et al.*, 2004a; Alves *et al.*, 2006; Damm *et al.*, 2007b; Alves *et al.*, 2008).

Le *Botryosphaeriaceae*, sebbene siano state ritenute a lungo dei saprofiti di piante legnose, sono in realtà una famiglia di endofiti cosmopoliti che colonizzano un'ampia gamma di specie legnose, sia fra le gimnosperme che fra le angiosperme, mono e dicotiledoni. Negli ultimi anni, sempre più spesso, specie afferenti a questa famiglia sono state connesse a sindromi complesse, nelle quali emerge, come sintomo preminente, la comparsa di cancro corticali.

Le piante suscettibili alle infezioni sono sia piante di interesse agrario (Larignon *et al.*, 2001; Phillips, 2002; Damm *et al.*, 2007a; Lazizzera *et al.*, 2008; Úrbez-Torres e Gubler, 2009) che piante di interesse forestale (Ragazzi *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2003; Slippers *et al.*, 2004b; Jurc *et al.*, 2006; Linaldeddu *et al.*, 2007; Slippers e Wingfield, 2007; Moricca *et al.*, 2010).

L'infezione da parte di specie di *Botryosphaeriaceae* può rimanere latente anche per lungo tempo, tanto da non causare alcun sintomo sull'ospite; quando quest'ultimo è sottoposto a stress ambientali, per lo più di natura idrica, questi ascomiceti possono emergere dalla fase endofitica e manifestare virulenza (Schoeneweiss, 1981; Desprez-Loustau *et al.*, 2006), approfittando della minore efficienza del sistema di difesa dell'ospite.

Alla base della presente ricerca vi è un'indagine sul deperimento del soprassuolo arboreo di due differenti parchi urbani della città di Milano: Boscoincittà e Parco Nord. Entrambi i soprassuoli, dai primi anni del secolo, hanno mostrato sintomi di sofferenza (cancro corticali, talvolta con emissione di essudati, disseccamenti di rami e branche, ingiallimenti fogliari, microfillia) che hanno riguardato sia le piante esotiche che quelle autoctone, configurando una sindrome ad eziologia complessa, sulla quale si è investigato.

Attraverso campionamenti mensili dal fusto di 24 piante campione per parco, equamente suddivise fra deperienti e asintomatiche, si è censita la micoflora endofitica presente nei due parchi. Al termine di due anni di campionamento, si sono messe a confronto le comunità endofitiche infeudate in ospiti asintomatici ed in stato di deperimento, con lo scopo di verificare se vi fossero entità maggiormente collegate alle piante in cattivo stato vegetativo. Da questa indagine è emerso che due specie appartenenti alle *Botryosphaeriaceae*, *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. e *Diplodia seriata* De Not., erano strettamente collegate allo stato di deperimento (Moricca *et al.*, 2010); in successivi isolamenti mirati, inoltre, è stata isolata pure la specie *Neofusicoccum parvum*, che durante la ricerca si è mostrata essere quella più virulenta all'interno del caso di studio (Capitolo 2).

1.2 DESCRIZIONE DEL CASO DI STUDIO

1.2.1 *Boscoincittà*

Boscoincittà è un parco dalla superficie complessiva di 110 ha, situato nella zona ovest di Milano.

Sorge su degli ex terreni agricoli che, in stato di semi abbandono, sono stati dati nel 1974 in concessione all'associazione Italia Nostra, che si occupa della gestione e della manutenzione dell'area. Su questi terreni è stato sviluppato il progetto di Forestazione Urbana, il cui centro operativo si trova all'interno del parco, nel complesso della Cascina di San Romano.

Il soprassuolo arboreo comprende per lo più specie autoctone (acero campestre e di monte, olmi, pioppi, salici, farnie), una specie esotica naturalizzata (robinia) e una specie esotica (quercia rossa).

Il parco è ricco di acqua: numerosi fontanili infatti si intrecciano fino a formare un lago, e nutrita è la presenza di fauna selvatica, con particolare abbondanza di conigli (http://www.comune.milano.it/portale/wps/portal/CDM?WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/ContentLibrary/Ho%20bisogno%20di/Ho%20bisogno%20di/AreeVerdi_ParchieGiardini_Boscoincitta)

1.2.2 *Parco Nord*

Il Parco Nord si trova nella periferia nord di Milano, al confine con i comuni di Bresso e Sesto San Giovanni, e si estende su una superficie complessiva di 600 ha.

Il sito su cui sorge è un'ex area industriale, i cui terreni sono in parte bonificati ed in parte provenienti da aree agricole non ancora cementificate, in un contesto fortemente urbanizzato e inquinato. Sui suoli inquinati, una volta bonificati, è stata sparsa in abbondanza della terra di riporto di varia natura e composizione, rendendo impossibile disegnare un profilo pedologico chiaro dei terreni all'interno del parco.

Il parco è stato riconosciuto nel 1975 come parco regionale dalla Regione Lombardia e il soprassuolo è stato messo a dimora a seguito di operazioni di impianto avvenute in un ampio lasso di tempo, visto che i primi impianti di una certa importanza sono avvenuti nel 1983 e si sono protratti fino al 2003 (<http://www.parconord.milano.it>).

Il soprassuolo arboreo è quanto mai vario, comprendendo specie autoctone (acero di monte, farnia, pioppo cipressino) insieme a numerose specie allojene (quercia rossa, spino di giuda) o specie fuori areale (cerro, roverella), che compongono consociazioni artificiali di difficile gestione selvicolturale.

Abbondante è, inoltre, la presenza di prati e radure, piste ciclabili e sentieri nel bosco, in un contesto di elevata fruizione del parco da parte degli abitanti della zona, che è piuttosto popolosa. Questo comporta un maggior compattamento del terreno e condizioni asfittiche per le radici delle piante; l'assenza di canali e corsi d'acqua, unita alla drastica diminuzione delle precipitazioni a Milano negli ultimi 30 anni (Capitolo 3), va a configurare una situazione di forte stress idrico per il soprassuolo arboreo.

1.3 OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il quadro che emerge intorno alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae* è quello di un gruppo di patogeni complessi, per il quale le manifestazioni di virulenza sono l'espressione di un equilibrio preesistente fra pianta, microrganismo ed ambiente che si è alterato, avvantaggiando il microrganismo. Un ruolo chiave, quindi, per comprendere la biologia di questi ascomiceti lo riveste la componente ambientale.

Il presente lavoro si prefigge di approfondire alcuni aspetti sulla biologia delle *Botryosphaeriaceae*, aspetti che riguardano l'espressione di virulenza, l'influenza dei fattori ambientali, il tipo di interazione con le piante ospite e le dinamiche di colonizzazione.

In una parte dello studio (Capitolo 2) si sono condotte delle prove di infezione artificiale in pieno campo, testando tre isolati di tre specie diverse su un numero complessivo di sei specie ospite; lo scopo di queste prove era quello di osservare l'evoluzione stagionale delle lesioni causate dagli isolati testati in funzione delle condizioni meteorologiche susseguitesi durante l'arco della sperimentazione, durata 150 giorni.

Sui semenzali inoculati, al termine della sperimentazione, si è proceduto all'analisi istologica su sezioni microtomiche che sono state opportunamente trattate per consentire la visualizzazione dei miceli inoculati all'interno dei tessuti dell'ospite, in modo da trarre indicazioni sul tipo di interazione dei vari microrganismi con le piante infettate.

Una parte del lavoro (Capitolo 3) è stata volta alla caratterizzazione ecotipica di un totale di 53 isolati di *Botryosphaeriaceae*, appartenenti a specie differenti, di varia provenienza geografica. Tale caratterizzazione è stata operata attraverso uno studio delle condizioni ottimali di temperatura riscontrate per i vari isolati e dal confronto delle indicazioni ricevute con le serie climatiche trentennale delle loro regioni di provenienza.

Da questa fase della ricerca, attraverso la costruzione di un dendrogramma che ha suddiviso gli isolati in quattro principali ecotipi, sono state tratte indicazioni circa i principali parametri di riferimento, precipitazioni e temperatura, connessi alla presenza delle *Botryosphaeriaceae*. In particolare, è

stato possibile verificare che gli isolati testati sono stati reperiti in regioni in cui il clima si è evoluto in una direzione tale da causare stress di natura idrica alle piante ivi vegetanti.

L'ultima parte della ricerca si è occupata di testare alcune tecniche di biologia molecolare quali strumenti di diagnosi identificativa per le *Botryosphaeriaceae* e quali strumenti utili a ricostruire il percorso di espansione di queste.

E' stata testata la validità della tecnica di ITS-RFLP nel consentire un'identificazione rapida ed economica delle varie specie di *Botryosphaeriaceae*.

Inoltre, è stato condotto uno studio filogeografico basato sulle sequenze della regione ITS1-5.8S-ITS2 di 81 isolati afferenti alla specie *Diplodia seriata*, i cui gradi di similarità sono stati computati non solo sulla base delle sequenze, ma anche tenendo conto della latitudine di provenienza degli stessi.

In questo modo si è operato un primo studio sulla diffusione mondiale della specie indagata e si sono ottenute indicazioni sull'applicabilità di tale tecnica, attraverso un'analisi filogenetica multiloculare, per ottenere informazioni di natura ecologica.

Bibliografia

- Alves A., Correia A., Philips A. J. L. 2006. Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. *Fungal Diversity* **23**: 1-15.
- 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.
- Cesati V., De Notaris G. 1863. Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeri più o meno appartenenti al genere *Sphaeria* nell'antico significato attribuitogli da Persoon. *Commentario della Società Crittogamica Italiana* **1**: 177-240.
- 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.
- Damm U., Crous P. W., Fourie P. H. 2007a. *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* **99**: 664-680.
- Damm U., Fourie P. H., Crous P. W. 2007b. *Aplosporella prunicola*, a novel species of anamorphic *Botryosphaeriaceae*. *Fungal Diversity* **27**: 35-43.
- Denman S., Crous P. W., Taylor J. E., Kang J., 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.
- Desprez-Loustau M. L., Marçais B., Nageleisen L. M., Piou D., Vannini A. 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Sciences* **63**: 597-612.

- Jacobs K. A., Rehner S. A. 1998. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* **90**: 601-610.
- Jurc D., Ogris N., Grebenc T., Kraigher H. 2006. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing bark dieback of European hop hornbeam in Slovenia. *Plant Pathology* **55**: 299.
- Larignon P., Fulchic R., Cere L., Dubos B. 2001. Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* **40** (Supplement): S336-S342.
- Lazizzera 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.
- Linaldeddu B. T., Franceschini A., Luque J., Phillips A. J. L. 2007. First report of canker disease caused by *Botryosphaeria parva* on cork oak trees in Italy. *Plant Disease* **91**: 324.
- Moricca, S., Uccello, A., Ragazzi, A. 2010. Micocenosi endofitiche in foreste urbane sottoposte a stress ambientale. *Micologia Italiana* **39** (1): 47-56.
- Phillips A. J. L. 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* **41**: 3-18.
- 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.
- Ragazzi A., Moricca S., Dellavalle I. 1999. Water stress and the development of cankers by *Diplodia mutila* on *Quercus robur*. *Journal of Phytopathology* **147**: 425-428.
- Saccardo P. A. 1877. Fungi Veneti novi vel critici. *Michelia* **1**: 1-72.

- Sánchez M. E., Venegas J., Romero M. A., Phillips A. J. L., Trapero A. 2003. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in Southwestern Spain. *Plant Disease* **87**: 1515-1521.
- Schoeneweiss D. F. 1981. The role of environmental stress in diseases of woody plants. *Plant Disease* **65**: 308-314.
- 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., Carnegie A. J., Wingfield M. J. 2004b. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. *Studies In Mycology* **50**: 343-358.
- 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.
- Úrbez-Torres J. R., Gubler W. D. 2009. Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease* **93**: 584-592.
- von Arx J. A., Müller E. 1954. Die Gattungen der amersporen Pyrenomyceten. *Beitrag zur Kryptogamenflora der Schweiz* **11** (1): 1-434.

Sitografia

http://www.comune.milano.it/portale/wps/portal/CDM?WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/ContentLibrary/Ho%20bisogno%20di/Ho%20bisogno%20di/AreeVerdi_ParchieGiardini_Boscoincitta

<http://www.parconord.milano.it>

Capitolo 2

Analisi del processo infettivo

2.1 INTRODUZIONE

La famiglia delle *Botryosphaeriaceae* (*Ascomycota*, *Dothideomycetes*, *Botryosphaeriales*) comprende più di 2000 specie, cosmopolite, generalmente polifaghe, dall'*habitus* che può variare dal saprofitismo all'endofitismo, fino ad arrivare al parassitismo, in virtù della specie, delle condizioni fisiologiche dell'ospite e delle condizioni ambientali (Slippers *et al.*, 2007). Sul numero effettivo delle specie, comunque, vige un margine di incertezza: dall'introduzione delle tecniche molecolari basate sul DNA, quali analisi di routine, le *Botryosphaeriaceae* sono state sottoposte ad una radicale revisione tassonomica, con l'identificazione di numerose specie che per alcuni aspetti sono ancora considerate criptiche. Durante tale processo è stato deciso di mantenere un nome unico per ogni specie, superando la distinzione fra teleomorfo ed anamorfo, scegliendo (salvo rare eccezioni, come la forma tipo *Botryosphaeria dothidea*) il nome di quest'ultimo sia perché è la forma più comunemente, e spesso l'unica, osservata in natura, sia per la maggiore variabilità morfologica, che fornisce più caratteri utili per l'identificazione (Jacobs e Rehner, 1998; Denman *et al.*, 2000; Slippers *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2005; Crous *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2006; Burgess *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2008; de Wet *et al.*, 2009).

Pur essendo note da molto tempo (Cesati e De Notaris, 1863; Saccardo, 1877), è solo in tempi recenti che le *Botryosphaeriaceae* sono state collegate a stati di deperimento di specie forestali, ipotizzando il concorso dei cambiamenti climatici in atto nel passaggio dalla fase endofitica a quella parassitica (Wene e Schoeneweiss, 1980; Smith *et al.*, 1994; Ragazzi *et al.*, 1995; Ragazzi *et al.*, 2001; Desprez-Loustau *et al.*, 2006; Jurc *et al.*, 2006; Linaldeddu *et al.*, 2007).

La nostra ricerca prende spunto da un diffuso stato di deperimento dei soprassuoli arborei di due differenti parchi, siti nel Nord Italia, nella città di Milano: Parco Nord e Boscoincittà; in entrambi i parchi, nonostante le profonde differenze dovute ai siti dove insistono, alle specie presenti nei soprassuoli e alla disponibilità di acqua (Moricca *et al.*, 2010), dai primi anni 2000 si è assistito ad un repentino deperimento del soprassuolo arboreo, riguardante sia specie esotiche che autoctone, i cui sintomi, nella loro varietà, erano osservabili sia sull'apparato fogliare (microfillia, avvizzimenti, disseccamenti ecc.) che sugli organi legnosi

(cancri corticali, branche e rami morti, essudati sottocorticali ecc.). Da indagini preliminari sulla comunità endofitica è emerso che, in entrambi i casi di studio, la presenza di specie appartenenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae* era correlata allo stato di sofferenza delle piante (Turco *et al.*, 2006; Moricca *et al.*, 2010).

Il presente studio si prefigge di analizzare alcuni aspetti del processo infettivo di tre fra le più importanti specie di *Botryosphaeriaceae* isolate all'interno del Parco Nord. L'attenzione viene posta all'ospite, al microrganismo ed alla componente abiotica.

2.2 MATERIALI E METODI

2.2.1 Infezione artificiale

Le infezioni artificiali sono state condotte, in pieno campo, in parcelle sperimentali site nel Parco Nord, negli anni 2007 e 2009; in entrambi i casi, il periodo di sperimentazione si è protratto da maggio a settembre, nel pieno della stagione vegetativa. Sono stati utilizzati gli isolati B7 (*Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not.), BA8 (*Diplodia seriata* De Not.) e BA20 (*Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & Phillips), reperiti esclusivamente nel Parco Nord, per evitare l'introduzione di individui alieni alla micocenosi presente nel luogo di sperimentazione (Tab.1).

In entrambe le prove le piante ospiti erano state messe a dimora durante la stagione vegetativa dell'anno precedente.

Le prove del 2007 sono state condotte su semenzali di 2 anni di *Acer platanoides* L. e *Quercus robur* L. (15 piante per specie), sulle quali è stato inoculato l'isolato B7 (*B. dothidea*), secondo lo schema riportato in Fig. 1; essendo questa una prova preliminare, la scelta dell'isolato da testare è stata limitata fra quelli appartenenti alla specie che risulta più diffusa nel parco.

Le specie ospite utilizzate nelle prove del 2009, anche in questo caso semenzali di 2 anni, sono state *Acer campestre* L., *Carpinus betulus* L., *Fraxinus excelsior* L. e *Quercus cerris* L. Le infezioni sono state eseguite con gli isolati B7, BA8 e BA20 (inoculati singolarmente, su 10 piante per ogni specie ospite) e con una miscela dei tre isolati (5 piante per ogni specie ospite), secondo lo schema di impianto riportato in Fig. 2; la scelta di utilizzare l'isolato B7 è stata operata con l'intento di dare continuità alle prove svolte nel 2007. La scelta degli isolati BA8 e BA20 è dipesa, per il primo, dall'abbondante presenza nell'area di studio (Moricca *et al.*, 2010), per il secondo dalle sempre più frequenti segnalazioni che lo accostano a deperimenti e morie di piante arboree (Linaldeddu *et al.*, 2007; Zea-Bonilla *et al.*, 2007; Javier-Alva *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010).

In entrambe le prove, l'inoculazione degli isolati, previa rimozione di un tassello di ritidoma, tramite un foratappi del diametro di 5 mm, dal fusto delle

piante ospiti, è stata condotta mettendo in contatto un tassello di micelio con il cambio; i tasselli miceliari sono stati ottenuti dalla parte marginale di colonie coltivate su PDA (15 ml per piastra) ed allevate al buio, in termostato a 25°C, per una settimana; detti tasselli sono stati ottenuti utilizzando un foratappi delle medesime dimensioni di quello usato per asportare la porzione di ritidoma dalle piante, in modo da ottenere porzioni di micelio di dimensioni standardizzate ed una perfetta aderenza fra la superficie di cambio esposta e quella di micelio postavi a contatto. Per inoculare la miscela dei tre isolati si è proceduto nel modo seguente: sono state pesate 5 piastre per isolato, ottenute con la modalità sopra descritta; dal peso medio di queste è stato ricavato il peso medio dei tasselli utilizzati per l'inoculazione (circa 1 g.); nella preparazione della miscela sono stati pesati 15 g di ciascun isolato (al netto del peso della piastra Petri, ma compreso di PDA) ed il tutto è stato miscelato all'interno di un contenitore sterile; della miscela ottenuta sono state preparate delle aliquote di 1 g. (equivalenti al peso di un singolo tassello) che sono state poi apposte sulle lesioni precedentemente ricavate sui fusti dei semenzali. Questa tesi è stata approntata per osservare, *in planta*, il tipo di interazione che vi può essere fra le diverse specie di *Botryosphaeriaceae* coesistenti negli stessi tessuti.

Le tesi di controllo sono state trattate con lo stesso protocollo, ma alle lesioni sono stati applicati tasselli di PDA sterile.

Per mantenere un elevato tasso di umidità, che permettesse il successo dell'infezione, la lesione ed il tassello di micelio sono stati protetti con cotone idrofobo, inumidito con acqua distillata sterile, e sigillati con parafilm; le protezioni nei punti di inoculo sono state rimosse dopo 10 giorni.

Periodicamente, ad intervalli compresi fra 15 e 30 giorni, è stata misurata la lunghezza delle alterazioni esterne sulle piante (depressioni della corteccia, alterazioni del colore), o delle eventuali necrosi corticali sviluppatesi, parametro quest'ultimo, utilizzato per la stima della virulenza degli isolati.

Alla fine di ciascuna prova i semenzali inoculati sono stati trasportati in laboratorio. Nel rispetto dei Postulati di Koch, dai tessuti sintomatici delle piante inoculate sono stati effettuati degli isolamenti, per verificare la presenza del microrganismo inoculato. Gli isolamenti sono stati effettuati entro due settimane dalla fine della sperimentazione. Per ogni tesi sono stati selezionati 3 campioni e,

per ognuno di essi, sono state seminate 3 piastre contenenti PDA (5 frammenti a piastra, prelevati dalle zone di margine fra il tessuto legnoso imbrunito e quello sano).

2.2.2. *Raccolta dei dati climatici*

Una stazione climatica dell'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Lombardia (ARPA Lombardia) è stata installata all'interno del parco, a pochi metri dal campo sperimentale, e dalla quale sono stati ottenuti i dati riguardanti le precipitazioni mensili e l'andamento medio quotidiano di temperatura ed umidità atmosferica, riferiti ai periodi di sperimentazione. Tali dati sono stati reperiti dal sito dell'ARPA Lombardia, tramite l'apposito form on line (<http://ita.arpalombardia.it/meteo/dati/riciesta.asp>), e successivamente elaborati con l'ausilio di un foglio elettronico. L'andamento dei parametri climatici stagionali è stato sovrapposto a quello dell'evoluzione delle lesioni dei semenzali inoculati.

2.2.3 *Analisi istologiche*

Una parte dei tessuti legnosi provenienti da campioni di entrambe le prove, ed utilizzati per i reisolamenti, è stata sottoposta ad analisi istologiche. Dai campioni, infetti artificialmente, mediante un criostato con microtomo, si sono ottenute sezioni trasversali a spessore variabile, compreso fra 20 e 50 μm , che successivamente sono state fissate in F.A.A. (10% formaldeide, 50% alcol etilico al 95%, 5% acido acetico glaciale, 35% acqua distillata). Le sezioni sono state, quindi, sottoposte ad una tecnica di decolorazione e successiva colorazione di contrasto, messa a punto per tessuti fogliari (Burruano *et al.*, 2004) e opportunamente modificata, di seguito riportata: si è proceduto con l'iniziale ebollizione delle sezioni in KOH al 10% per circa un'ora, seguita da lavaggio in acqua distillata, allo scopo di degradare le pareti ed eliminarne i pigmenti vegetali; successivamente le sezioni sono state immerse in H_2O_2 al 30% a temperatura ambiente (30-60 minuti), sino a completa decolorazione dei tessuti. Le sezioni microtomiche sono state poi ripetutamente lavate in acqua distillata,

acidificate mediante immersione in HCl al 10% per un minuto circa ed infine sottoposti a ebollizione in una soluzione di Lattofenolo e Fucsina acida (0,1%), seguita da lavaggi a freddo per eliminare eventuali eccessi di colorante. Le sezioni così trattate sono state osservate al microscopio ottico (Axiophot ZEISS) in contrasto interferenziale.

Questa parte dell'indagine è stata svolta presso i laboratori del S.En.Fi.Mi.Zo (Dipartimento di Scienze Entomologiche, Fitopatologiche, Microbiologiche agrarie e Zootecniche) dell'Università degli Studi di Palermo, sotto la supervisione della Prof. Santella Burruano e la collaborazione del Dr. Gaetano Conigliaro.

2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.3.1 Prove di infezione artificiale – Anno 2007

Le due specie ospite hanno avuto risposte sensibilmente diverse nei confronti dell'isolato di *B. dothidea* (B7) saggiato: inizialmente, a 48 giorni dall'inoculazione, *A. platanoides* si è dimostrato più suscettibile, salvo poi rispondere progressivamente all'infezione, fino alla completa cicatrizzazione dei cancri causati dal fungo.

Al primo rilievo, *Q. robur* presentava lesioni di minore entità rispetto ad *A. platanoides* (rispettivamente, 14,6 mm e 21,5 mm di lunghezza media). Inizialmente apparsa come la specie meno suscettibile, la farnia ha mostrato segni di sofferenza durante la parte centrale della sperimentazione (luglio-agosto), nel periodo cioè immediatamente successivo al picco massimo delle temperature ed a quello minimo dell'umidità atmosferica (Fig. 3). È possibile notare, però, che nel periodo centrale della sperimentazione, anche i semenzali utilizzati come controllo negativo hanno incontrato difficoltà nel cicatrizzare la lesione, segno che la risposta fisiologica delle piante è stata influenzata da fattori indipendenti dall'azione di *B. dothidea*. Il lungo periodo siccitoso, da maggio a luglio (Fig. 4), dovuto alle scarse precipitazioni ed aggravato dal progressivo innalzamento stagionale della temperatura, e dal conseguente abbassamento dell'umidità atmosferica, ha influenzato lo stato delle lesioni. Una moderata piovosità nel mese di agosto e precipitazioni eccezionali nel mese di settembre, circa 200 mm, a fronte di una piovosità media annuale assestata su poco più di 800 mm (Sanesi *et al.*, 2007), corrispondono con la piena cicatrizzazione delle lesioni in tutte le tesi, ad eccezione degli esemplari di *Q. robur* inoculati con *B. dothidea*, che comunque sono riusciti a ridurre sensibilmente l'entità dei danni derivati dall'infezione (nell'ultimo mese di sperimentazione, la lunghezza media delle lesioni è passata da circa 15 mm a 2,5 mm).

Le capacità patogenetiche dell'isolato utilizzato si sono manifestate, quindi, in un periodo in cui le piante ospiti erano sottoposte a condizioni di stress idrico (temperature in aumento, umidità atmosferica in diminuzione, periodo siccitoso),

fatto che ha condizionato il processo di cicatrizzazione anche negli ospiti utilizzati come controllo negativo.

Le differenti risposte delle specie ospite all'agente infettivo sono state evidenziate tramite l'analisi istologica dei campioni inoculati: in *A. platanoides* (Fig. 5 A: 1, 2), la porzione di tessuto necrotizzata risulta essere ben circoscritta dal processo di cicatrizzazione della pianta; i campioni di *Q. robur* (Fig. 5 B: 1, 2) mostrano, in sezione, tessuti alterati su un'area più estesa rispetto a quella osservabile sulla corteccia. Risulta perciò evidente che la reale entità delle infezioni di *B. dothidea* su *Q. robur* possa essere sottostimata basandosi esclusivamente sull'osservazione delle aree necrotiche a livello corticale.

Dai tessuti di entrambe le specie ospite, è stato possibile reisolare il micelio di *B. dothidea* (da *Q. robur* nell'86% dei casi, 71% in *A. platanoides*), rispettando così i Postulati di Koch.

2.3.2 Prove di infezione artificiale – Anno 2009

La Fig. 6 riporta, sinteticamente, quanto osservato durante il periodo di sperimentazione: dai grafici che vi sono riportati si può osservare che, delle quattro specie ospiti testate (*A. campestre*, *C. betulus*, *F. excelsior* e *Q. cerris*), il frassino ha mostrato capacità superiori nel contenere le infezioni di tutti gli isolati inoculati (la lunghezza delle lesioni è stata sempre inferiore ai 15 mm). I semenzali di acero campestre sono riusciti a ben contrastare il processo infettivo, eccezion fatta per quei campioni inoculati con *N. parvum* (BA20), che ha causato lesioni lunghe fino ad oltre i 40 mm.

Confrontando questi risultati con quelli ottenuti dalla prova precedente (anno 2007), come elemento comune emerge il fatto che entrambe le specie del genere *Acer* saggiate abbiano mostrato una identica capacità nel reagire alle infezioni delle *Botryosphaeriaceae*. All'interno del genere *Quercus*, come già osservato durante le prove del 2007, anche *Q. cerris* ha mostrato una certa suscettibilità nei confronti dei tre isolati di *Botryosphaeriaceae* saggiati. Dati analoghi sono emersi anche per *C. betulus*.

Per quanto riguarda gli isolati testati, *N. parvum* si è dimostrato essere il più virulento, causando estesi cancri corticali su tutte le specie ospiti (oltre 40 mm su

A. campestre, oltre 60 mm su *C. betulus* e *Q. cerris*), con l'eccezione, come si è detto, di *F. excelsior*, cancri che non sono stati cicatrizzati prima della fine della prova (30 settembre); inoltre, l'evoluzione delle lesioni sembra seguire l'andamento stagionale della temperatura e, in maniera speculare, dell'umidità atmosferica. Gli isolati di *B. dothidea* e *D. seriata* utilizzati hanno mostrato una virulenza simile, sensibilmente inferiore a quella mostrata dall'isolato BA20 di *N. parvum*, ma l'evoluzione delle lesioni sembra essere indipendente dai parametri meteorologici precedentemente citati. Le tesi inoculate con la miscela degli isolati hanno confermato la capacità di *F. excelsior* di contenere le infezioni da *Botryosphaeriaceae*; lo stesso, seppur in tono minore, ha mostrato *A. campestre*. L'entità delle dimensioni delle lesioni procurate, in tutte le specie ospite testate, è stata minore rispetto a quella causata da *N. parvum*; la progressione stagionale delle lesioni provocate dalla miscela degli isolati, seppur provocando danni minori, sembra avere delle similitudini con quella degli ospiti inoculati con *N. parvum*. Quanto osservato potrebbe suggerire dei rapporti di antagonismo fra i diversi isolati nel colonizzare l'ospite.

Al termine della sperimentazione (a circa 150 giorni dall'inoculazione), le lesioni sui semenzali sono state osservate nella sezione longitudinale dei fusticini, come nella precedente prova.

Su *A. campestre*, le alterazioni su fusto dovute a *N. parvum* avevano una lunghezza media di circa 27 mm; osservando i campioni in sezione, si è visto come questo valore sottostimi la reale entità dell'infezione, in quanto aree di tessuto alterato erano visibili anche al di sotto di tessuti esternamente sani (Fig. 7: A1, A2). I campioni inoculati con la miscela dei tre isolati, pur arrivando a sviluppare lesioni lunghe fino a 20 mm, a fine sperimentazione presentavano i punti di inoculo perfettamente cicatrizzati; analizzando i campioni in sezione, però, sono stati osservati tessuti necrotici su porzioni lunghe fino a 25-30 mm (Fig. 7: B1, B2). Le infezioni da *B. dothidea* e *D. seriata* sono state ben circoscritte, lasciando sul campione danni paragonabili a quelli sulle tesi di controllo (Fig. 7: C1, C2, D1, D2, E1, E2).

Su *C. betulus*, *N. parvum* e la miscela degli isolati hanno causato lesioni che si sono mantenute di elevate dimensioni (rispettivamente, 56 e 26 mm di lunghezza) fino al termine del periodo di sperimentazione; in sezione è stato

possibile osservare una certa corrispondenza fra le lesioni visibili esternamente ed i tessuti legnosi necrotizzati, anche se le infezioni hanno seguito percorsi longitudinali sul fusto, addentrandosi poco in senso radiale (Fig. 8: A1, A2, B1, B2). Le lesioni da *B. dothidea*, per quanto apparissero completamente contenute dalla reazione della pianta, in sezione longitudinale presentavano ampie aree necrotiche, estese in senso radiale fin quasi al midollo del fusto (Fig. 8: C1, C2). Le infezioni da *D. seriata* sono state circoscritte senza gravi danni ai tessuti legnosi, come su *A. campestre* (Fig. 8: D1, D2).

Su *Q. cerris* l'isolato di *N. parvum* è riuscito talvolta a disorganizzare i tessuti legnosi intorno alla zona infetta, oltre a causare le lesioni di entità maggiore (circa 60 mm di lunghezza media) (Fig. 9: A1, A2); la miscela degli isolati, pur causando infezioni di notevole entità (intorno ai 20 mm di lunghezza), non è riuscita a provocare in nessun caso tale tipo di danno (Fig. 9: B1, B2); *B. dothidea* e *D. seriata* sono state capaci di estendere l'infezione leggermente oltre il punto di inoculo, ma l'azione di entrambe è stata bloccata dalla reazione della pianta. (Fig. 9: C1, C2, D1, D2).

2.3.3 Analisi istologiche

L'analisi delle sezioni microtomiche ha permesso di osservare come *B. dothidea* prediliga occupare gli spazi intercellulari dei tessuti legnosi, pur invadendo anche il lume dei vasi, stimolando conseguentemente fenomeni di tillosi e gommosi da parte della pianta ospite; inoltre, come già precedentemente riportato in letteratura per altre specie (Atia *et al.*, 2003), la presenza del micelio causa una disorganizzazione dei tessuti infetti che porta prima alla perdita di funzionalità e successivamente alla necrosi (Fig. 10: A, B, C). Comportamento analogo ha *D. seriata* che comporta un maggiore numero di vasi occlusi dalla pianta, in risposta all'infezione; occlusioni che limitano la diffusione del patogeno all'interno dell'ospite (Fig. 10: D).

La scarsa virulenza mostrata dall'isolato BA8 coincide con una maggiore opera di contenimento, da parte dell'ospite, nei suoi confronti, riuscendo quest'ultimo prontamente ad arginare la progressione dell'infezione, non appena a contatto col micelio (Fig. 10: E). *N. parvum* ha anch'esso un andamento

intercellulare, non occupa il lume dei vasi, come invece è capace di fare *B. dothidea*, ma ne circonda le pareti cellulari e ne causa il collasso (Fig. 10: F). Questo potrebbe spiegare la differente influenza del regime pluviometrico nei confronti dei due isolati: le tillosi e le gommosi di reazione all'infezione di *B. dothidea* occludono un certo numero di vasi, che può diventare significativo nel momento di scarso approvvigionamento idrico della pianta, ma che contengono allo stesso tempo il progredire dell'infezione da parte del micelio; in periodi siccitosi, alcuni meccanismi difensivi di natura biochimica della pianta vengono meno a seguito di una sfasatura del metabolismo primario, derivante dalla risposta che la pianta assume per contrastare lo stress idrico e che portano a ripercussioni sulla fotosintesi; da questa situazione *B. dothidea* può trarre vantaggio ed estendere l'infezione. *N. parvum*, avendo un decorso essenzialmente intercellulare, riesce ad evitare quelle difese della pianta a tutela dei vasi ed estendere l'infezione anche quando l'ospite non si trova a fronteggiare un deficit nell'approvvigionamento idrico; inoltre, causando il collasso dei tessuti vascolari, di fatto determina nella pianta un deficit idrico indotto, indipendente dalla piovosità stagionale, ingenerando una minore risposta nel sistema difensivo e favorendo ulteriormente l'infezione del parassita.

CONCLUSIONI

L'interazione fra *Botryosphaeriaceae* e piante forestali ha mostrato una natura complessa, nella quale hanno pari importanza l'entità infettiva, l'ospite, l'ambiente e l'interazione con altri microrganismi.

Osservando il differente comportamento mostrato dalle specie testate, *B. dothidea* sembra essere un parassita opportunisto che trae vantaggio dallo stato di deficit idrico a cui va incontro l'ospite, a seconda della suscettibilità di quest'ultimo. Confrontando i dati pluviometrici registrati nelle due esperienze (2007 e 2009) è possibile vedere che la quantità di pioggia complessivamente caduta durante le prove è stata maggiore nel 2007, ma che la distribuzione è stata più uniforme nel 2009. Ciò risulta chiaro se si considera che, dei 245 mm di pioggia complessivamente caduti durante la prova del 2007, 203 mm si sono avuti nel solo mese di settembre (Fig. 11); questo dato può, in parte, spiegare la minore virulenza mostrata da *B. dothidea* nel corso della seconda prova di infezione artificiale, nella quale l'apporto idrico dovuto alle precipitazioni è stato più costante.

D. seriata, nella prova del 2009, ha mostrato un comportamento simile a quello di *B. dothidea*, dimostrandosi al più un parassita opportunisto come quest'ultimo. Al contrario, *N. parvum*, denotando una maggiore virulenza, si configura più come un patogeno primario.

Per quanto riguarda gli ospiti, oltre all'elevata resistenza riscontrata in *F. excelsior*, il genere *Acer* è risultato suscettibile all'azione delle *Botryosphaeriaceae*, mostrando però delle buone capacità di contenimento quantomeno nei confronti delle entità meno virulente (*B. dothidea* e *D. seriata*). *C. betulus* e *Q. cerris* si sono mostrati molto suscettibili all'azione di *N. parvum*.

Riguardo al genere *Quercus*, inoltre, anche in virtù dei dati raccolti nel 2007 su *Q. robur*, è stata ulteriormente confermata una suscettibilità, estesa a più specie, nei confronti delle *Botryosphaeriaceae*, già precedentemente osservata (Ragazzi *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2003; Linaldeddu *et al.*, 2007) e che nel presente studio sembra influenzata dall'andamento climatico, in particolar modo per quanto riguarda le precipitazioni.

Lo studio del processo infettivo delle *Botryosphaeriaceae*, parzialmente avviato in questa indagine, risulta utile a capire come queste manifestino la loro virulenza, a meglio comprenderne la biologia e, in definitiva, a meglio inquadrarle quali patogeni di piante forestali. Questo non può prescindere da uno scrupoloso esame delle componenti abiotiche che possono influenzare il rapporto ospite-parassita. Inoltre, in base a quanto osservato nelle inoculazioni miste, notevole importanza ha lo studio dell'interazione *in planta* fra le diverse specie di *Botryosphaeriaceae* e, eventualmente, fra queste ed altri microrganismi endofiti.

Considerando la presenza cosmopolita di questi microrganismi, comprendere quali siano le condizioni ambientali che ne favoriscono l'*habitus* patogenetico, anche e soprattutto in relazione ai cambiamenti climatici in atto, potrà consentire delle scelte ottimali nei nuovi impianti, basate sulle esigenze climatiche delle specie arboree, e sulla risposta delle stesse alle diverse specie di *Botryosphaeriaceae*.

BIBLIOGRAFIA

- Alves A., Correia A., Philips A. J. L. 2006. Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. *Fungal Diversity* **23**: 1-15.
- 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.
- Atia M. M. M., Aly A. Z., Tohamy M. R. A., El-Shimy H., Kamhawy M. A. 2003. Histopathological studies on grapevine die-back. *Journal of Plant Disease and Protection* **110**: 131-142.
- Burgess T. I., Barber P. A., Mohali S., Pegg G., de Beer W., Wingfield M. J. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* **98**: 423-435.
- Burruano S., Lo Piccolo S., Alfonzo A. Torta L. 2004. Evoluzione di *Acremonium* sp., endofita in tessuti fogliari di *Vitis vinifera*, durante la patogenesi di *Plasmopara viticola*. *Micologia Italiana* **33** (2): 42-45.
- Cesati V., De Notaris G. 1863. Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeri più o meno appartenenti al genere *Sphaeria* nell'antico significato attribuitogli da Persoon. *Commentario della Società Crittogamica Italiana* **1**: 177-240.
- Conigliaro G., Burruano S., Laviola C. 1996. Visualizzazione delle strutture di *Plasmopara viticola* in tessuti non sezionati di *Vitis vinifera*. *Informatore Fitopatologico* **11**: 41-45.
- 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.
- de Wet J., Slippers B., Preisig O., Wingfield B. D., Tsopelas P., Wingfield M. J. 2009. Molecular and morphological characterization of *Dothiorella casuarini* sp. nov. and other *Botryosphaeriaceae* with diplodia-like conidia. *Mycologia* **101**: 503-511.
- Denman S., Crous P. W., Taylor J. E., Kang J., 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.
- Desprez-Loustau M. L., Marçais B., Nageleisen L. M., Piou D., Vannini A. 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Sciences* **63**: 597-612.
- Jacobs K. A., Rehner S. A. 1998. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* **90**: 601-610.
- Javier-Alva J., Gramaje D., Alvarez L. A., Armengol J. 2009. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with dieback of mango trees in Peru. *Plant Disease* **93**: 426.
- Jurc D., Ogris N., Grebenc T., Kraigher H. 2006. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing bark dieback of European hop hornbeam in Slovenia. *Plant Pathology* **55**: 299.
- Li S. B., Li J. Z., Lu Z. H., Wang J. H., Zhang H. 2010. First report of *Neofusicoccum parvum* causing dieback disease of chinese weeping cypress in China. *Plant Disease* **94**: 641.
- Linaldeddu B. T., Franceschini A., Luque J., Phillips A. J. L. 2007. First report of canker disease caused by *Botryosphaeria parva* on cork oak trees in Italy. *Plant Disease* **91**: 324.
- Moricca, S., Uccello, A., Ragazzi, A. 2010. Micocenosi endofitiche in foreste urbane sottoposte a stress ambientale. *Micologia Italiana* **39** (1): 47-56.
- Phillips A. J., 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.
- Ragazzi A., Vagniluca S., Moricca S. 1995. European expansion of oak decline: involved microorganisms and methodological approaches. *Phytopathologia Mediterranea* **34**: 207-226.

- Ragazzi A., Moricca S., Dellavalle I. 1999. Water stress and the development of cankers by *Diplodia mutila* on *Quercus robur*. *Journal of Phytopathology* **147**: 425-428.
- Ragazzi A., Moricca S., Capretti P., Dellavalle I., Mancini F., Turco E. 2001. Endophytic fungi in *Quercus cerris*: isolation frequency in relation to phenological phase, tree health and the organ affected. *Phytopathologia Mediterranea* **40**: 165-171.
- Saccardo P. A. 1877. Fungi Veneti novi vel critici. *Michelia* **1**: 1-72.
- Sanesi G., Laforteza R., Marziliano P. A., Ragazzi A., Mariani L. 2007. Assessing the current status of urban forest resources in the context of Parco Nord, Milan, Italy. *Landscape and Ecological Engineering* **3**: 187-198.
- Sánchez M. E., Venegas J., Romero M. A., Phillips A. J. L., Trapero A. 2003. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in Southwestern Spain. *Plant Disease* **87**: 1515-1521.
- Shen Y. M., Chao C. H., Liu H. L. 2010. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with stem canker and dieback of asian pear trees in Taiwan. *Plant Disease* **94**: 1062.
- Slippers B., Crous P. W., Denman S., Coutinho T. A., Wingfield B. D., Wingfield M. J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* **96**: 83-101.
- 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.
- Smith H., Kemp G. H. J., Wingfield M. J. 1994. Canker and die-back of *Eucalyptus* in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Pathology* **43**: 1031-1034.
- Turco E., Marianelli L., Vizzuso C., Ragazzi A., Gini R., Selleri B., Tucci R. 2006. First report of *Botryosphaeria dothidea* on sycamore, red oak, and English oak in Northwestern Italy. *Plant Disease*. **90**: 1106.
- Wene E. G., Schoeneweiss D. F. 1980. Localized freezing predisposition to *Botryosphaeria* canker in differentially frozen woody stems. *Canadian Journal of Botany* **58**: 1455-1458.

Zea-Bonilla T., González-Sánchez M. A., Martín- Sánchez, Pérez-Jiménez R. M. 2007. Avocado dieback caused by *Neofusicoccum parvum* in the Andalusia region, Spain. *Plant Disease* **91**: 1052.

Capitolo 2

Appendice

Tab. 1 – Ceppi di *Botryosphaeriaceae* utilizzati nelle prove di infezione

Ceppo	Specie fungina	Provenienza	Ospite	Isolato da	Accesso GenBank	
					ITS	EF-1 α
B7	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Milano (Italia)	<i>Quercus robur</i>	E. Turco	DQ198267	
BA8	<i>Diplodia seriata</i>	Milano (Italia)	<i>Quercus rubra</i>	A. Uccello	In attesa del numero di accesso	
BA20	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Milano (Italia)	<i>Quercus robur</i>	A. Uccello	In attesa del numero di accesso	In attesa del numero di accesso

Prove di infezione artificiale 2007

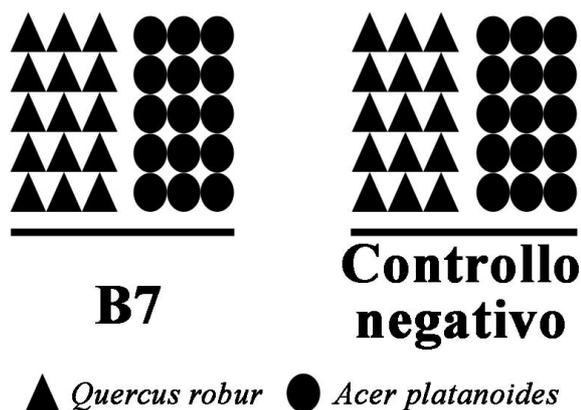


Fig. 1 – Schema delle parcelle test ove sono state effettuate, nel 2007, le infezioni artificiali.

Prove di infezione artificiale - 2009

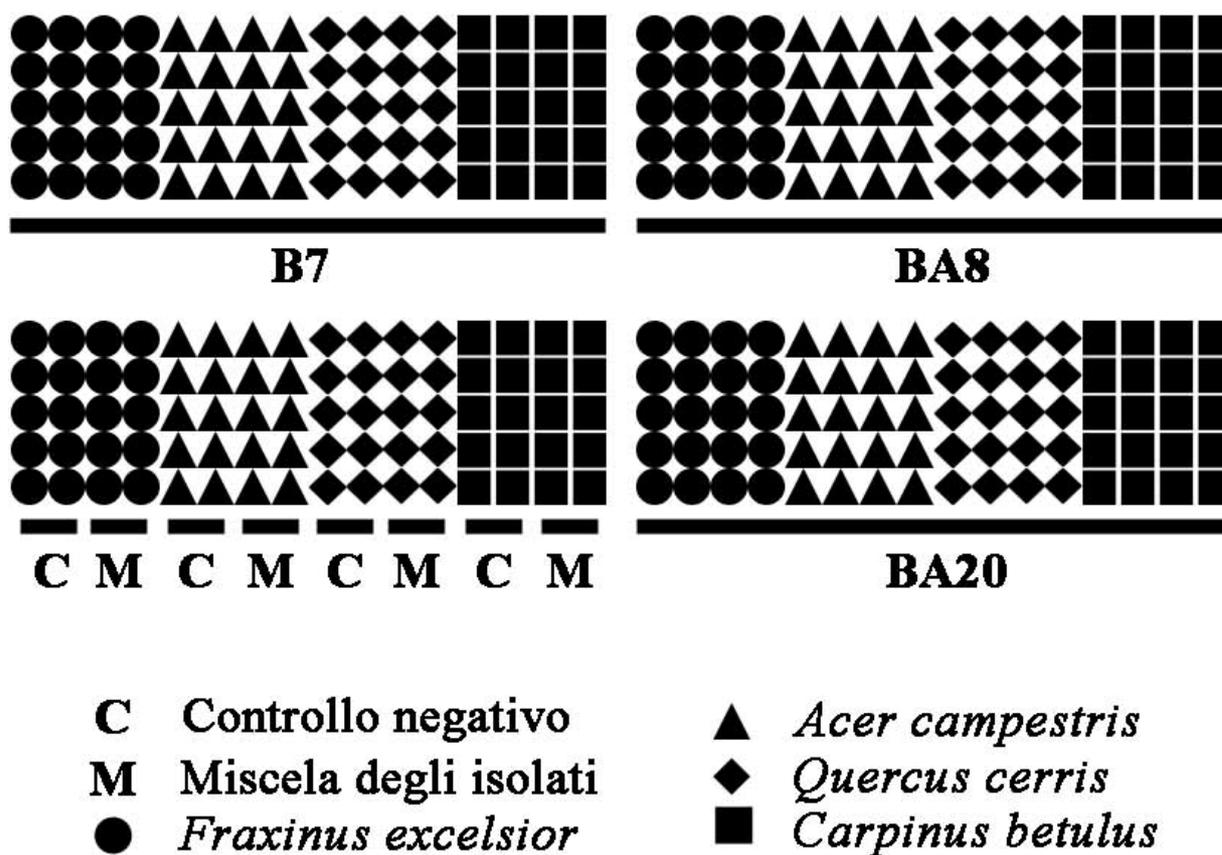


Fig. 2 – Schema delle parcelle test ove sono state effettuate, nel 2009, le infezioni artificiali.

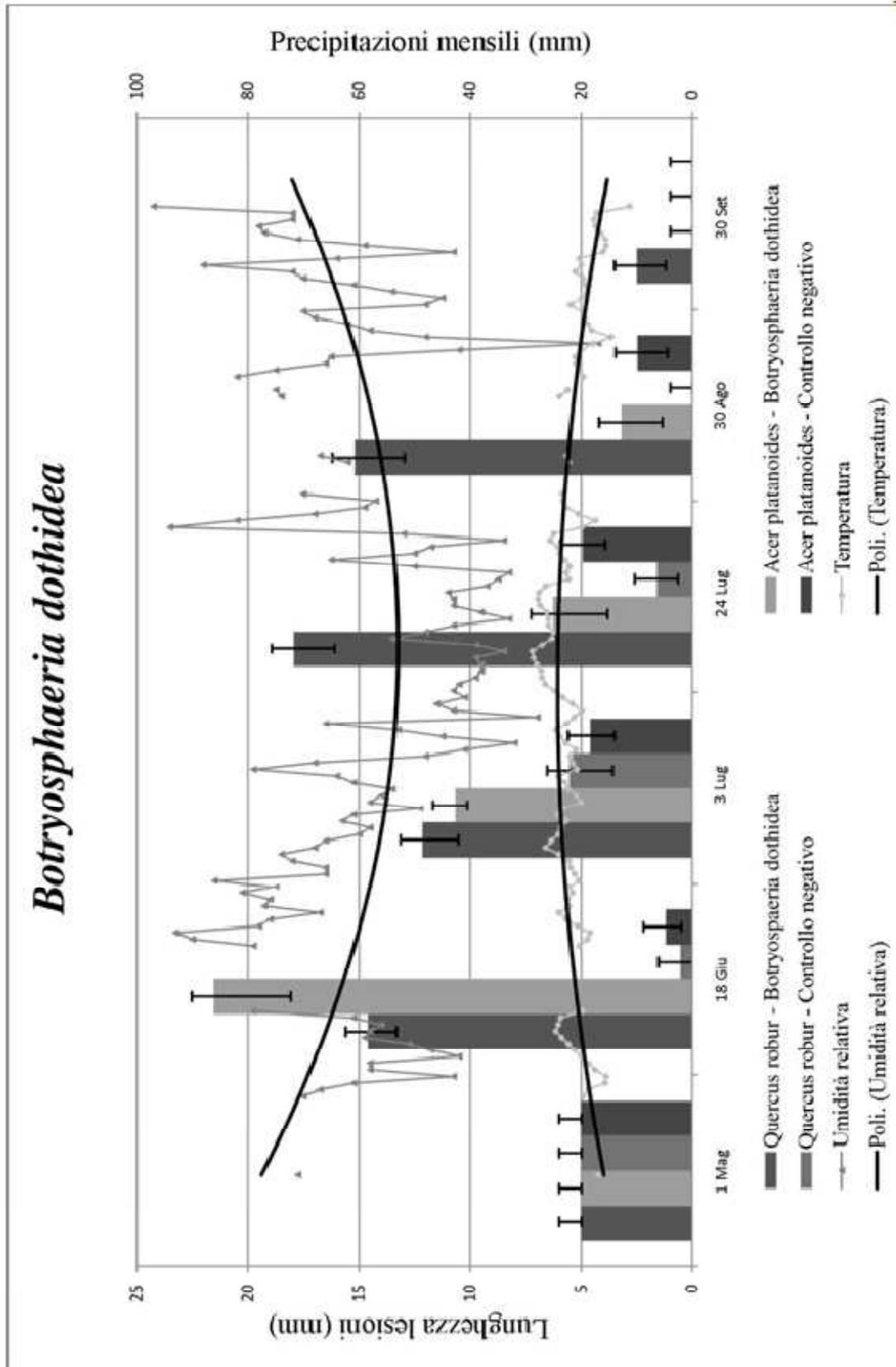


Fig. 3 - Evoluzione delle dimensioni delle lesioni causate dall'isolato di *Botryosphaeria dothidea* (B7) in funzione dell'andamento stagionale della temperatura media giornaliera e dell'umidità atmosferica media giornaliera. (Prova 2007).

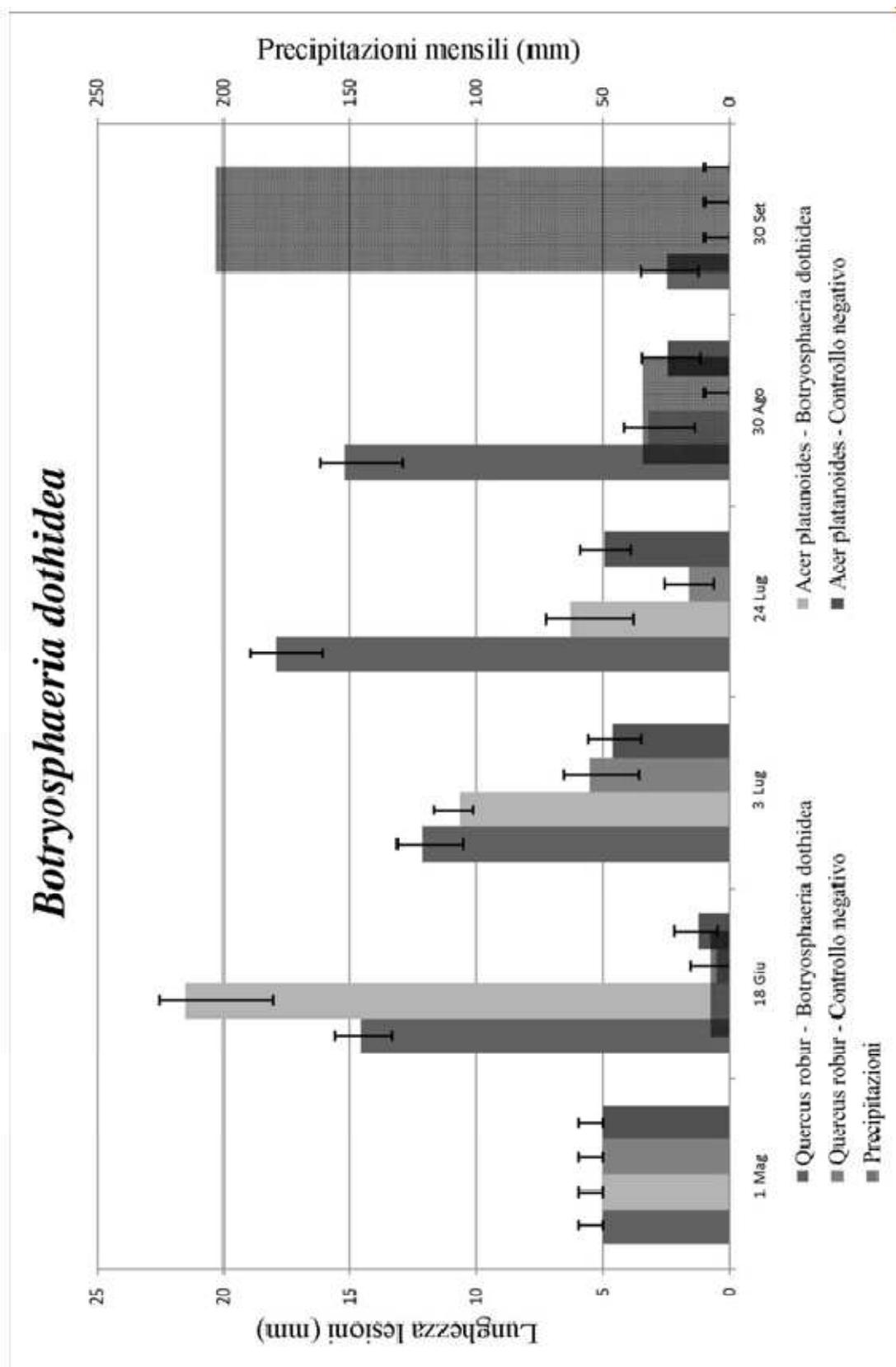


Fig. 4-- Evoluzione delle dimensioni delle lesioni causate dall'isolato di *Botryosphaeria dothidea* (B7) in funzione della piovosità mensile (Prova 2007). 5

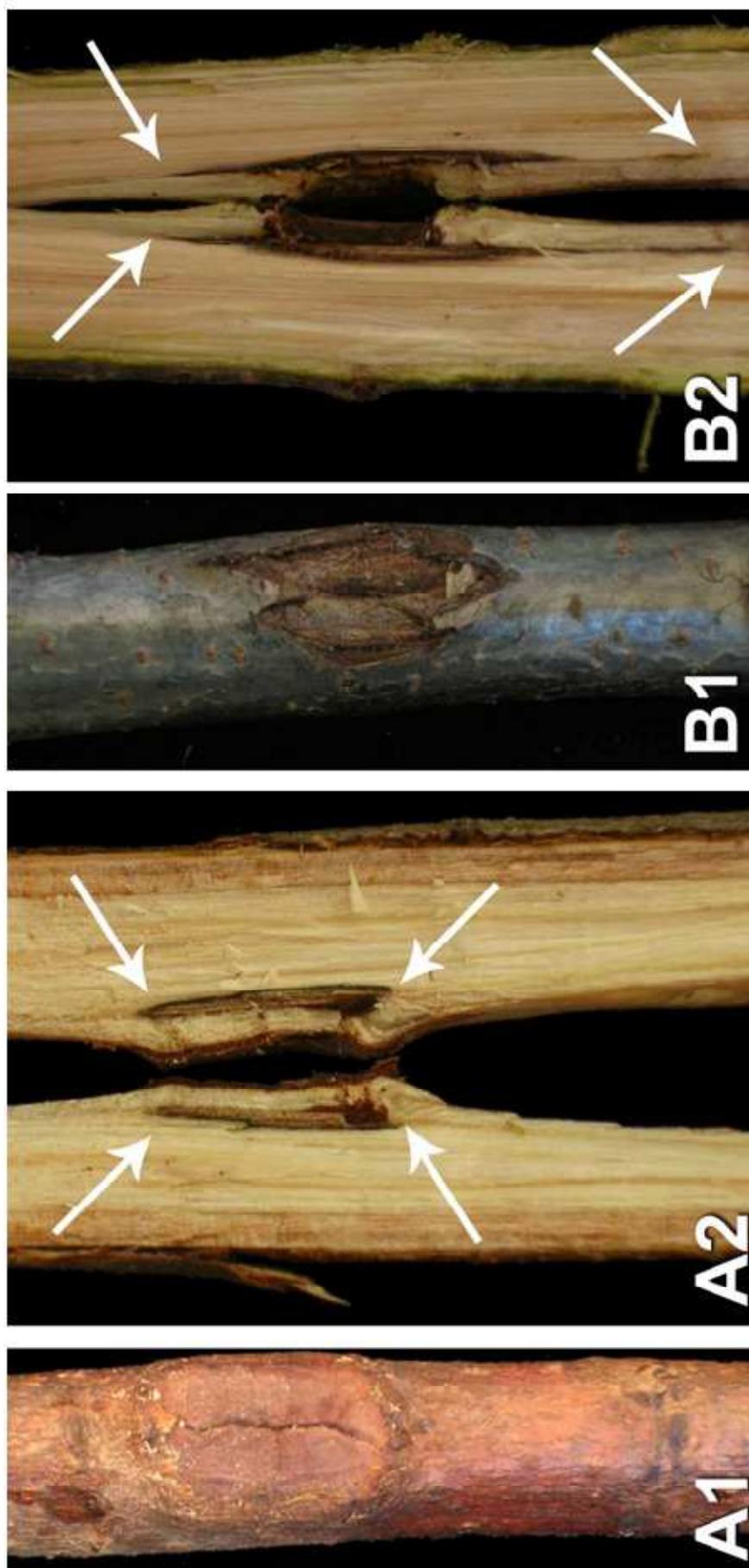


Fig. 5 – Lesioni causate, dopo 150 giorni dall'inoculazione, da *Botryosphaeria dothidea* sui tessuti legnosi dei semenzali inoculati nel 2007. A1 : callo cicatriziale, su *Acer platanoides*, a totale chiusura della lesione; A2: campione A1 visto in sezione, le frecce indicano l'estensione dell'area necrotica; B1: lesione residua su un campione di *Quercus robur*, al termine della sperimentazione (150 giorni dopo l'inoculazione); B2: campione B1 visto in sezione, le frecce indicano che l'area necrotica si estende oltre la porzione osservabile sul campione esternamente.

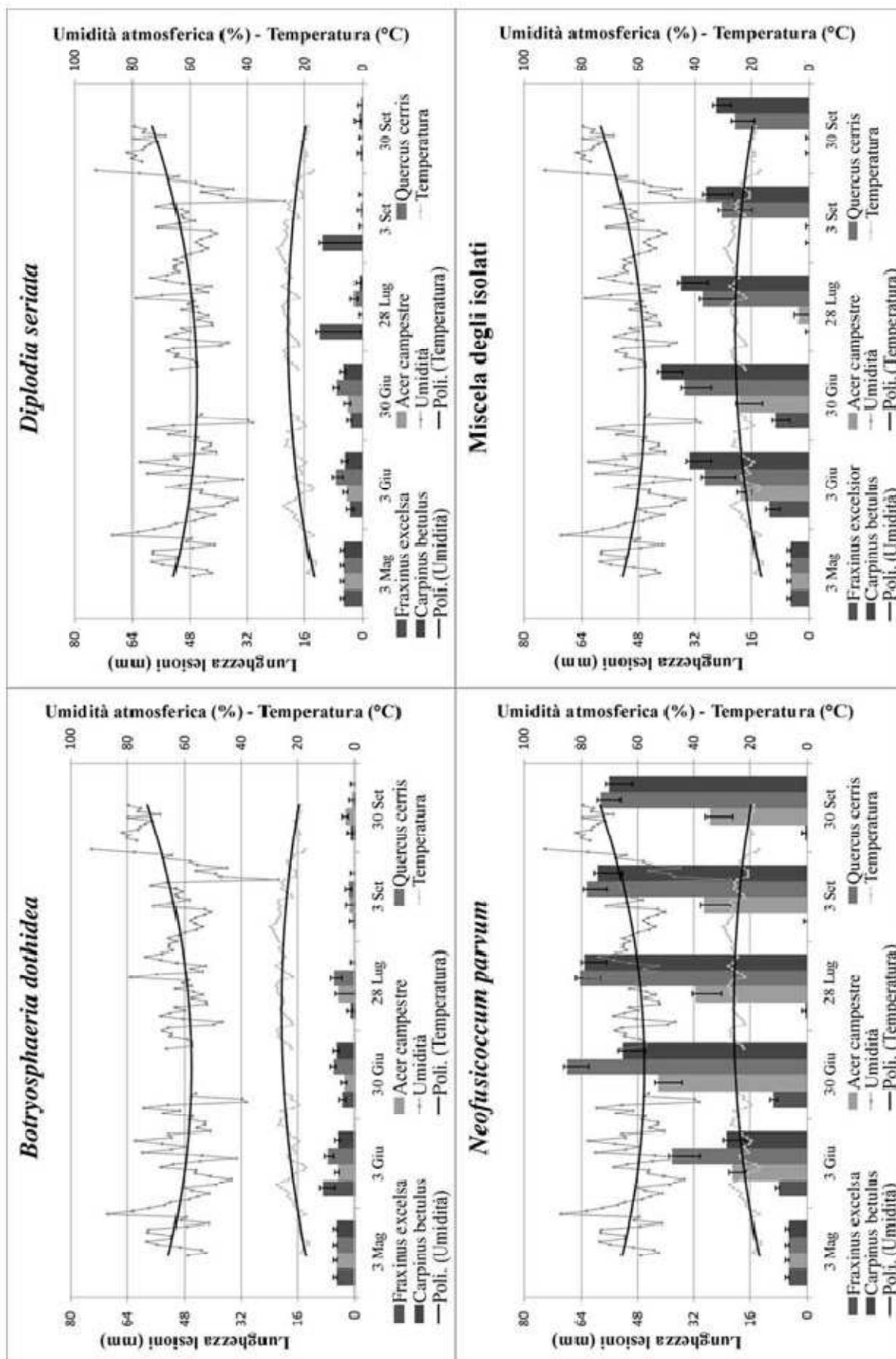


Fig. 6 – Evoluzione e delle dimensioni delle lesioni causate da ciascun isolato e dalla miscela dei tre isolati inoculati, nel 2009, contemporaneamente

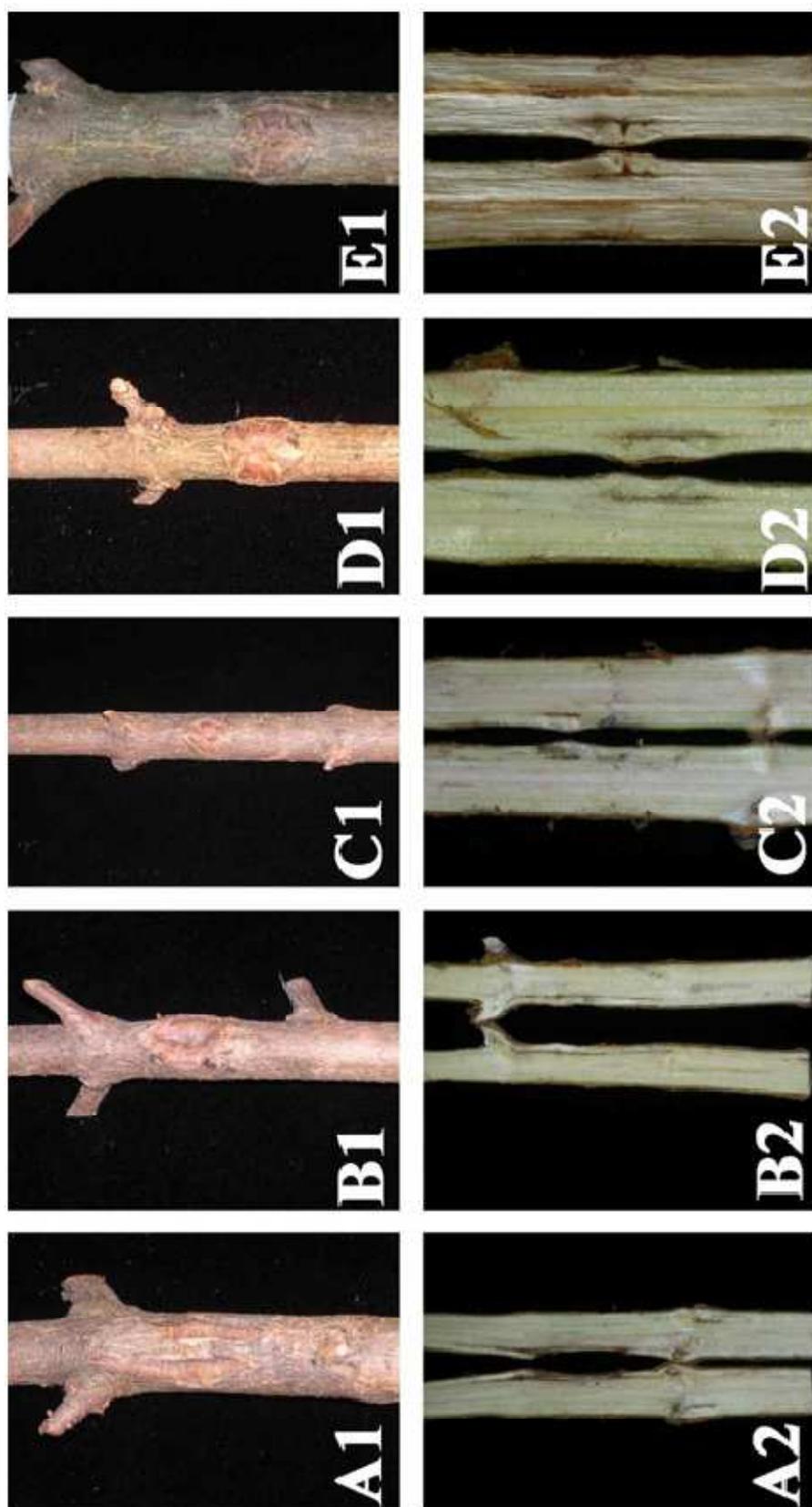


Fig. 7 – Stato delle lesioni su *Acer campestre* al termine della sperimentazione (150 giorni dall'inoculazione) – A1: infezione da *Negatifloccata pagxii*; A2: sezione del campione A1; B1: lesione determinata dalla miscela degli isolati; B2: sezione del campione B1; C1: lesione da *Botryosphaeria dothidea*; C2: sezione del campione C1; D1: lesione da *Dyolodia serrata*; D2: sezione su controllo negativo; E1: lesione del campione E1; E2: sezione del campione E1



Fig. 8 - Stato delle lesioni su *Carpinus betulus* al termine della sperimentazione (150 giorni dall'inoculazione) - A1: infezione da *Neosuffocarium paspali*; A2: sezione del campione A1; B1: lesione determinata dalla miscela degli isolati; B2: sezione del campione B1; C1: lesione da *Botryosphaeria dothidea*; C2: sezione del campione C1; D1: lesione da *Diplodia seriata*; D2: sezione su controllo negativo; E1: E2: sezione del campione E1

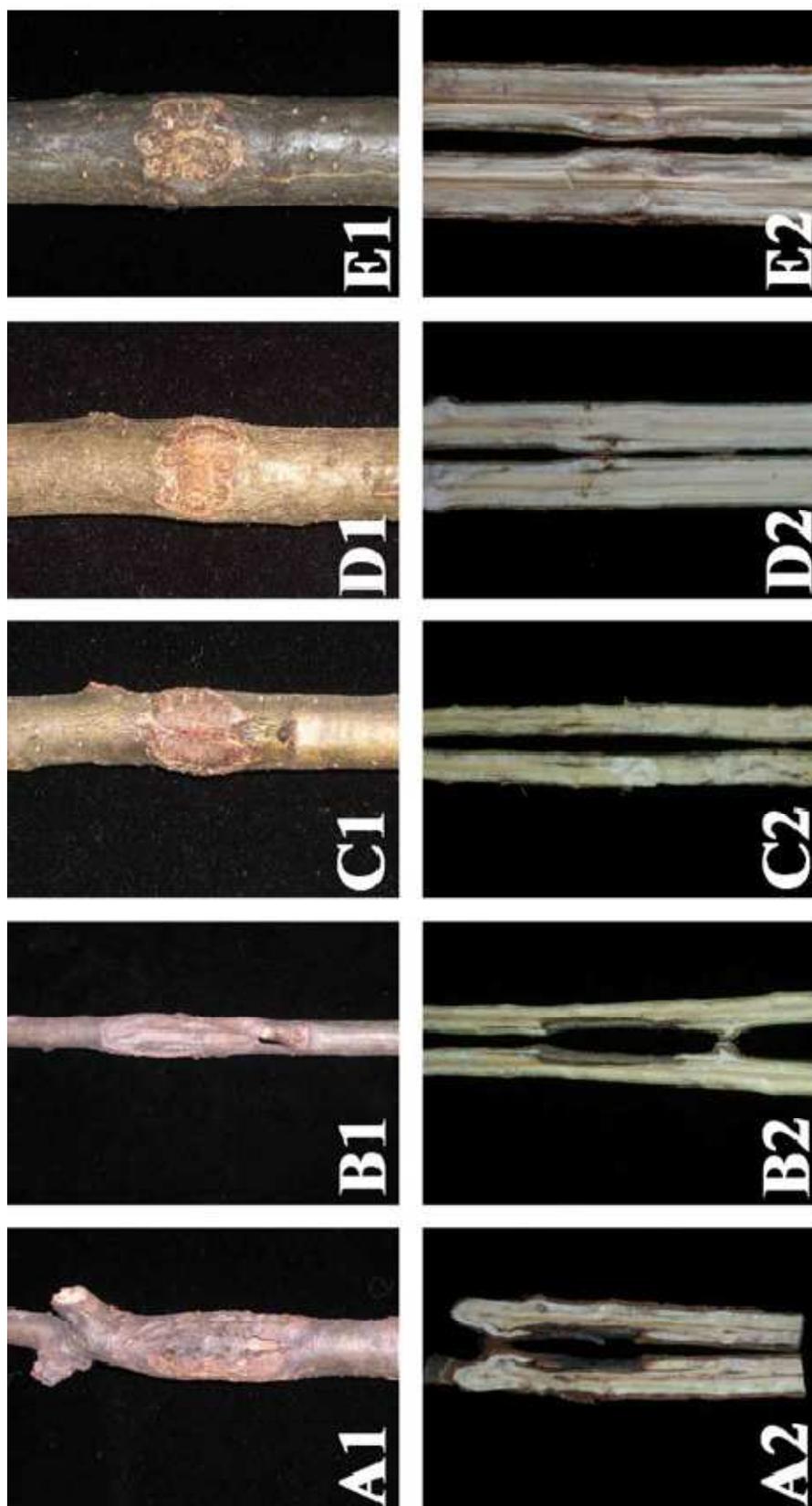


Fig. 9 - Stato delle lesioni su *Quercus agrifolia* al termine della sperimentazione (150 giorni dall'inoculazione) - A1: infezione da *Negundothelella peruviana*; A2: sezione del campione A1; B1: lesione determinata dalla miscela degli isolati; B2: sezione del campione B1; C1: lesione da *Botryosphaeria dothidea*; C2: sezione del campione C1; D1: lesione da *Diplodia seriata*; D2: sezione del campione D1; E1: lesione su controllo negativo; E2: sezione del campione E1

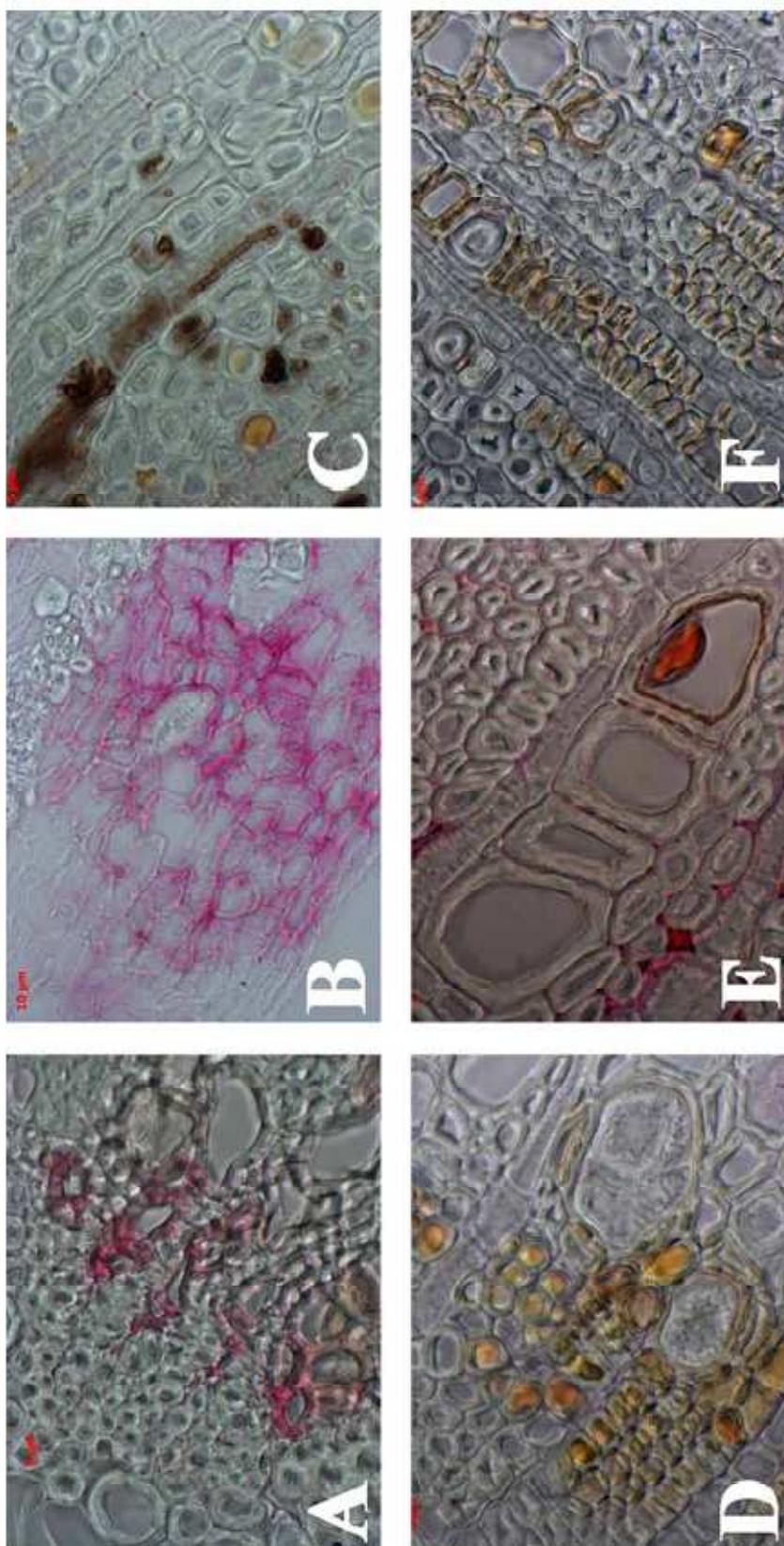


Fig. 10 – Sezioni microtomiche di campioni infettati artificialmente – A: *Acer platanoides* infettato con *Botryosphaeria dothidea* – è possibile notare il micelio intercellulare e alcuni vasi parzialmente occlusi dalla pianta, in risposta all'infezione; B: *Quercus robur*, infettato con *Botryosphaeria dothidea* – è ben visibile il tessuto legnoso dell'ospite già disorganizzato e necrotizzato, su cui è presente il micelio fungino in avanzato stato di degradazione; C: *Carpinus betulus* infettato con *Botryosphaeria dothidea* – è possibile notare alcune ife integre scendere sopra un raggio parenchimatico, agglomerati di ife all'interno del lume di diversi vasi e vasi già occlusi, parzialmente o totalmente, in risposta all'infezione; D: *Carpinus betulus*, infettato con *Diplodia seriata* – si può vedere come l'infezione sia circoscritta e come sia alta la concentrazione di vasi occlusi per impedire lo sviluppo del micelio, segno di una pronta reazione da parte dell'ospite; E: *Carpinus betulus* infettato con *Diplodia seriata* – si nota come le ife aderiscano alle pareti interne dei vasi e la fase iniziale di occlusione degli stessi; F: *Carpinus betulus* infettato con *Neofusicoccum parvum* – micelio essenzialmente intercellulare, si nota come circondi le pareti dei vasi fino a portarle al collasso.

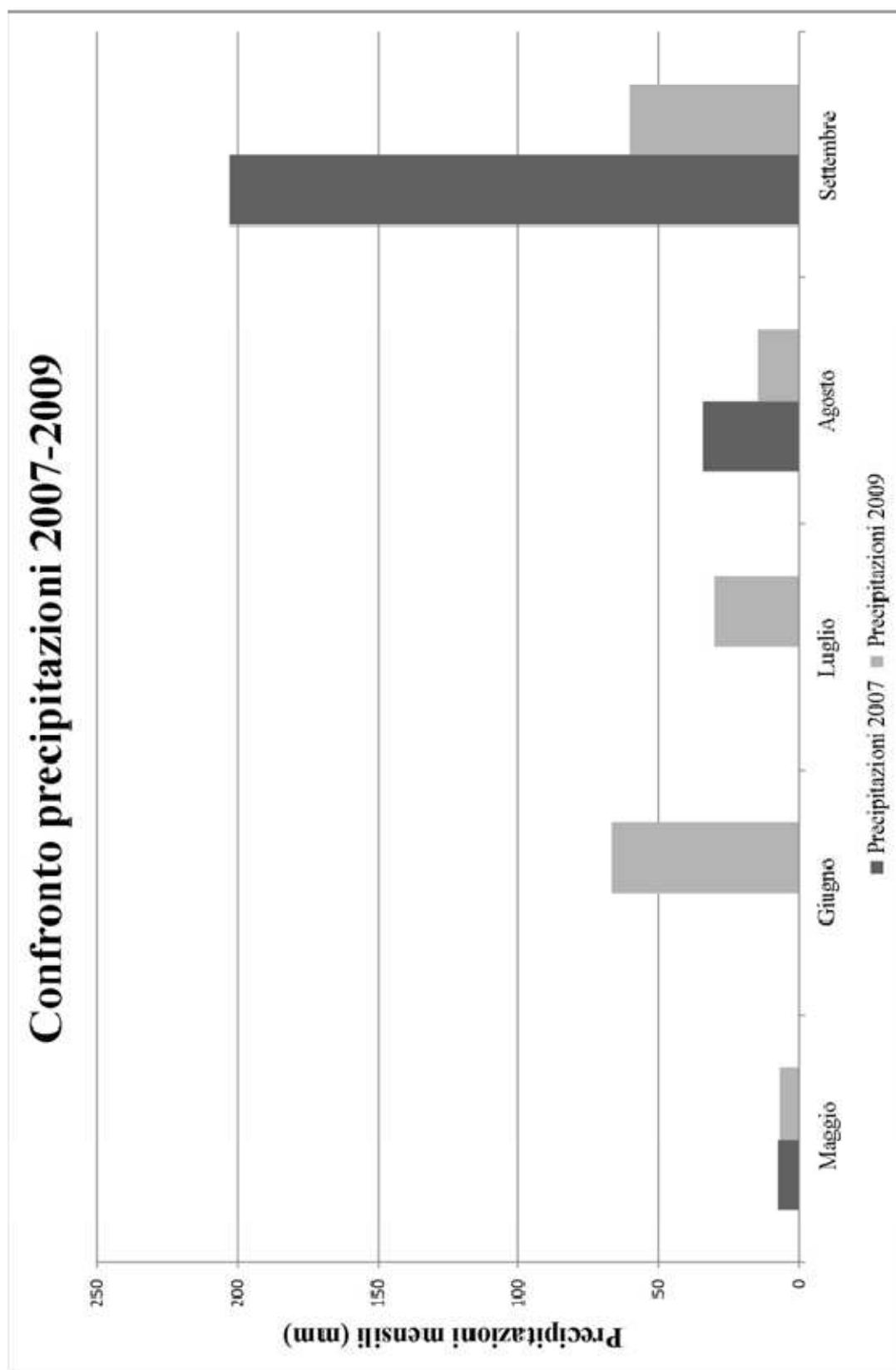


Fig. 11 – Confronto fra le precipitazioni occorse, durante le prove di infezione artificiale, negli anni 2007 e 2009

Capitolo 3

**Ecotipi e serie climatiche:
una possibile
interpretazione della
diffusione e della
virulenza di alcune
*Botryosphaeriaceae***

3.1 INTRODUZIONE

Le *Botryosphaeriaceae* sono una famiglia di ascomiceti (*Botryosphaeriales*, *Incertae sedis*, *Dothideomycetes*) noti da molto tempo e a lungo considerati saprofiti di piante legnose (Cesati e De Notaris, 1863; Saccardo, 1877). Negli ultimi anni, però, sempre più spesso specie appartenenti a questa famiglia sono state accostate a sindromi talvolta complesse, sia su colture agrarie (Larignon *et al.*, 2001; Phillips, 2002; Damm *et al.*, 2007; Lazizzera *et al.*, 2008; Úrbez-Torres e Gubler, 2009) che su piante forestali (Ragazzi *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2003; Slippers *et al.*, 2004b; Jurc *et al.*, 2006; Linaldeddu *et al.*, 2007; Slippers e Wingfield, 2007; Moricca *et al.*, 2010).

Questi parassiti di piante legnose risultano essere agenti di cancri corticali, talvolta con emissione di essudati dal fusto, con conseguenziali imbrunimenti ed alterazioni dei tessuti legnosi, danni all'apparato fogliare e altri sintomi, in relazione all'ospite, alla stazione geografica ed al clima.

Considerando il crescente numero di accostamenti fra *Botryosphaeriaceae* e stati di sofferenza degli ospiti, numerosi studi sono stati condotti per approfondirne le conoscenze. Studi che si sono concentrati su diversi aspetti biologici ed epidemiologici, anche se non tutti trattati con la medesima attenzione.

Gli studi di natura molecolare, con l'abbandono della distinzione fra anamorfo e teleomorfo, hanno comportato la revisione tassonomica di questi miceti (Jacobs e Rehner, 1998; Denman *et al.*, 2000; Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008) e la scoperta di complessi, precedentemente considerati come singole specie, all'interno dei quali possono trovarsi più entità criptiche (Slippers *et al.*, 2004a; Phillips *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006; Burgess *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2008; de Wet *et al.*, 2009). Inoltre, da questo tipo di analisi è stato possibile individuare alcuni pattern associativi fra specie fungine ed ospiti (de Wet *et al.*, 2008).

Il coinvolgimento di alcune specie di *Botryosphaeriaceae* nelle malattie complesse, quale sempre più stava emergendo, e l'associazione frequente di alcune delle stesse con stessi ospiti, hanno portato ad indagini volte a verificare se tali ascomiceti fossero o meno capaci di produrre metaboliti secondari che

potevano essere coinvolti nell'espressione di alcuni sintomi (Sassa *et al.*, 1987; Venkatasubbaiah *et al.*, 1991; Steluti *et al.*, 2004; Martos *et al.*, 2008).

Parallelamente, da un punto di vista epidemiologico, è stato accertato che la componente abiotica era determinante nell'espressione di virulenza, soprattutto per l'entità delle precipitazioni e per l'andamento delle temperature (Schoeneweiss, 1981; Desprez-Loustau *et al.*, 2006), tuttavia pochi studi, in proporzione, si sono concentrati sull'influenza dei fattori ambientali nei confronti della presenza, e dell'eventuale espressione patogenetica, di questi microrganismi (Wene e Schoeneweiss, 1980; Pusey, 1989; Ragazzi *et al.*, 1999; Copes *et al.*, 2004; Ahimera *et al.*, 2004; Úrbez-Torres *et al.*, 2010a; Úrbez-Torres *et al.*, 2010b).

Tenendo conto che i cambiamenti climatici in atto stanno prospettando scenari futuri sempre più caldi e siccitosi (IPCC, 2007), capire come temperature e precipitazioni possano influenzare la diffusione e le manifestazioni di patogenicità delle *Botryosphaeriaceae* potrà offrire indicazioni più dettagliate nella scelta dei nuovi soprassuoli da impiantare.

L'obiettivo di questo lavoro è caratterizzare le condizioni ottimali di crescita di 53 isolati di *Botryosphaeriaceae*, afferenti a più specie e di differente provenienza geografica, definire delle classi ecotipiche in funzione dei tassi di crescita alle diverse temperature, confrontare i vari ecotipi con l'evoluzione climatica degli ultimi 30 anni avutasi nei luoghi ove sono stati reperiti, con il fine di meglio comprendere la biologia di questi microrganismi.

3.2 MATERIALI E METODI

3.2.1 Allestimento della collezione di isolati

La collezione di isolati utilizzati in questa esperienza proviene, in parte, dal lavoro condotto durante una precedente indagine (Moricca *et al.*, 2010). Una parte è stata invece ottenuta da successivi isolamenti dal medesimo caso di studio, pertinente alla città di Milano e a due parchi urbani (Parco Nord e Boscoincittà, Capitolo 1). Frammenti di tessuto legnoso sono stati prelevati da cancri corticali su alberi presenti nel caso di studio in oggetto (*Acer* spp., *Quercus* spp., *Crataegus monogyna*); l'isolamento è stato ottenuto seminando 5 frammenti del diametro di 5 mm, prelevati nella zona di confine fra legno alterato e sano, su una piastra Petri contenente PDA; le colonie morfologicamente compatibili con specie di *Botryosphaeriaceae* sono state trasferite su Agar-Foglie di pioppo ed Agar-acqua addizionato con rametti di pioppo sterili, al fine di indurre la differenziazione di strutture riproduttive. Osservando queste ultime al microscopio ottico, si è pervenuti all'identificazione, confermata, o talvolta corretta, da successive analisi molecolari (Capitolo 4).

Un'ultima parte di isolati, infine, è stata reperita tramite richiesta ad altri gruppi di ricerca italiani ed esteri (Tab.1).

3.2.2 Prove di crescita

Tutti gli isolati in collezione sono stati sottoposti a prove di crescita, effettuate su PDA 2,4%, MEA 1,5% e Agar-acqua, a tre diverse temperature: 25°C, 30°C e 35°C. Ciascun isolato è stato seminato su tre piastre per ogni substrato e per ogni temperatura di crescita (27 piastre in totale per isolato, per un ammontare complessivo di 1431 piastre). L'inoculazione dei substrati è stata effettuata per mezzo di tasselli di micelio del diametro di 5 mm, prelevati dalla parte esterna di colonie cresciute su PDA. Per ogni colonia sono stati misurati quotidianamente, per tre giorni, due diametri fra loro perpendicolari; i valori medi delle misure sono stati riportati su un grafico cartesiano a dispersione e compensati linearmente, in modo da ricavare valori medi di accrescimento

espressi dalla formula di una retta ($y = ax + b$), in cui il valore 'a' rappresenta l'inclinazione di questa, corrispondente all'accrescimento medio in mm/g, e quello di 'b' rappresenta il diametro di partenza, equivalente a quello del tassello di micelio (Fig.1).

Un totale di 477 valori, ottenuti come sopra descritto, sono andati a costituire il dataset (Tab. 2) utilizzato successivamente per le elaborazioni statistiche.

3.2.3 Elaborazioni statistiche

Il dataset sopra ottenuto è stato elaborato con il software statistico Simfit V6.1.2 (<http://www.simfit.man.ac.uk>, W. G. Bardsley, University of Manchester, UK) fino ad ottenere un dendrogramma calcolato sulle matrici di distanza. I parametri software utilizzati nell'elaborazione sono:

- Data transformation: untransformed (trasformazione dei dati: nessuna);
- Distance measure: absolute distance (misurazione delle distanze: distanza assoluta);
- Scaling: sample standard deviation (settaggio delle distanze: campionamento delle deviazioni standard);
- Cluster link: complete link (metodo di raggruppamento: collegamento completo).

3.2.4 Raccolta dei dati climatici

Sono stati raccolti i dati climatici storici degli ultimi 30 anni di quei siti prossimi ai luoghi di provenienza degli isolati. La selezione delle serie storiche da calcolare ha escluso quegli isolati del cui luogo di origine non si hanno notizie sufficientemente dettagliate (Tab.1: 2191, SL353, SL519) o di cui non è stato possibile reperire una stazione climatica ragionevolmente prossima al luogo di isolamento (Tab. 1: BA1).

I dati sono stati reperiti da un'unica fonte, World Data Center (WDC) for Meteorology, Asheville (<http://www.ncdc.noaa.gov/oa/wdc/index.php>), in modo

da far riferimento ad un unico network di rilievo ed avere dati fra loro confrontabili.

Le serie climatiche storiche, ove possibile, hanno compreso un arco trentennale nel rispetto delle convenzioni utilizzate in agrometeorologia (Mariani, 2006).

I dati sono stati computati tramite foglio elettronico e i parametri presi in considerazione sono stati la temperatura media giornaliera e le precipitazioni annuali.

3.3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.3.1 Prove di crescita

Il dataset ricavato dalle prove di crescita, ed opportunamente elaborato con il software statistico Simfit, ha fornito come risultato il dendrogramma in Fig. 2, nel quale è possibile osservare la presenza di quattro clade principali:

- Clade 1: optimum di crescita a 30°C nel 69% dei casi, a 25°C nel rimanente 31%. Gli accrescimenti minimi sono compresi fra 0 e 5,628 mm/g, i massimi fra 12,25 e 26,9 mm/g. Rappresenta il gruppo più numeroso (vi confluisce il 58,5% degli isolati in collezione);
- Clade 2: optimum di crescita a 25°C nell'80,56% dei casi, a 30°C nel rimanente 19,44%; è l'unico gruppo a presentare isolati (BA4, BA10, BA11 e DI50) completamente inibiti alla crescita a 35°C. Gli accrescimenti minimi oscillano fra 0 e 1,7 mm/g, i massimi fra 8,116 e 16,03 mm/g. In questo clade è confluito il 22,64% degli isolati in collezione;
- Clade 3: optimum di crescita a 25°C nel 50% dei casi, a 30°C nel 45,83% e a 35°C nel 4,17% dei casi. E' il gruppo con i tassi di crescita in assoluto più bassi (i tassi minimi sono compresi fra 0 e 1,595 mm/g, quelli massimi fra 5,827 e 11,28 mm/g). Vi confluisce il 15,09% degli isolati in collezione;
- Clade 4: è composto da due isolati soltanto (il 3,77% del totale in collezione), gli unici due appartenenti al genere *Lasiodiplodia*. Optimum termico a 30°C e ottime capacità di crescita a 35°C. I ritmi di accrescimento di entrambi gli isolati sono nettamente superiori rispetto agli altri della collezione (tassi minimi compresi fra 7,119 e 13,52 mm/g, i massimi fra 44,83 e 53,66 mm/g).

Da questi dati si può dedurre che le *Botryosphaeriaceae* sono organismi termo-tolleranti, il cui processo infettivo nell'ospite procede proprio nel momento in cui questo si trova in difficoltà per le elevate temperature che, anche quando non strettamente associate alla stagione siccitosa, causano un aumento del tasso di

evapotraspirazione, rendendo meno disponibile l'acqua che arriva al suolo con le precipitazioni.

E' possibile notare che, all'interno della stessa specie, vi possono essere tassi di crescita notevolmente differenti (ad esempio, isolati di *Botryosphaeria dothidea* sono presenti in tre clade su quattro, al pari di *Diplodia corticola*). Sono estrapolabili anche considerazioni di tipo geografico: gran parte degli isolati italiani (71,4%) è compresa nel clade 1; gli isolati australiani sono uniformemente distribuiti nei quattro clade, rispecchiando una variabilità attesa in una regione così ampia, mentre gli isolati provenienti dalla Slovenia sono equamente suddivisi fra quelli a crescita medio-alta e quelli con ritmi di crescita ridotti.

Per meglio comprendere il significato di questi raggruppamenti, però, è necessario un confronto di tali dati con le serie climatiche storiche dei luoghi di isolamento.

3.3.2 Serie climatiche

I dati ricavati dalle serie climatiche storiche (Tab. 3) evidenziano come tutti gli isolati, con l'unica eccezione di SW2C, reperito nei dintorni di Kununurra (North West Australia), provengano da aree nelle quali le precipitazioni sono diminuite sensibilmente nell'arco degli ultimi 30 anni, con Milano quale caso estremo in cui si è registrata una flessione di oltre il 30%, seguito da Firenze con il 28,5%.

L'unica stazione ove le precipitazioni hanno, come detto precedentemente, una variazione positiva, addirittura del 35,5%, presenta una minore affidabilità dei dati in quanto non sono reperibili valori antecedenti al 1992. Ridotta affidabilità presentano pure i dati riferiti alla stazione di Nova Gorica perché non esistono dati fino al 1995.

Le precipitazioni medie, per tutte le aree considerate, oscillano fra valori medio-alti e bassi (compresi fra 553 e 915 mm all'anno), con l'unica eccezione della stazione di Nova Gorica, le cui precipitazioni medie si assestano sui 1341 mm annui, pur presentando un trend negativo nei valori.

Per quanto riguarda la temperatura, tutte le stazioni presentano medie annuali oscillanti fra i 13 ed i 27°C e variazioni, equamente distribuite fra positive

e negative, entro l'ordine del 5%; anche in questo caso, però, la città di Milano rappresenta un'eccezione perché si è registrato un incremento delle temperature di oltre il 15%.

Analizzando i dati stazione per stazione, confrontandoli con i dati emersi dalle prove di crescita, è possibile fare ulteriori considerazioni ed ipotesi.

Alghero presenta una situazione climatica con precipitazioni scarse (569 mm il valore medio trentennale) e soggette a sensibili riduzioni (-16,7%); le temperature sono tendenzialmente alte (16,25°C il valore medio sui 30 anni di rilievi) e in lieve aumento (+4%), un quadro nel quale il bilancio idrico delle piante rischia di essere alterato sensibilmente. I due isolati si sono distribuiti uniformemente nel primo e nel secondo clade, con optimum di crescita equamente suddiviso fra 25 e 30°C ed entrambi con tassi di crescita medio-alti. Vista l'esiguità del campione, comunque, non è possibile fare altre considerazioni in proposito.

La stazione di Bari mostra una situazione climaticamente quasi identica a quella di Alghero. I quattro isolati presenti in collezione, tutti appartenenti alla specie *Diplodia corticola*, hanno un optimum di 25°C e tassi di crescita suddivisi fra medio-alti e medio bassi. E' possibile ipotizzare che, viste le caratteristiche climatiche dell'area, le popolazioni di *Botryosphaeriaceae* si siano infeudate già da molto tempo e che si siano adattate all'ambiente, raggiungendo il massimo dell'attività a temperature che si protraggono per un periodo più esteso dell'anno. Il fatto che presentino tassi di crescita fra loro differenti può essere un indice di variabilità dovuto ad una popolazione affermata che ha affrontato processi evolutivi che hanno comportato una diversa espressione fenotipica.

Firenze presenta una piovosità medio-alta (850 mm annui di media) ma, come si è già detto, il parametro ha un trend fortemente negativo; le temperature si sono mantenute praticamente stabili (-0,8%) e con valori medi intorno ai 15,71°C, in linea con le due stazioni appena descritte. Gli isolati afferenti a questa zona, comprendenti quelli reperiti a Pistoia e San Casciano Val di Pesa (FI), in tutto sono nove (quattro rispettivamente per *Botryosphaeria dothidea* e *Neofusicoccum parvum*, uno di *Diplodia seriata*) e sono confluiti quasi tutti nel primo clade, mostrando quindi alti tassi di crescita e optimum tendenzialmente a 30°C. Tale evidenza potrebbe essere spiegata pensando a popolazioni di recente

insediamento: lo stress idrico causato nei soprassuoli dal forte decremento delle precipitazioni può aver esposto le piante ospite a condizioni di maggiore suscettibilità al patogeno. In quest'area la gran parte degli isolati raggiunge il massimo dell'attività intorno ai 30°C e ciò può dipendere dal fatto che le precipitazioni, pur in calo, si assestino ancora su valori medio-alti con consequenziale coincidenza delle fasi di sofferenza degli ospiti con il periodo più caldo dell'anno. Pertanto è ipotizzabile che le infezioni che riescono ad affermarsi siano dovute ad ecotipi di *Botryosphaeriaceae* adattati a crescere ad elevate temperature.

La stazione di Gladstone (Queensland, Australia) è caratterizzata da precipitazioni medie annuali di circa 750 mm, ma anche in questo caso vi è stata una diminuzione sensibile (-10,8%) negli ultimi anni; inoltre, la temperatura media è elevata (22,57°C), anche se stabile. L'elevato tasso di evapotraspirazione presumibile, dovuto a precipitazioni da clima temperato e temperature da clima subtropicale, prefigurano delle condizioni in cui le piante siano cronicamente sottoposte a stress idrico. A quest'area si riferiscono quattro isolati di *Botryosphaeria dothidea*, distribuiti sui primi tre clade del dendrogramma. Al pari di quanto ipotizzato per la stazione di Bari, la variabilità fenotipica espressa in queste prove lascia ipotizzare che gli isolati appartengano ad una popolazione affermata e ben adattata all'ambiente.

L'area intorno a Kununurra (North West Australia), che rappresenta un'eccezione rispetto alle altre aree, presenta precipitazioni annuali medie di notevole entità (915 mm) e un trend in forte aumento (+35,5%); la temperatura media è particolarmente elevata (27,47°C), anche se in leggera discesa (1,2%). Nonostante l'entità delle precipitazioni, quindi, la quantità di acqua fruibile dalle piante subisce forti riduzioni dovute all'evaporazione per le elevate temperature; a questo si aggiunge che l'unico isolato proveniente da quella regione, *Lasiodiplodia* sp. ceppo SW2C, ha tassi di crescita nettamente più elevati e l'optimum a 30°C, conservando un'elevata attività anche a 35°C (clade 4). L'isolato, che già si è mostrato aggressivo nel colonizzare il substrato *in vitro*, in quella regione trova le condizioni ottimali per il proprio ciclo vitale su una lunga frazione dell'anno.

La situazione di Milano è analoga a quella di Firenze, con l'unica differenza che le temperature sono cresciute del 15,5% nell'ultimo trentennio. Gran parte dei 18 isolati ivi reperiti (quasi l'80%) si trovano nel clade 1 del dendrogramma, presentando alti tassi di crescita e optimum prevalente a 30°C. Questi dati lasciano supporre: 1) la relativa recente introduzione, dovuta anche a temperature medie relativamente basse (13,5°C); 2) il picco di attività dei miceti nei mesi estivi, quando gli ospiti si trovano ad affrontare i maggiori problemi nell'approvvigionamento idrico.

Nova Gorica (Slovenia) si presenta come la stazione di gran lunga più piovosa (1341 mm l'anno) e la meno calda (13°C), anche se le piogge sono in diminuzione (-13,8%) e le temperature in aumento (+5,1%). Dalle prove di crescita, i quattro isolati provenienti da quest'area si sono situati metà nel clade 1 e metà nel clade 3: i primi, tendenzialmente più termofili, potrebbero rientrare in quelle situazioni illustrate per Firenze e Milano, mentre quelli collocati nel clade 3 sembrano apparentemente smentire questo tipo di ragionamento in quanto in precedenza si è ipotizzato che individui con tassi di crescita bassi potessero essere riconducibili ad una popolazione affermata. Una spiegazione potrebbe essere data dal fatto che la presenza di isolati a crescita lenta possa essere sottostimata per una maggior facilità di isolamento di quelli più rapidi nel colonizzare il substrato, problema dalla valenza ridotta in contesti climatici più freddi, come quelli sloveni.

Perth (South West Australia) presenta precipitazioni medie intorno ai 700 mm annui, in leggera diminuzione (-3,5%), e temperature medie annuali di 18,32°C, anch'esse leggermente in declino (-2,7%). I sei isolati di *Botryosphaeria dothidea* di quest'area, nelle prove di crescita, si sono equamente distribuiti nei primi tre clade, anche in questo caso con una variabilità ricollegabile ad una popolazione già affermata.

Trapani è una stazione scarsamente piovosa (una media di 598 mm annui), con valori in sensibile diminuzione (-13,9%), a fronte di una temperatura media abbastanza alta (18°C) ed in leggera fase di incremento (+1,9%). L'unico isolato proveniente da quest'area, afferente alla specie *Lasiodiplodia theobromae*, è confluito nel clade 4 del dendrogramma, insieme all'unico altro isolato di *Lasiodiplodia* sp. australiano, mostrando quindi un elevato tasso di crescita e le condizioni più favorevoli intorno ai 30°C. Facendo il raffronto con l'isolato

australiano, proveniente da climi tropicali, e constatando come il genere *Lasiodiplodia* sia molto presente nelle zone tropicali dell’Africa (Burgess *et al.*, 2006; Damm *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2008), la presenza di ceppi di *Lasiodiplodia theobromae* in Sicilia lascia supporre come i cambiamenti in atto stiano lentamente trasformando le fasce climatiche, con progressione verso nord della fascia subtropicale, attualmente rappresentata dalle regioni poste fra il Tropico del Cancro ed i 40° di latitudine nord dell’emisfero boreale, facendone di conseguenza un indicatore biologico testimone del riscaldamento globale.

Inoltre, quantomeno per quanto riguarda gli isolati italiani, l’abbondanza di individui con elevati tassi di crescita e ben termotolleranti, come quelli inclusi nel clade 1, sembra essere conseguenza di una drastica diminuzione delle precipitazioni annuali, come osservato nelle stazioni di Firenze e Milano.

3.4 CONCLUSIONI

I dati derivanti da questa esperienza connettono la presenza delle *Botryosphaeriaceae* a situazioni in cui le piante ospite sono sottoposte a stress di natura idrica, relazione comune a praticamente tutti i siti di provenienza degli isolati qui indagati; un'evoluzione climatica che ha comportato significative, quando non drastiche, riduzioni nelle precipitazioni. Tali conclusioni trovano conferma in un modello di recente proposizione (Thompson *et al.*, 2010), costruito sull'interazione fra *Diplodia mutila* e la palma *Iriartea deltoidea* in Amazzonia.

La diminuzione delle precipitazioni si ripercuote sulla capacità dell'ospite di reagire all'infezione; la pioggia infatti ha un ruolo importante nel ciclo del fungo, soprattutto per quanto concerne la sporulazione (Úrbez-Torres *et al.*, 2010a), configurando le *Botryosphaeriaceae* quali organismi la cui dispersione dipende principalmente dal vettore acqua.

Al dato sulle precipitazioni si affianca quello della temperatura, sia per il caso estremo di Milano, che ha visto cambiare radicalmente il proprio clima in 30 anni, sia per tutte le altre stazioni indagate: temperature medie annuali intorno ai 13°C sono apparse il limite inferiore per rendere possibile la colonizzazione degli ospiti da parte di questi ascomiceti. Tali valori limite sono stati registrati per le stazioni di Milano e di Nova Gorica, aree che rappresentano il punto più a nord in Europa nell'areale conosciuto per le *Botryosphaeriaceae* (Jurc *et al.*, 2006; Turco *et al.*, 2006). Questo dato trova conferma in un recente studio di Úrbez-Torres *et al.* (2010b), nel quale è emerso come i conidi delle *Botryosphaeriaceae* perdano la capacità germinativa al di sotto dei 10°C.

La temperatura media annuale sembra avere un ruolo anche nella composizione delle popolazioni, che presentano tassi di crescita variabili in aree in cui il valore medio è superiore ai 16°C; al di sotto di tale valore le popolazioni appaiono più omogenee e ricche di individui ad accrescimento rapido. La variabilità dei tassi di crescita, all'interno della stessa area geografica, è stata interpretata quale espressione di una popolazione affermata e presente da tempo nell'area in questione, in relazione anche a temperature medie più elevate. Di contro, una scarsa variabilità dei tassi di crescita dei vari isolati è stata riscontrata

in aree soggette ad una significativa modificazione delle condizioni climatiche, prefigurando queste quali fattori dell'estensione dell'areale di questi ascomiceti.

La presenza della specie *Lasiodiplodia theobromae* in Sicilia, come ipotizzato precedentemente, può essere un indizio a suffragio del ritenuto spostamento a nord della fascia subtropicale.

I risultati sopra esposti configurano le *Botryosphaeriaceae* come possibili indicatori biologici dei cambiamenti in atto; inoltre, un'accurata caratterizzazione delle esigenze vitali può fornire informazioni preziose riguardo alle popolazioni presenti in una determinata area.

Infine, un'indagine più approfondita, estesa a più isolati ed aree geografiche, può fornire indicazioni utili per la costruzione di modelli epidemiologici che aiutino a prevedere il rischio di espansione da parte di questi ascomiceti.

Bibliografia

- Ahimera N., Gisler S., Morgan D. P., Michailides T. J. 2004. Effects of single-drop impactions and natural and simulated rains on the dispersal of *Botryosphaeria dothidea* conidia. *Phytopathology* **94**: 1189-1197.
- Alves A., Correia A., Philips A. J. L. 2006. Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. *Fungal Diversity* **23**: 1-15.
- 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.
- Burgess T. I., Barber P. A., Mohali S., Pegg G., de Beer W., Wingfield M. J. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* **98**: 423-435.
- Cesati V., De Notaris G. 1863. Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeri più o meno appartenenti al genere *Sphaeria* nell'antico significato attribuitogli da Persoon. *Commentario della Società Crittogamica Italiana* **1**: 177-240.
- Copes W. E., Hendrix F. F. 2004. Effect of temperature on sporulation of *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtusa* and *B. rhodina*. *Plant Disease* **88**: 292-296.
- 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.
- 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 *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* **99**: 664-680.
- de Wet J., Slippers B., Preisig O., Wingfield B. D., Wingfield M. J. 2008. Phylogeny of the *Botryosphaeriaceae* reveals patterns of host association. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**: 116-126.
- de Wet J., Slippers B., Preisig O., Wingfield B. D., Tsopeles P., Wingfield M. J. 2009. Molecular and morphological characterization of *Dothiorella casuarini* sp. nov. and other *Botryosphaeriaceae* with diplodia-like conidia. *Mycologia* **101**: 503-511.

- Denman S., Crous P. W., Taylor J. E., Kang J., 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.
- Desprez-Loustau M. L., Marçais B., Nageleisen L. M., Piou D., Vannini A. 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Sciences* **63**: 597-612.
- Jacobs K. A., Rehner S. A. 1998. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* **90**: 601-610.
- Jurc D., Ogris N., Grebenc T., Kraigher H. 2006. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing bark dieback of European hop hornbeam in Slovenia. *Plant Pathology* **55**: 299.
- Larignon P., Fulchic R., Cere L., Dubos B. 2001. Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* **40** (Supplement): S336-S342.
- Lazizzera 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.
- Linaldeddu B. T., Franceschini A., Luque J., Phillips A. J. L. 2007. First report of canker disease caused by *Botryosphaeria parva* on cork oak trees in Italy. *Plant Disease* **91**: 324.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007 Climate Change 2007: Synthesis Report. *Cambridge University Press*, Cambridge, UK.
- Mariani L. 2006. Alcuni metodi per l'analisi delle serie storiche in Agrometeorologia. *Rivista Italiana di Agrometeorologia* **11** (2): 48-56.
- Martos S., Andolfi A., Luque J., Mugnai L., Surico G., Evidente A. 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.
- Moricca, S., Uccello, A., Ragazzi, A. 2010. Micocenosi endofitiche in foreste urbane sottoposte a stress ambientale. *Micologia Italiana* **39** (1): 47-56.
- Phillips A. J. L. 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* **41**: 3-18.

- Phillips A. J., 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. 1989. Availability and dispersal of ascospores and conidia of *Botryosphaeria* in peach orchards. *Phytopathology* **79**: 635-639.
- Ragazzi A., Moricca S., Dellavalle I. 1999. Water stress and the development of cankers by *Diplodia mutila* on *Quercus robur*. *Journal of Phytopathology* **147**: 425-428.
- Saccardo P. A. 1877. Fungi Veneti novi vel critici. *Michelia* **1**: 1-72.
- Sánchez M. E., Venegas J., Romero M. A., Phillips A. J. L., Trapero A. 2003. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in Southwestern Spain. *Plant Disease* **87**: 1515-1521.
- Sassa T., Uchie K., Kato H., Onuma Y. 1987. Decomposition of fruit rot Toxin A, a host-selective phytotoxin from *Botryosphaeria berengeriana*. *Agricultural and Biological Chemistry* **51**: 271-272.
- Schoeneweiss D. F. 1981. The role of environmental stress in diseases of woody plants. *Plant Disease* **65**: 308-314.
- 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., Carnegie A. J., Wingfield M. J. 2004b. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. *Studies In Mycology* **50**: 343-358.
- 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.
- Steluti R. M., Giese E. C., Piggato M. M., Sumiya A. F. G., Covizzi L. G., Job A. E., Cardoso M. S., Corradi Da Silva M. D. L., Dekker R. F. H., Barbosa A. M. 2004.

- Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. *Journal of Basic Microbiology* **44**: 480-486.
- Thompson S., Alvarez-Loayza P., Terborgh J., Katul G. 2010. The effects of plant pathogens on tree recruitment in the Western Amazon under a projected future climate: a dinamica systems analysis. *Journal of Ecology* **98**: 1434-1446.
- Turco E., Marianelli L., Vizzuso C., Ragazzi A., Gini R., Selleri B., Tucci R. 2006. First report of *Botryosphaeria dothidea* on sycamore, red oak, and English oak in Northwestern Italy. *Plant Disease* **90**: 1106.
- Úrbez-Torres J. R., Gubler W. D. 2009. Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease* **93**: 584-592.
- Úrbez-Torres J. R., Battany M., Bettiga L. J., Gispert C., McGourty G., Roncoroni J., Smith R. J., Verdegaal P., Gubler W. D. 2010a. *Botryosphaeriaceae* species spore-trapping studies in California vineyards. *Plant Disease* **94** 717-724.
- Úrbez-Torres J. R., Bruez E., Hurtado J., Gubler W. D. 2010b. Effect of temperature on conidial germination of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Plant Disease* **94** 1476-1484.
- Venkatasubbaiah P., Sutton T. B., Chilton W. S. 1991. Effect of phytotoxins produced by *Botryosphaeria obtusa*, the cause of black rot of apple fruit and frog-eye leaf spot. *Phytopathology* **81**:243-247.
- Wene E. G., Schoeneweiss D. F. 1980. Localized freezing predisposition to *Botryosphaeria* canker in differentially frozen woody stems. *Canadian Journal of Botany* **58**: 1455-1458.

Capitolo 3

Appendice

, Tab. 2 – Isolati di *Botryosphaeriaceae* utilizzati.

Ceppo	Specie	Ospite	Provenienza	Isolato da
2191	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Vitis vinifera</i>	USA - Missouri	A. Spagnolo
B7	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA1	<i>Diplodia pinea</i>	<i>Sorbus torminalis</i>	Italia - Monticiano (SI)	A. Uccello
BA2	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Italia – Marsala (TP)	S. Burruano
BA3	<i>Diplodia seriata</i>	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA4	<i>Diplodia juglandis</i>	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA5	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA6	<i>Diplodia seriata</i>	<i>Quercus rubra</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA7	<i>Diplodia seriata</i>	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA8	<i>Diplodia seriata</i>	<i>Quercus rubra</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA9	<i>Diplodia seriata</i>	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA10	<i>Dothiorella sarmentorum</i>	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA11	<i>Diplodia juglandis</i>	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA12	<i>Diplodia mutila</i>	<i>Alnus cordata</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA13	<i>Diplodia sp.</i>	<i>Quercus rubra</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA14	<i>Diplodia mutila</i>	<i>Alnus cordata</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA15	<i>Diplodia seriata</i>	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA16	<i>Diplodia seriata</i>	<i>Quercus rubra</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA18	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Italia - San Casciano (FI)	A. Spagnolo
BA19	<i>Diplodia seriata</i>	<i>Prunus avium</i>	Italia - Pistoia	A. Uccello
BA20	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Quercus robur</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA22	<i>Diplodia seriata</i>	<i>Carpinus betulus</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA23	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Crataegus monogyna</i>	Italia - Milano	A. Uccello
BA24	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Quercus rubra</i>	Italia - Pistoia	A. Uccello
BA25a	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Italia - Pistoia	A. Uccello
BA25b	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Italia - Pistoia	A. Uccello
Bari 72	<i>Diplodia corticola</i>	<i>Quercus pubescens</i>	Italia - Bari	N. Luisi
Bari 73	<i>Diplodia corticola</i>	<i>Quercus pubescens</i>	Italia - Bari	N. Luisi
Bari 79	<i>Diplodia corticola</i>	<i>Quercus cerris</i>	Italia - Bari	N. Luisi
Bari 81	<i>Diplodia corticola</i>	<i>Quercus cerris</i>	Italia - Bari	N. Luisi
BOT21	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Italia - San Casciano (FI)	A. Spagnolo
BOT22	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Italia - San Casciano (FI)	A. Spagnolo
BOT36	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Italia - San Casciano (FI)	A. Spagnolo
BOT57	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Italia - San Casciano (FI)	A. Spagnolo
CMW 25689	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Acer platanoides</i>	Slovenia - Gorjansko	D. Jurc
CMW 25692	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Cotinus coggygria</i>	Slovenia - Gorjansko	D. Jurc
CMW 25696	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Ostrya carpinifolia</i>	Slovenia - Gorjansko	D. Jurc
CMW 26224	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Ostrya carpinifolia</i>	Slovenia - Stolovec	D. Jurc
DI50	<i>Dothiorella iberica</i>	<i>Quercus suber</i>	Italia - Sassari	A. Franceschini
F49	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Quercus suber</i>	Italia - Sassari	A. Franceschini

KT4	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Eucalyptus marginata</i>	Australia - Southern Western	T. Burgess
KT8	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Eucalyptus marginata</i>	Australia - Southern Western	T. Burgess
KT86	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Acacia rostellifera</i>	Australia - Southern Western	T. Burgess
KT129	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Acacia cochlearis</i>	Australia - Southern Western	T. Burgess
KT209	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Acacia rostellifera</i>	Australia - Southern Western	T. Burgess
QLD30	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Australia - Southern Queensland	T. Burgess
QLD32	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Australia - Southern Queensland	T. Burgess
QLD35	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Australia - Southern Queensland	T. Burgess
QLD39	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Australia - Southern Queensland	T. Burgess
SL 353	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Spagna	A. Spagnolo
SL 519	<i>Neofusicoccum luteum</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Spagna	A. Spagnolo
SW2C	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Santalum album</i>	North Western Australia	T. Burgess
WA7	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Corymbia callophylla</i>	Australia - Southern Western	T. Burgess

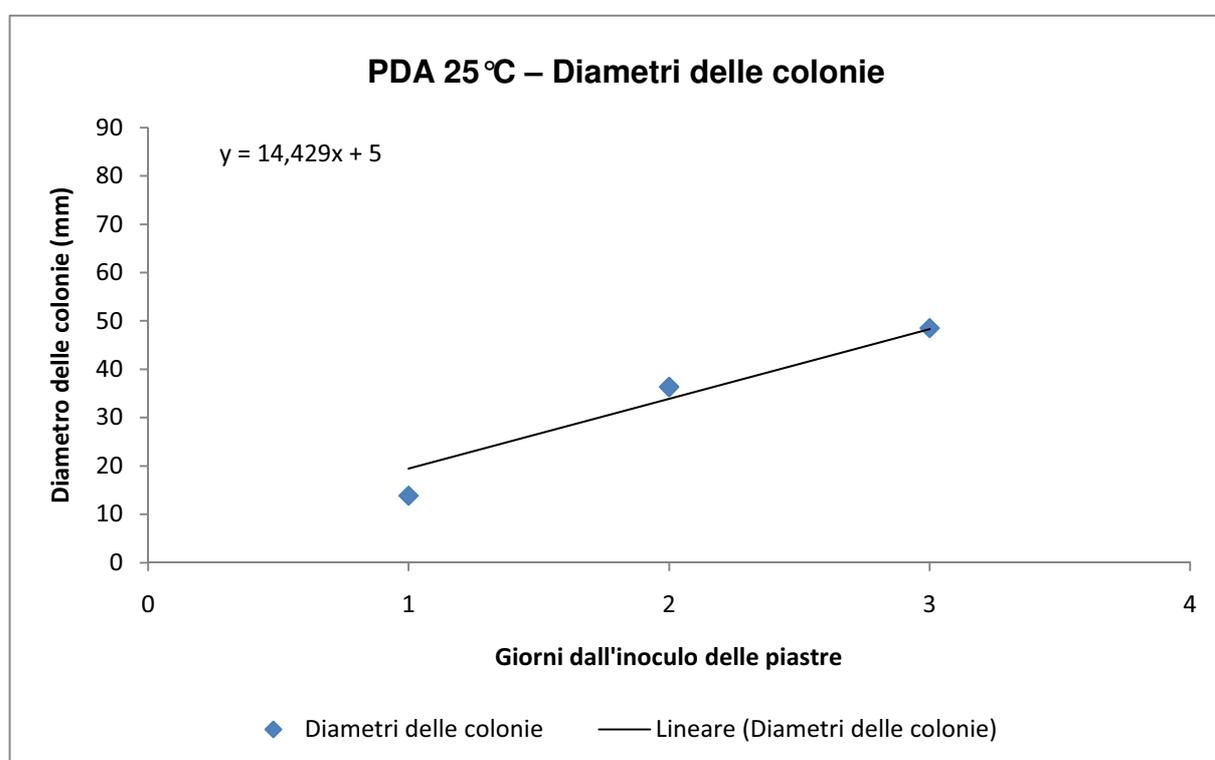


Fig. 3 – Tassi di crescita delle colonie delle *Botryosphaeriaceae*: nell'esempio riportato, riferito all'isolato BA9, il valore di 14,429 (mm/g di crescita diametrale media delle colonie) è stato utilizzato per le successive elaborazioni statistiche.

Tab. 3 – Dataset completo dei tassi di crescita di tutti gli isolati di *Botryosphaeriaceae* in collezione (i valori sono in mm/g; PDA: Potato Dextrose Agar 2,4%; MEA: Malt Extract Agar 1,5%; WA: Agar-acqua).

Valori medi di crescita degli isolati									
Isolato	PDA 25°C	PDA 30°C	PDA 35°C	MEA25°C	MEA 30°C	MEA 35°C	WA 25°C	WA 30°C	WA 35°C
2191	4,111	2,705	3,916	7,287	4,6	1,241	4,103	8,116	3,705
B7	11,07	20,23	5,628	4,871	11,67	6,583	6,12	8,012	6,202
BA1	13,94	11,6	0,944	7,825	8,722	0	7,773	7,91	1,025
BA2	27,26	44,83	20,73	22,13	28,13	18,54	12,26	17,62	7,119
BA3	17,46	16,95	4,388	13,03	17,42	2,722	8,666	10,86	3,202
BA4	16,03	2,476	0	9,716	1,5	0	5,82	0,888	0
BA5	17,25	21,1	7,011	6,617	10,03	5,916	7,472	8,076	5,285
BA6	16,13	18,46	3,594	12,91	17,04	2,275	9,565	10,36	2,487
BA7	17,33	17,71	2,755	16,86	16,86	1,972	10,11	10,83	1,717
BA8	18,46	15,95	4,138	17,79	17,71	3,133	9,144	11,78	1,782
BA9	14,43	8,809	3,357	7,2	6,122	1,7	5,96	7,375	3,107
BA10	20,2	7,452	0	11,98	4,166	0	6,797	2,166	0
BA11	15,76	2,488	0	10	1,5	0	5,73	0,722	0
BA12	22,8	18,82	0,833	11,35	9,944	0	9,535	8,807	1,346
BA13	19,2	17,71	2,611	12,86	13,44	1,73	8,166	12,28	1,936
BA14	26,66	18,8	0,961	12,41	10,54	0,8	8,755	5,897	1,474
BA15	18,46	16,66	4,444	13,51	12,88	3,115	8,202	11,03	2,269
BA16	17,33	16,79	3,594	13,9	17,35	2,6	9,283	10,1	2,035
BA18	25,26	26,6	1,222	16,08	17,81	0	8,571	7,115	1,357
BA19	6,6	17,19	4	11,76	13,5	4,783	9,377	9,616	2,897
BA20	23,43	23,76	1,222	13,2	16	1,444	6,059	11,16	5,055
BA22	19,4	15,77	2,333	11,93	13	1,217	9,738	10,93	1,692
BA23	12,44	21,5	5,628	9,345	13,35	6,1	6,988	8,845	6,142
BA24	23,23	25,53	0,944	9,483	14,66	1,538	6,381	13,12	2,23
BA25a	19,46	14,03	4,714	7,297	12	5,394	6,373	9,512	5,678
BA25b	16,36	17,76	5,205	5,692	9,928	5,438	6,074	9,511	5,238
BARI72	6,666	8,107	0	4,388	4,833	1,357	8,214	10,23	0,888
BARI73	11,83	9,904	1,611	4,766	6,111	1,717	8,619	9,243	0
BARI79	14,28	9,154	1,333	6,365	5,5	1,153	8,047	9,705	0
BARI81	8,666	7,881	1,666	4,95	8,388	1,217	8,571	9,564	1,142
BOT21	26,4	26,9	0,833	18,13	14,66	0,961	7,238	9,602	0,833
BOT22	16,59	12,66	0	7,816	10,61	1,153	4,857	8,051	0
BOT36	18,8	13,71	0	6,845	6,916	0,724	7,672	7,205	0,961
BOT57	19,4	9,726	1,089	7,631	6,738	0,844	7,322	5,435	1,217
CMW25689	9,904	9,392	3,357	7,583	5,455	3,038	9,105	9,383	0
CMW25692	4,535	5,392	2,057	1,595	5,827	2,477	4,706	3,833	5,678
CMW25696	11,94	18,76	3,694	9,154	10,75	3,722	9,516	9,5	6,345
CMW26224	9,047	12,25	3,293	7,404	9,653	3,592	6,061	5,055	2,628
DI50	11,29	1,285	0	8,633	1,277	0	8,011	0,833	0

F49	24,7	18,9	1,611	15,13	16,61	0,769	7,333	12,74	0,5
KT4	8,5	3,871	1,025	3,404	4,927	0,775	4,454	3,5	0,666
KT8	2,833	4,025	0,705	3	5,416	1,017	6,201	2,777	0
KT86	10,5	4,357	1,025	7,566	3,595	0,603	5,627	4,733	0,611
KT129	6,892	5,654	0	5,523	4,65	0,603	5,088	4,5	0
KT209	14,91	16,83	2,571	11,53	15,76	1,427	8,138	8,433	2,35
QLD30	15,53	5,705	1,474	8,678	11,66	1,377	10,3	7,119	0
QLD32	14,31	23,36	3,692	9	14,95	4,55	9,905	9,714	2,392
QLD35	12,92	9,464	5,061	9,859	8,827	2,15	14,23	14,54	0,722
QLD39	8,869	6,666	1,777	6,595	5,2	1,166	6,483	3,666	1,153
SL353	5,294	11,28	1,089	5,9	3,888	1	4,282	4,166	0,833
SL519	15,5	17,69	1,722	9,166	16,23	0,722	7,833	10,65	0,65
SW2C	43,16	53,66	26,9	27,7	32,5	18,32	13,53	17,02	13,52
WA7	11,54	12,39	0	8,511	5,5	0	6,092	4,277	1,282

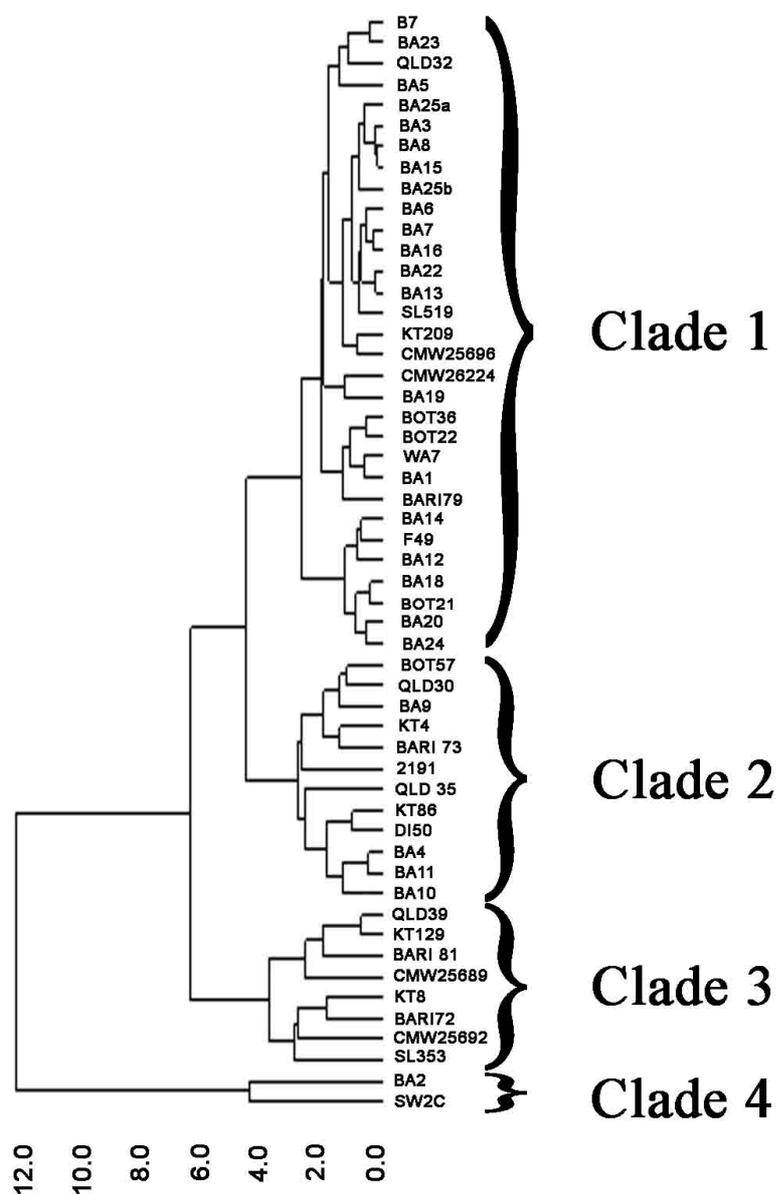


Fig. 4 – Dendrogramma ottenuto dall’elaborazione dei dati ricavati dalle prove di crescita dei diversi isolati di *Botryosphaeriaceae* in collezione. I parametri impostati in Simfit sono i seguenti: data transformation: untrasformed (trasformazione dei dati: nessuna); distance measure: absolute distance (misurazione delle distanze: distanza assoluta); scaling: sample standard deviation (settaggio delle distanze: campionamento delle deviazioni standard); cluster link: complete link (metodo di raggruppamento: collegamento completo).

Tab. 4 – Andamento storico (1980-2009) delle precipitazioni annuali e delle temperature medie giornaliere delle aree di isolamento delle *Botryosphaeriaceae* in collezione, in confronto con i dati ottenuti dalle prove di crescita. Per l'assenza di dati precedenti, la serie storica di Kununurra si riferisce a un periodo compreso fra 1992 e il 2009; per lo stesso motivo, la serie storica di Nova Gorica si riferisce a un periodo che va dal 1996 al 2009. Le variazioni percentuali delle precipitazioni e delle temperature si riferiscono alla variazione dei valori medi dei due parametri fra la prima decade (1980-1989) e la terza (2000-2009). Per le stazioni di Kununurra e Nova Gorica il confronto è stato effettuato sulla base dei dati disponibili (rispettivamente 1992-2009 e 1996-2009) e pertanto le variazioni registrate non sono pienamente affidabili. I valori percentuali, riferiti ai differenti clade, indicano le proporzioni relative con cui i vari isolati in collezione sono stati raggruppati in base ai risultati delle prove di crescita, in relazione alla stazione meteorologica di riferimento.

	Precipitazioni medie (mm) 1980-2009	Variazione delle precipitazioni medie	Temperatura media (°C) 1980-2009	Variazione della temperatura media	Clade 1	Clade 2	Clade 3	Clade 4
Alghero	569	-16,7%	16,25	+4%	50%	50%	-	-
Bari	553	-16,4%	15,98	+2,3%	25%	25%	50%	-
Firenze	850	-28,5%	15,71	-0,8%	88,88%	11,12%	-	-
Gladstone	747	-10,8%	22,57	-0,2%	25%	50%	25%	-
Kununurra	915	+35,5%	27,47	-1,2%	-	-	-	100%
Milano	806	-32,4%	13,5	+15,5%	78,95%	21,05%	-	-
Nova Gorica	1341	-13,8%	13	+5,1%	50%	-	50%	-
Perth	692	-3,5%	18,32	-2,7%	33,33%	33,33%	33,34%	-
Trapani	598	-13,9%	18	+1,9%	-	-	-	100%

Le stazioni si riferiscono ai seguenti isolati: Alghero – DI50, F49; Bari – Bari72, Bari73, Bari79, Bari81; Firenze – BA19, BA18, BA24, BA25a, BA25b, BOT36, BOT57; Gladstone (Queensland, Australia) – QLD30, QLD32, QLD35, QLD39; Kununurra (North West, Australia) – SW2C; Milano – B7, BA3, BA4, BA5, BA6, BA7, BA8, BA9, BA10, BA11, BA12, BA13, BA14, BA15, BA16, BA19, BA20, BA22, BA23; Nova Gorica (Slovenia) – CMW25689, CMW25692, CMW25696, CMW26224; Perth (South West, Australia) – KT4, KT8, KT86, KT129, KT209, WA7; Trapani – BA2.

Capitolo 4

Impiego di metodi molecolari per approcci di diagnostica e filogeografia applicati alle *Botryosphaeriaceae*

INTRODUZIONE

Le *Botryosphaeriaceae* sono una famiglia di ascomiceti (*Botryosphaeriales*, *Incertae sedis*, *Dothideomycetes*) nota da molto tempo (Cesati e De Notaris, 1863; Saccardo, 1877). Essa comprende oltre 2000 specie (Slippers e Wingfield, 2007), alcune delle quali in tempi recenti sono state sempre più spesso accostate a sindromi complesse su piante legnose agrarie e forestali (Phillips, 2002; Slippers *et al.*, 2004b; Damm *et al.*, 2007a; Lazizzera *et al.*, 2008; Linaldeddu *et al.*, 2007; Slippers e Wingfield, 2007; Moricca *et al.*, 2010).

L'inquadramento tassonomico di questi microrganismi, tradizionalmente basato sull'osservazione delle strutture riproduttive, si è rivelato talvolta poco accurato, a causa delle difficoltà connesse con le chiavi di identificazione di questi, in quanto l'elevato pleomorfismo rende spesso problematica l'identificazione. A questo vanno aggiunte le difficoltà connesse all'induzione alla sporulazione *in vitro* degli isolati appartenenti a questa famiglia (Shoemaker, 1964; Pennycook e Samuels, 1985; Morgan-Jones e White, 1987; Denman *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2002; Blodgett *et al.*, 2003; Slippers *et al.*, 2004a; Luchi *et al.*, 2007).

L'introduzione delle tecniche di biologia molecolare ha permesso di superare tale problema rendendo altresì evidente come il numero di specie afferenti a questa famiglia sia stato sottostimato a causa della scarsa accuratezza delle tecniche classiche. Si è scoperto come entità note come specie costituissero in realtà complessi di specie molto affini tra loro. Tali metodiche hanno inoltre reso sempre più frequente la scoperta di nuove entità (Slippers *et al.*, 2004a; Alves *et al.*, 2006; Burgess *et al.*, 2006; Damm *et al.*, 2007b; Alves *et al.*, 2008; de Wet *et al.*, 2009).

Queste nuove acquisizioni hanno portato a una completa revisione tassonomica della famiglia, inizialmente basata sulle sequenze della regione ITS dell'rDNA e successivamente estesa a più loci informativi; È stata inoltre abbandonata la canonica distinzione fra anamorfo e teleomorfo, assegnando alle specie un nome unico, corrispondente spesso a quello della forma conidica. Questa scelta è stata adottata perché le forme perfette, in questa famiglia, sono raramente osservate in natura; inoltre, l'incertezza tassonomica dovuta alla

classificazione su basi morfologiche, in diversi casi ha collegato più anamorfi allo stesso teleomorfo, errore cui si è ovviato adottando un nome unico per ogni specie (Denman *et al.*, 2000; Slippers *et al.*, 2004a; Alves *et al.*, 2006; Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008).

Acclarata l'importanza di tali tecniche nello studio delle *Botryosphaeriaceae*, gli scopi di questo lavoro sono stati:

- saggiare l'utilità diagnostica dell'analisi ITS-RFLP nell'identificazione di isolati appartenenti a questa famiglia;
- indagare sulla validità della regione ITS nel delineare la filogeografia della specie cosmopolita *Diplodia seriata*.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 Estrazione del DNA

Il DNA degli isolati in collezione è stato estratto utilizzando il protocollo CTAB (Möller *et al.*, 1992).

Per ogni isolato, il micelio di una piastra completamente colonizzata è stato raccolto con un bisturi sterile e posto in una provetta Eppendorf da 2 ml. Il micelio è stato successivamente liofilizzato e frantumato con un micro pestello sterile; sono stati poi aggiunti 500 µl di buffer TES (Tris 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 2%) e 100 µl di enzima Proteinasi K; la sospensione è stata brevemente agitata per facilitare la dispersione dei frammenti di micelio nel buffer.

La sospensione è stata incubata a 60°C per un ora, agitandola ad intervalli regolari; al termine di questa fase sono stati aggiunti 140 µl di NaCl e 65 µl di buffer CTAB al 10% e la sospensione è stata nuovamente posta in incubazione a 60°C per 10 minuti. Nella provetta sono stati poi aggiunti 905 µl di buffer SEVAG (cloroformio/alcol isoamilico: 24:1), il tutto è stato miscelato delicatamente ed incubato a 4°C per 10 minuti e successivamente centrifugato; al termine della centrifugazione il surnatante presente sopra la fase precipitata è stato prelevato, avendo cura di non prendere residui di questa, ed è stato posto in una nuova provetta Eppendorf da 1,5 ml.

Al surnatante, trasferito nella nuova provetta, è stata aggiunta un'aliquota pari a metà volume di questo, di isopropanolo; questa miscela è stata incubata in ghiaccio per 30 minuti, onde lasciar precipitare gli acidi nucleici; successivamente, la sospensione è stata centrifugata per 5 minuti a 12000 RPM, per permettere al precipitato di depositarsi sul fondo della provetta. La fase acquosa è stata eliminata e la provetta è stata posta ad asciugare su carta assorbente sterile per circa 5 minuti.

Gli acidi nucleici precipitati sono stati lavati due volte con etanolo al 70% conservato a -20°C; l'etanolo è stato successivamente rimosso e la provetta è stata posta di nuovo ad asciugare su carta sterile. Per permettere l'evaporazione completa di ogni residuo di etanolo, il precipitato è stato incubato (avendo cura di tenere il tappo della provetta aperto) a 60°C per 5 minuti.

Gli acidi nucleici sono stati poi risospesi in 50 μ l di acqua purificata sterile e a questa sono stati aggiunti 3 μ l di enzima RNasi A per digerire l'RNA presente.

Il DNA ottenuto è stato conservato in congelatore, a -20°C, fino al momento dell'utilizzo.

4.2.2 Amplificazione del DNA

Due differenti coppie di primer, le cui sequenze sono riportate nella Tab. 1, sono state utilizzate per amplificare, rispettivamente, la regione ITS dell'rDNA (la regione di cui si dispongono un maggior numero di sequenze in database) e una porzione del gene traslation elongation factor 1- α (EF1- α), nei casi in cui la regione ITS non fosse stata sufficiente per una corretta identificazione. Il protocollo di amplificazione utilizzato è stato identico per entrambe le coppie di primer.

La miscela, per ogni singola reazione, era risultata composta da 2,5 unità di Crimson *Taq* DNA polimerasi (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 10 mM di buffer 1X addizionato di MgCl₂ (Roche Diagnostics - USA), 0,2 mM per ciascun dNTP, 0,2 μ M di ogni primer, 2 μ l di DNA e acqua purificata fino al volume finale di 50 μ l.

Le condizioni di reazione sono state le seguenti: una prima fase di denaturazione del DNA a 95°C per 3 minuti; 35 cicli con temperatura di denaturazione a 94°C per 30 secondi; appaiamento a 52°C per 30 secondi ed estensione a 72°C per 1 minuto; una fase di estensione finale a 72°C per 7 minuti.

4.2.3 Sequenziamento ed analisi del DNA

Il DNA amplificato è stato dapprima purificato, per centrifugazione (720 rcf, relative centrifugal force, 2 minuti) attraverso colonne contenenti una sospensione di Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA); una volta purificati, gli ampliconi sono stati sequenziati, sia in direzione forward che in reverse, utilizzando gli stessi primer usati per l'amplificazione. Il sequenziamento è stato effettuato utilizzando il kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystem,

Foster City, CA, USA), secondo le istruzioni fornite dal produttore, facendo correre i campioni in un sequenziatore ABI PRISM 377 (Perkin-Elmer Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Le sequenze in forward e reverse sono state allineate e confrontate con il software Bioedit v7.0.9.0 (Hall, 1999), per ottenere sequenze più lunghe ed accurate: questo consente un confronto appaiato dei cromatogrammi di sequenza, permettendo di correggere eventuali errori o basi dubbie; estendendo la lunghezza della sequenza grazie alle code di basi a monte e a valle della sequenza appaiata; queste sono state processate su BLAST, il principale database online di GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome), ed utilizzate per verificare l'identificazione delle specie precedentemente identificate su base morfologica (Capitolo 3); Il gene EF1- α stato sequenziato solo per quei campioni la cui regione ITS non si è rivelata sufficiente per una corretta identificazione delle entità allo studio. Esso non è stato utilizzato per applicazioni di filogenetica.

La regione ITS è stata invece sequenziata per tutti i ceppi presenti in collezione (Tab. 2). Le sequenze sono state allineate con il software online MAFFT v6.240 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Le analisi delle sequenze sono state effettuate con il software Mega v4.0 (Tamura *et al.*, 2007); per la costruzione dell'albero filogenetico è stato utilizzato il metodo Neighbor Joining, il modello di sostituzione delle basi utilizzato è stato quello proposto da Jukes e Cantor (1969), i gap non sono stati esclusi dall'elaborazione; l'affidabilità dei rami del dendrogramma è stata valutata con il test di bootstrap con 1000 repliche (Felsenstein, 1985).

Analisi RFLP della regione ITS

Gli ampliconi della regione ITS ottenuti con la PCR, purificati come sopra descritto, sono stati sottoposti a digestione enzimatica. In ogni provetta Eppendorf da 0,2 ml sono stati posti 10 μ l di DNA amplificato, 1,5 μ l di Tango Buffer 10X (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA), 10 unità per ciascuno degli enzimi EcoRI e MseI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) e acqua purificata fino al raggiungimento del volume finale di 15 μ l.

I campioni sono stati poi incubati per 3 ore alla temperatura di 37°C, durante i quali gli enzimi di restrizione hanno digerito il DNA amplificato, per essere infine inattivati alla temperatura di 65°C per 15 minuti.

I risultati della digestione sono stati osservati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2,5%, utilizzando come intercalante il GelRed loading dye (FABI, Pretoria, South Africa), operando a 100 V per 45 minuti.

4.2.5 Analisi filogeografica della regione ITS di *Diplodia seriata*

E' stato preparato un dataset con le sequenze della regione ITS di 81 ceppi di *Diplodia seriata* di differente provenienza geografica, ottenute personalmente nell'ambito del presente lavoro ed integrate, per avere il quadro più completo possibile, con tutte le sequenze analoghe del fungo reperibili in GenBank (Tab. 3).

Analogamente a quanto fatto con le altre *Botryosphaeriaceae*, l'analisi delle sequenze è stata inizialmente effettuata con il software Mega v4.0 (Tamura *et al.*, 2007), utilizzando il metodo Neighbor Joining, secondo i parametri precedentemente riportati; l'analisi è stata ripetuta una seconda volta, cambiando soltanto il metodo statistico, cioè usando la Maximum Parsimony, in quanto consente un confronto più accurato fra i siti informativi e offre come risultato un raggruppamento secondo le minime differenze possibili fra le basi; il modello di sostituzione delle basi utilizzato è stato quello elaborato da Jukes e Cantor (1969), valutando l'affidabilità dei cladi tramite bootstrap con 1000 repliche (Felsenstein, 1985).

Lo stesso dataset, integrato con le coordinate geografiche dell'area di provenienza dei ceppi, è stato elaborato con il software ANeCA v1.2 (Clement *et al.*, 2000; Posada *et al.*, 2000; Panchal, 2007), in modo da ottenere un network che, oltre all'elaborazione delle sequenze, utilizzasse come carattere anche la provenienza geografica. L'elaborazione dei dati è stata operata secondo il protocollo riportato nella guida del software.

4.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.3.1 Identificazione molecolare degli isolati

Le sequenze ottenute hanno permesso, per i ceppi isolati personalmente, di confermare ed integrare i risultati precedentemente ottenuti tramite identificazione morfologica (Capitolo 3). L'utilizzo dei dati ottenuti dalle sequenze ha permesso di chiarire l'identità dei ceppi BA4, BA11 e BA13. Questi tre isolati erano stati precedentemente identificati come *Dothiorella* spp., in quanto producono conidi ovali, pigmentati, a parete liscia e monosettati, tipici di quel genere. Dal confronto dei dati avuti dalle sequenze di ITS ed EF1- α da noi ottenute con quelle presenti nei database, i ceppi BA4 e BA11 sono risultati parimenti affini a *Diplodia juglandis* (ceppo CBS 188.87) e a *Diplodia coryli* (ceppo CBS 242.51). Tale risultato è in linea con quanto osservato da altri autori (Phillips *et al.*, 2008), che vede le due specie molto affini anche a fronte di un'analisi multiloculare condotta su cinque diverse regioni genomiche.

Le sequenze dell'isolato BA13, riportato al momento come *Diplodia* sp., hanno mostrato scarsa omologia con le sequenze già depositate nei database, accostando maggiormente il ceppo alla specie *Diplodia seriata*. Analizzando le sequenze del gene 5.8S, però, è possibile notare come questo ceppo sia sensibilmente differente rispetto ai ceppi di *Diplodia seriata* isolati nella stessa zona (Tab. 4). Tali differenze, in una regione conservata come il gene 5.8S dell'rDNA, inducono a ipotizzare che il ceppo possa appartenere ad una specie non ancora descritta. Ulteriori approfondimenti sono necessari per chiarire l'identità di questo ceppo.

Il dendrogramma, costruito con le sequenze ITS di tutti gli isolati in collezione, conferma la variabilità di tale regione per ricostruire a grandi linee la filogenesi delle *Botryosphaeriaceae*, con risultati affidabili (dati da valori di bootstrap superiori a 50)(Fig. 1).

Per quanto riguarda il grado di discriminazione intra-specie, questo tipo di approccio ha permesso di separare i ceppi di *Botryosphaeria dothidea* originari dall'Australia da quelli europei (nel cui gruppo è incluso anche l'unico isolato proveniente dagli USA, il ceppo 2191). Scarso livello di risoluzione si è avuto

all'interno del clado contenente i ceppi di *Diplodia seriata*, dove i bassi valori di bootstrap interni hanno evidenziato una sostanziale omogeneità della popolazione dei ceppi di questa specie. Tale risultato peraltro non sorprende perché gli isolati provenivano tutti dalla medesima area geografica. All'interno dello stesso clado, ma ben separato dagli altri ceppi, è stato collocato il summenzionato ceppo BA13, a conferma della sua maggior affinità con la specie *Diplodia seriata*.

I ceppi di *Diplodia coryli*/*D. juglandis* sono risultati affini a quelli del clado del genere *Dothiorella*, ben separati dal clado che comprende i generi *Diplodia* e *Lasiodiplodia* e vicini al clado *Neofusicoccum parvum*. Alla luce di questi risultati, considerando anche che gli isolati BA4 e BA11 hanno prodotto *in vitro* conidi più simili alla “forma *Dothiorella*” che non a quella “*Diplodia*”, si deduce che *D. coryli* e *D. juglandis* andrebbero collocate all'interno del genere *Dothiorella*. Inoltre, considerando l'elevato grado di similarità delle sequenze per tutte e cinque le regioni testate da Phillips *et al.* (2008), si ritiene che le due entità possano essere raggruppate in un'unica specie.

4.3.2 Analisi RFLP dell'ITS

I profili ottenuti dalla digestione enzimatica, sono stati raggruppati per specie (o per gruppi di specie affini).

Gli isolati di *Botryosphaeria dothidea* hanno mostrato profili coerenti, con egual numero di frammenti di dimensioni comparabili, fatte salve le eccezioni rappresentate dai ceppi CMW25692, QLD35 e BOT36 (Fig. 2).

Per i ceppi di *Neofusicoccum parvum* si sono avuti risultati contrastanti: su 5 ceppi testati, due hanno prodotto profili sensibilmente differenti (Fig. 3).

Per i ceppi del genere *Diplodia* (esclusi gli isolati BA4 e BA11, inseriti fra gli isolati del genere *Dothiorella* per le ragioni sopra esposte) si sono avuti risultati nettamente migliori (Fig. 4), ottenendo profili caratteristici per ciascuna specie; l'unico limite riscontrato riguarda il ceppo BA13 che, pur discostandosi dalla specie *Diplodia seriata*, ha generato un profilo indistinguibile dagli isolati di questa.

Il gruppo *Dothiorella* (Fig. 5), se da una parte contraddice la maggiore affinità del ceppo BA10 con quello DI50 osservata in Fig. 1, dall'altra esplicita

ancora di più come il complesso *D. coryli/D. juglandis* sia affine al genere *Dothiorella*.

I risultati ottenuti in questa prova, pur se con delle limitazioni, propongono la tecnica di ITS-RFLP come un possibile alternativa, da meglio mettere a punto, alle reazioni di sequenziamento utilizzabili a fini diagnostici, riducendo i costi e velocizzando il procedimento di identificazione.

Il metodo RFLP è stato impiegato in questo studio solo come strumento per una preliminare differenziazione dei gruppi tassonomici.

4.3.3 Analisi filogeografica della regione ITS di *Diplodia seriata*

Il dataset delle sequenze ITS degli 81 ceppi di *Diplodia seriata* (Tab.3), elaborato con il software Mega v4.0, non ha offerto raggruppamenti statisticamente affidabili (valori di bootstrap quasi sempre inferiori a 50) con nessuna delle elaborazioni descritte (Figg. 6-7).

Lo stesso dataset, elaborato con il software ANeCA v1.2, integrando informazioni di natura geografica, ha fornito un network in cui i raggruppamenti appaiono più coerenti (Fig. 8). In particolare, i ceppi provenienti dall'Iran sono stati raggruppati tutti nello stesso clado; gran parte dei ceppi di provenienza sudafricana si sono concentrati in un clado separato; gli isolati italiani mostrano una maggiore variabilità rispetto agli altri di diversa provenienza, il che indurrebbe a ipotizzare che le popolazioni presenti nel Paese siano arrivate da luoghi anche molto differenti (Iran, America centro-settentrionale, Sud Africa), seguendo rotte mercantili o pattern climatici ben definiti.

Tale tipo di risultato, condotto su una sola regione genomica, non può essere considerato a tutti gli effetti affidabile, anche in virtù delle analisi filogenetiche precedentemente condotte sul dataset. Quel che si può trarre, invece, è tutta una serie di indicazioni che, corroborate da un'analisi molecolare multi genica, possono aiutare a ricostruire le "vie di introduzione" di varie specie di *Botryosphaeriaceae* nei diversi Paesi.

4.4 CONCLUSIONI

La complessità tassonomica delle *Botryosphaeriaceae* è confermata dall'analisi del patrimonio genetico delle specie che vi afferiscono; detta complessità rende assolutamente necessario un approccio multiloculare per poter svolgere studi accurati.

Tale regione del DNA ribosomiale può essere utilizzata quale regione target per l'identificazione dei ceppi non solo attraverso il sequenziamento; una analisi più approfondita dell'ITS-RFLP può portare all'individuazione di un enzima (o di un set di enzimi) capace di dare profili caratteristici a livello di specie; la messa a punto di un protocollo affidabile renderebbe il processo identificativo più veloce ed economico, bypassando il processo di sequenziamento o limitandolo a pochi organismi di controllo.

Per quanto riguarda l'approccio di filogenetica, la regione ITS si mostra sufficiente a gettare luce sui i grandi raggruppamenti in seno alla famiglia; Diversamente, per lo studio della variabilità intraspecifica, come per l'identificazione dei ceppi, tale regione risulta essere insufficiente, pur se capace comunque di fornire qualche utile indicazione. Ad esempio, nel presente lavoro, ha raggruppato insieme tutti i ceppi di *Botryosphaeria dothidea* di provenienza australiana.

Tale regione riesce a fornire qualche indicazione utile anche negli studi a carattere filogenetico, ma anche in questo caso è consigliabile un approccio multigenico per una più concreta risoluzione del problema.

L'approccio filogeografico può essere estremamente utile, se condotto in maniera scrupolosa, nel ricostruire il flusso di diffusione che le varie specie di *Botryosphaeriaceae* hanno seguito nel colonizzare nuovi territori. Tali informazioni, confrontate sia con dati di natura climatica che con l'insieme di attività umane che possono contribuire alla diffusione di questi miceti, possono risultare estremamente utili nella messa a punto di modelli epidemiologici, soprattutto per quelle specie che risultano essere più virulente.

Infine, il confronto fra studi di natura filogeografica, serie climatiche e caratterizzazione ecotipica (Capitolo 3), può fornire un sostanzioso contributo alla

comprensione della biologia di microrganismi estremamente complessi, ed ancora relativamente poco conosciuti, come le *Botryosphaeriaceae*.

Bibliografia

- Alves A., Correia A., Philips A. J. L. 2006. Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. *Fungal Diversity* **23**: 1-15.
- 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.
- Blodgett J. T., Bonello P., Stanosz G. R. 2003. An effective medium for isolating *Sphaeropsis sapinea* from asymptomatic pines. *Forest Pathology* **33**: 395-404.
- Burgess T. I., Barber P. A., Mohali S., Pegg G., de Beer W., Wingfield M. J. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* **98**: 423-435.
- Carbone I., Kohn L. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* **91**: 553-556.
- Cesati V., De Notaris G. 1863. Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeri più o meno appartenenti al genere *Sphaeria* nell'antico significato attribuitogli da Persoon. *Commentario della Società Crittogamica Italiana* **1**: 177-240.
- Clement M., Posada D., Crandall K. A. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**: 1657-1659.
- 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.
- Damm U., Crous P. W., Fourie P. H. 2007a. *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* **99**: 664-680.
- Damm U., Fourie P. H., Crous P. W. 2007b. *Aplosporella prunicola*, a novel species of anamorphic *Botryosphaeriaceae*. *Fungal Diversity* **27**: 35-43.
- de Wet J., Slippers B., Preisig O., Wingfield B. D., Tsopelas P., Wingfield M. J. 2009. Molecular and morphological characterization of *Dothiorella casuarini* sp. nov. and other *Botryosphaeriaceae* with diplodia-like conidia. *Mycologia* **101**: 503-511.

- Denman S., Crous P. W., Taylor J. E., Kang J., 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.
- Felsenstein J. 1985. Confidence intervals on phylogenetics: an approach using bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Jukes T. H., Cantor C. R. 1969. Evolution of protein molecules. In: *Mammalian protein metabolism* (Munro H. N. eds.). Academic press, New York: 21-132.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- Lazizzera 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.
- Linaldeddu B. T., Franceschini A., Luque J., Phillips A. J. L. 2007. First report of canker disease caused by *Botryosphaeria parva* on cork oak trees in Italy. *Plant Disease* **91**: 324.
- Luchi N., Capretti P., Bonello P. Production of *Diplodia scrobiculata* and *Diplodia pinea* pycnidia on ground Austrian pine needle agar medium. *Phytopathologia Mediterranea* **46**: 230-235.
- Möller E. M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H. H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* **20**: 6115-6116.
- Morgan-Jones G., White J. F. J. 1987. Notes on coelomycetes. II. Concerning the *Fusicoccum* anamorph of *Botryosphaeria ribis*. *Mycotaxon* **30**: 117-125.
- Moricca, S., Uccello, A., Ragazzi, A. 2010. Micocenosi endofitiche in foreste urbane sottoposte a stress ambientale. *Micologia Italiana* **39** (1): 47-56.
- Panchal M. 2007. The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Bioinformatics* **23**: 509-510.

- Posada D., Crandall K. A., Templeton A. R. 2000. GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* **9**: 487-488.
- Pennycook S. R., Samuels G. J. 1985. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit of *Actinia deliciosa* (kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon* **24**: 445-458.
- 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., 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.
- Saccardo P. A. 1877. Fungi Veneti novi vel critici. *Michelia* **1**: 1-72.
- Shoemaker R. A. 1964. Conidial states of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. *Canadian Journal of Botany* **42**: 1297-1301.
- 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., Carnegie A. J., Wingfield M. J. 2004b. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. *Studies In Mycology* **50**: 343-358.
- 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.
- 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
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: *PCR protocols: a guide to*

methods and applications (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. eds). Academic press, San Diego: 315-322.

Capitolo 4

Appendice

Tab. 5 – Primer utilizzati nelle reazioni di amplificazione.

Nome primer	Regione target	Sequenza	Riferimento
ITS1 (forward)	ITS	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White et al, 1990
ITS4 (reverse)	ITS	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White et al, 1990
EF1-728F (forward)	EF1- α	5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'	Carbone et Kohn, 1999
EF1-986R (reverse)	EF1- α	5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'	Carbone et Kohn, 1999

Tab. 6 – Dataset isolati in collezione. Per ciascuno di essi, è stata sequenziata la regione ITS dell'rDNA

Specie	Ceppo	Ospite	Provenienza	Isolato da
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	2191	<i>Vitis vinifera</i>	USA - Missouri	A. Spagnolo
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	B7	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BA5	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BA23	<i>Crataegus monogyna</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BA25a	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Italia - Pistoia	A. Uccello
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BA25b	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Italia - Pistoia	A. Uccello
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BOT36	<i>Vitis vinifera</i>	Italia - San Casciano (FI)	A. Spagnolo
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BOT57	<i>Vitis vinifera</i>	Italia - San Casciano (FI)	A. Spagnolo
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW 25692	<i>Cotinus coggygria</i>	Slovenia - Gorjansko	D. Jurc
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW 25696	<i>Ostrya carpinifolia</i>	Slovenia - Gorjansko	D. Jurc
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW 26224	<i>Ostrya carpinifolia</i>	Slovenia - Stolovec	D. Jurc
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KT4	<i>Eucalyptus marginata</i>	Australia - Southern Western	T. Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KT129	<i>Acacia cochlearis</i>	Australia - Southern Western	T. Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KT209	<i>Acacia rostellifera</i>	Australia - Southern Western	T. Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	QLD30	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Australia - Southern Queensland	T. Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	QLD32	<i>Eucalyptus grandis</i>	Australia - Southern Queensland	T. Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	QLD35	<i>Eucalyptus grandis</i>	Australia - Southern Queensland	T. Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	QLD39	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Australia - Southern Queensland	T. Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	SL 353	<i>Vitis vinifera</i>	Spagna	A. Spagnolo
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	WA7	<i>Corymbia callophylla</i>	Australia - Southern Western	T. Burgess
<i>Diplodia corticola</i>	Bari 72	<i>Quercus pubescens</i>	Italia - Bari	N. Luisi
<i>Diplodia corticola</i>	Bari 73	<i>Quercus pubescens</i>	Italia - Bari	N. Luisi
<i>Diplodia corticola</i>	Bari 79	<i>Quercus cerris</i>	Italia - Bari	N. Luisi
<i>Diplodia corticola</i>	Bari 81	<i>Quercus cerris</i>	Italia - Bari	N. Luisi
<i>Diplodia juglandis</i>	BA4	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Diplodia juglandis</i>	BA11	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Diplodia mutila</i>	BA12	<i>Alnus cordata</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Diplodia mutila</i>	BA14	<i>Alnus cordata</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Diplodia pinea</i>	BA1	<i>Sorbus torminalis</i>	Italia - Monticiano (SI)	A. Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA3	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA6	<i>Quercus rubra</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA7	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello

<i>Diplodia seriata</i>	BA8	<i>Quercus rubra</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA9	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA15	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA16	<i>Quercus rubra</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA19	<i>Prunus avium</i>	Italia - Pistoia	A. Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA22	<i>Carpinus betulus</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Diplodia sp.</i>	BA13	<i>Quercus rubra</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Dothiorella iberica</i>	DI50	<i>Quercus suber</i>	Italia - Sassari	A. Franceschini
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	BA10	<i>Acer platanoides</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Lasiodiplodia sp.</i>	SW2C	<i>Santalum album</i>	North Western Australia	T. Burgess
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	BA2	<i>Vitis vinifera</i>	Italia - Marsala (TP)	S. Burruano
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BA18	<i>Vitis vinifera</i>	Italia - San Casciano (FI)	A. Spagnolo
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BA20	<i>Quercus robur</i>	Italia - Milano	A. Uccello
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BA24	<i>Quercus rubra</i>	Italia - Pistoia	A. Uccello
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BOT22	<i>Vitis vinifera</i>	Italia - San Casciano (FI)	A. Spagnolo
<i>Neofusicoccum parvum</i>	F49	<i>Quercus suber</i>	Italia - Sassari	A. Franceschini

Tab. 7 – Ceppi di *Diplodia seriata* utilizzati nell'analisi filogeografica della regione ITS

Ceppo	Provenienza	Numero di accesso GenBank
B7	Puglia (Italia)	FJ481590.1
B10	Puglia (Italia)	FJ481591.1
B11	Puglia (Italia)	FJ481592.1
B12	Puglia (Italia)	FJ481593.1
B14	Puglia (Italia)	FJ481594.1
B20	Puglia (Italia)	FJ481595.1
B24	Puglia (Italia)	FJ481596.1
B39	Puglia (Italia)	FJ481597.1
BA3	Milano (Italia)	
BA6	Milano (Italia)	
BA7	Milano (Italia)	
BA8	Milano (Italia)	
BA9	Milano (Italia)	
BA13	Milano (Italia)	
BA15	Milano (Italia)	
BA16	Milano (Italia)	
BA19	Milano (Italia)	
BA22	Milano (Italia)	
CAP154	Sud Italia	EU392303.1
CAP160	Sud Italia	EU392304.1
CAP171	Sud Italia	EU392305.1
CAP172	Sud Italia	EU392287.1
CAP203	Sud Italia	EU392288.1
CAP205	Sud Italia	EU392289.1
CAP206	Sud Italia	EU392290.1
CAP207	Sud Italia	EU392291.1
CAP208	Sud Italia	EU392292.1
CAP217	Sud Italia	EU392293.1
CAP220	Sud Italia	EU392294.1
CAP228	Sud Italia	EU392298.1
CAP229	Sud Italia	EU392299.1
CAP337	Bulgaria	EU483658.1
CBS121485	Spagna	EU650671.1
CMW12284	Minnesota (USA)	EU220443.1
CMW12514	Francia	EU220439.1
CMW12516	Francia	EU220442.1
CMW13233	Francia	EU220437.1
DO4	Australia	FJ176562.1
II12	Australia	FJ176560.1
J10	Australia	FJ176561.1
WP-ME10	Australia	FJ176563.1
WP-ME21	Australia	FJ176564.1
WP-VQ14	Australia	FJ176565.1
WP-YVW2	Australia	FJ176566.1
IRB1	Iran	GU121876.1
IRB2	Iran	GU121877.1
IRB3	Iran	GU121878.1
IRB4	Iran	GU121879.1
IRB5	Iran	GU121880.1
IRB6	Iran	GU121881.1
IRB7	Iran	GU121882.1
IRB8	Iran	GU121883.1
IRB9	Iran	GU121884.1
IRB10	Iran	GU121885.1
IRB11	Iran	GU121886.1
IRB12	Iran	GU121887.1
IRB13	Iran	GU121888.1
IRB14	Iran	GU121889.1
IRB15	Iran	GU121890.1
STE-U 5815	Sud Africa	EF445325.1
STE-U 5817	Sud Africa	EF445326.1
STE-U 5818	Sud Africa	EF445327.1

STE-U 5819	Sud Africa	EF445328.1
STE-U 5821	Sud Africa	EF445329.1
STE-U 5822	Sud Africa	EF445330.1
STE-U 5823	Sud Africa	EF445331.1
STE-U 5826	Sud Africa	EF445332.1
STE-U 5827	Sud Africa	EF445333.1
STE-U 5828	Sud Africa	EF445334.1
STE-U 5829	Sud Africa	EF445335.1
STE-U 5899	Sud Africa	EF445336.1
STE-U 5900	Sud Africa	EF445337.1
STE-U 5902	Sud Africa	EF445338.1
UCD1010BC	Messico	EU012377.1
UCD1015BC	Messico	EU012378.1
UCD1035BC	Messico	EU012379.1
UCD1038BC	Messico	EU012380.1
UCD1052BC	Messico	EU012381.1
UCD1061BC	Messico	EU012382.1
UCD2438TX	Texas (USA)	FJ790840.1
UCD2457TX	Texas (USA)	FJ790841.1

Tab. 8 – gene Diagramma del polimorfismo di sequenza riscontrato nel gene ribosomiale 5.8S fra diversi ceppi di *Diplodia seriata*. I numeri indicano le posizioni delle variazioni nucleotidiche sul genere; i trattini rappresentano i gap dovuti a inserzioni/delezioni; i punti rappresentano basi omologhe a quelle della sequenza riportata nella prima riga, usata come riferimento.

		5.8S																		
Ceppo	Provenienza	3	4	7	8	9	13	15	23	27	29	30	31	32	33	34	47	51	54	55
BA3	Milano (Italia)	C	T	C	A	A	C	G	G	C	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-
BA6	Milano (Italia)	-	-	-	-	-	-	.	-	A	G
BA7	Milano (Italia)	-	-	-	-	-	-	.	-	A	G
BA8	Milano (Italia)	-	-	-	-	-	-	.	-	A	G
BA9	Milano (Italia)	-	-	-	-	-	-	.	-	A	G
BA15	Milano (Italia)	-	-	-	-	-	-	.	-	A	G
BA16	Milano (Italia)	-	-	-	-	-	-	.	-	A	G
BA19	Pistoia (Italia)	-	-	-	-	-	-	.	-	A	G
BA22	Milano (Italia)	-	-	-	-	-	-	.	-	A	G
BA13	Milano (Italia)	A	C	T	-	-	A	A	T	G	G	T	T	C	T	G	A	A	A	G

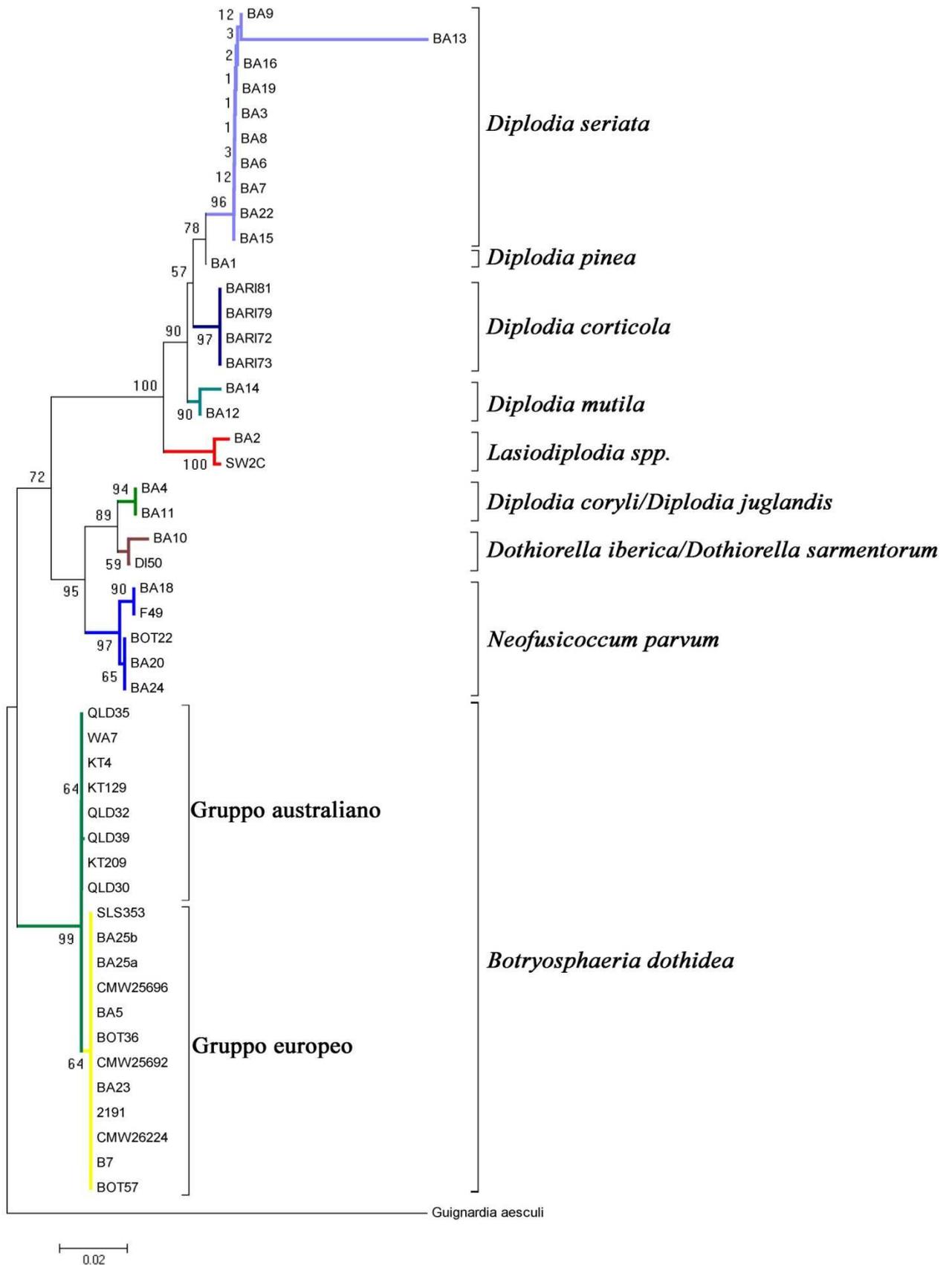


Fig. 5 – Albero filogenetico della regione ITS riferito agli isolati in collezione. Il metodo di elaborazione statistica utilizzato è il Neighbor Joining; il modello di sostituzione dei nucleotidi è quello proposto da Jukes e Cantor (1969); il bootstrap è stato calcolato su 1000 repliche.

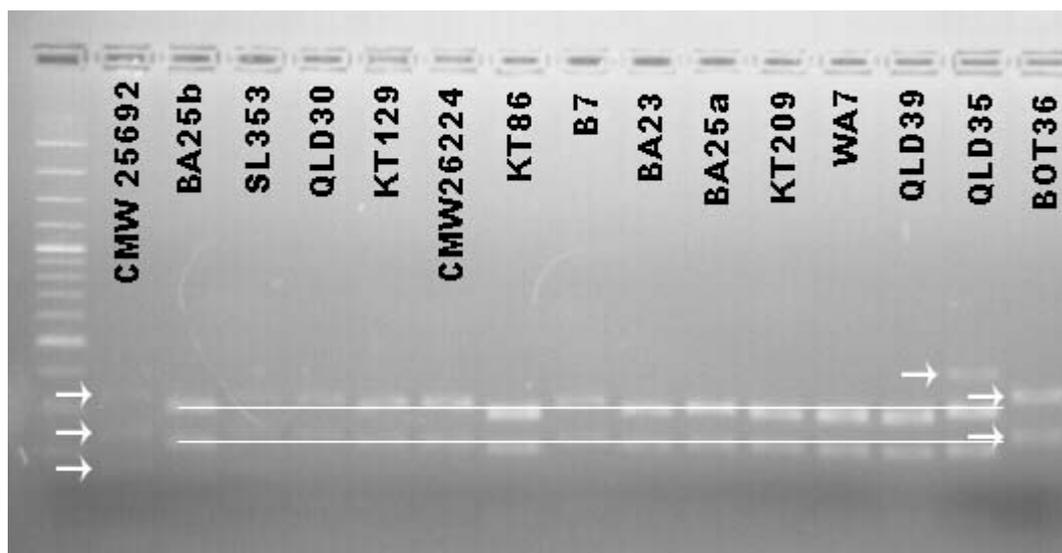


Fig. 6 – *Botryosphaeria dothidea*: profili ottenuti tramite ITS-RFLP; nel primo pozzetto è stato caricato un ladder standard con frammenti che vanno da 100 a 1500 bp (incrementi di 100 bp); gli altri pozzetti sono stati caricati con i campioni di ITS rDNA digeriti degli isolati sopra riportati.

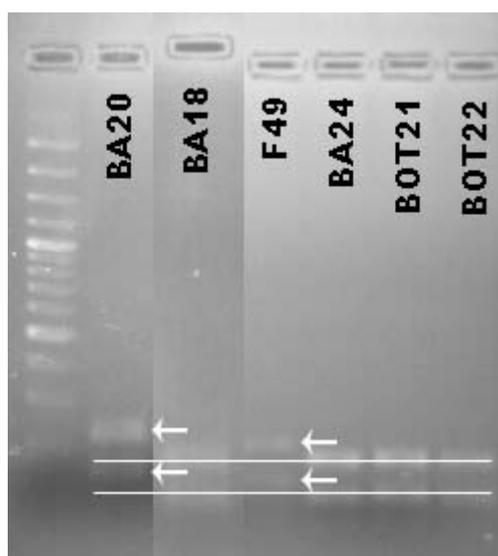


Fig. 7 – *Neofusicoccum parvum*: profili ottenuti tramite ITS-RFLP; nel primo pozzetto è stato caricato un ladder standard con frammenti che vanno da 100 a 1500 bp (incrementi di 100 bp); gli altri pozzetti sono stati caricati con i campioni di ITS rDNA digeriti degli isolati sopra riportati.

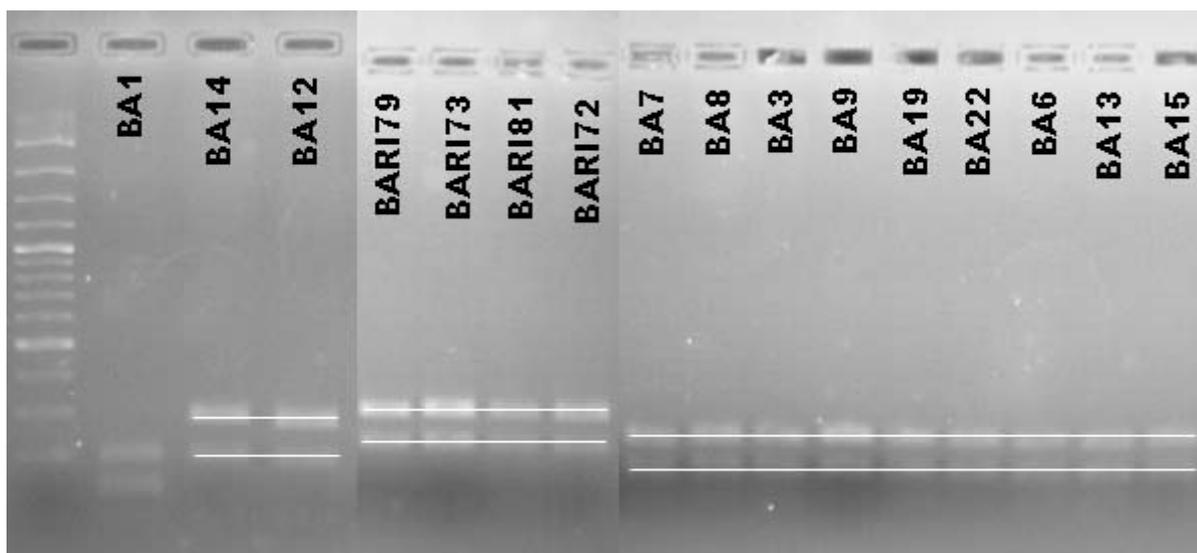


Fig. 8 – *Diplodia* spp.: profili ottenuti tramite ITS-RFLP; nel primo pozzetto è stato caricato un ladder standard con frammenti che vanno da 100 a 1500 bp (incrementi di 100 bp); gli altri pozzetti sono stati caricati con i campioni di ITS rDNA digeriti degli isolati sopra riportati.

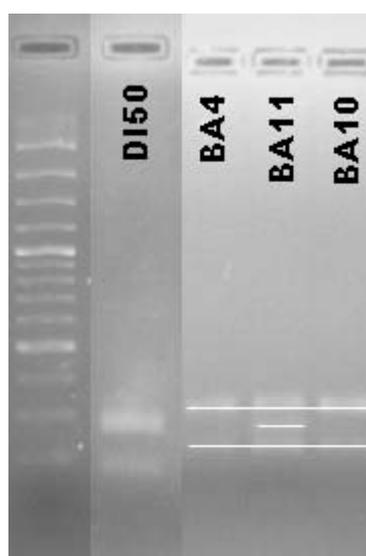


Fig. 9 – *Dothiorella* spp.: profili ottenuti tramite ITS-RFLP; nel primo pozzetto è stato caricato un ladder standard con frammenti che vanno da 100 a 1500 bp (incrementi di 100 bp); gli altri pozzetti sono stati caricati con i campioni di ITS rDNA digeriti degli isolati sopra riportati.

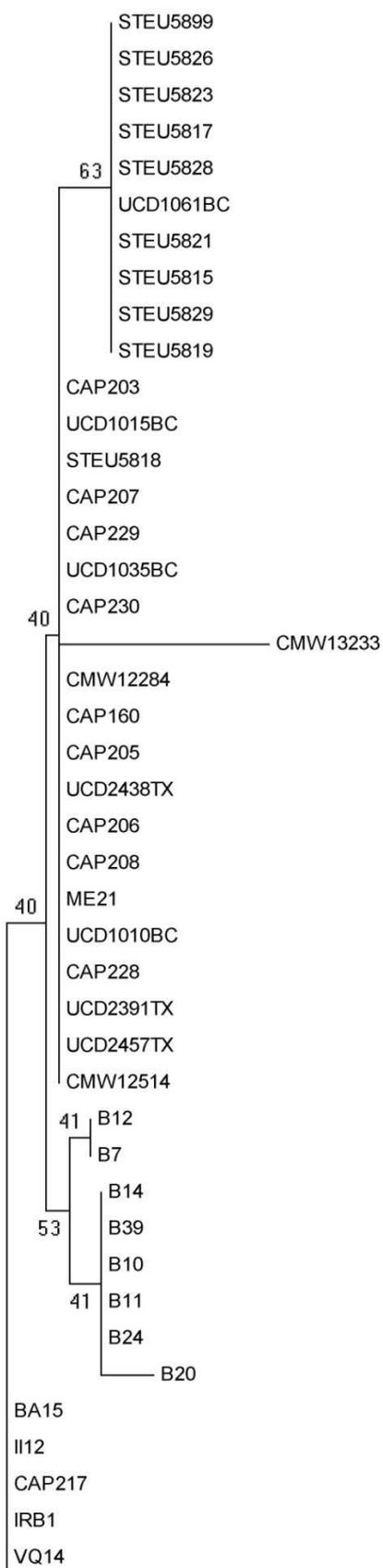


Fig. 6 - P.1

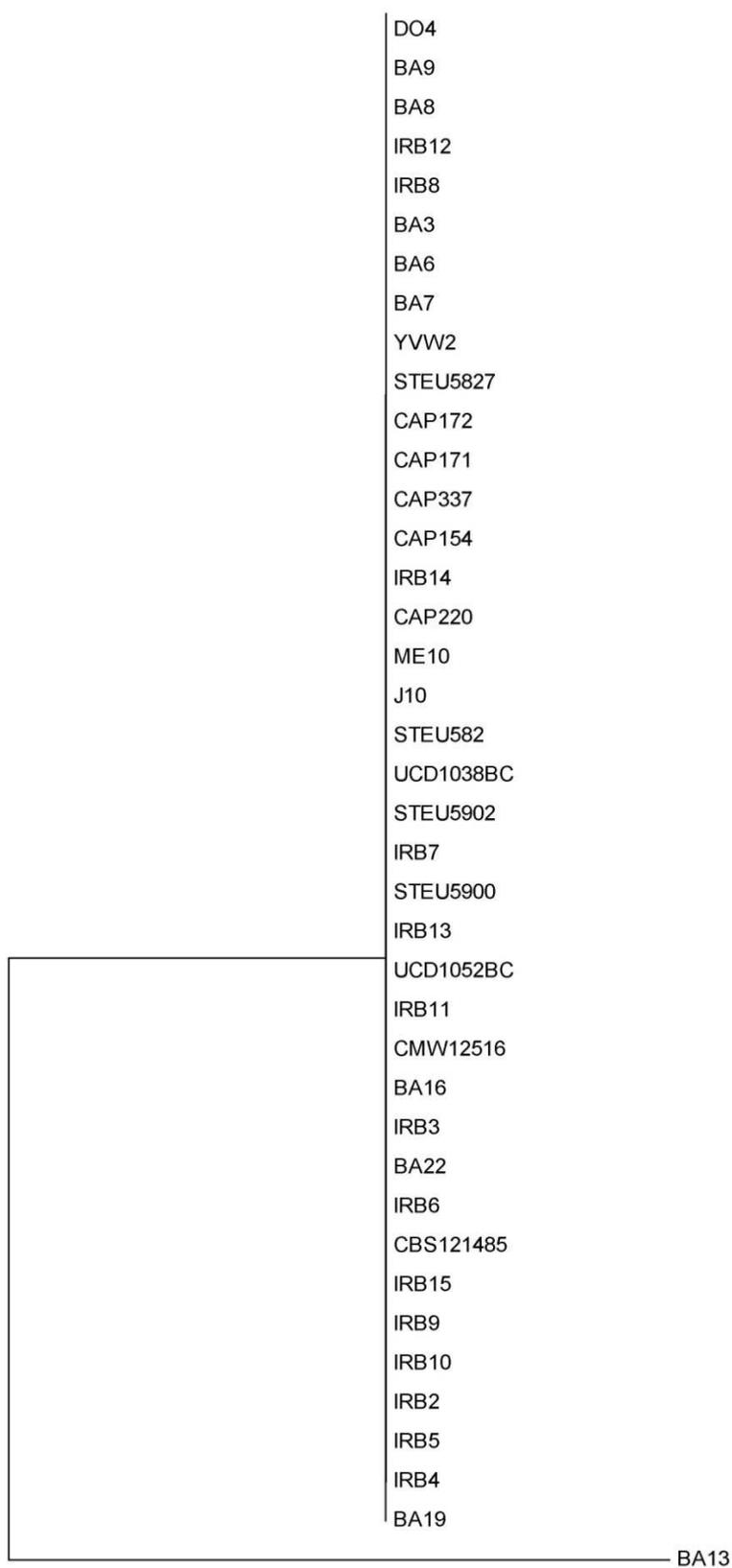


Fig. 6 P.2

Fig. 10 – *Diplodia seriata*: ITS dataset elaborato con il metodo Neighbor Joining, il modello di sostituzione nucleica Jukes Cantor, validato con bootstrap con 1000 repliche.

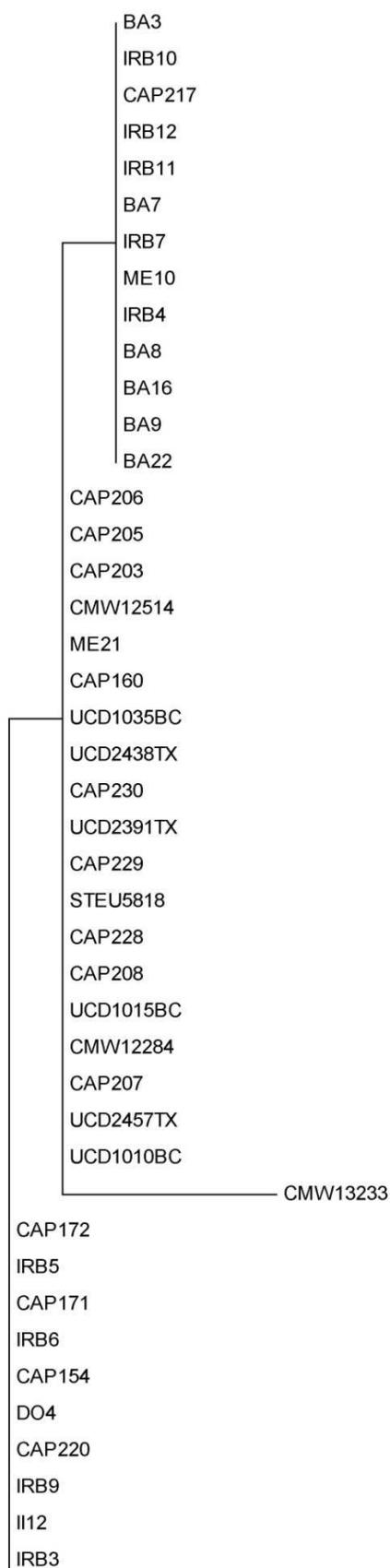


Fig 7 - P.1

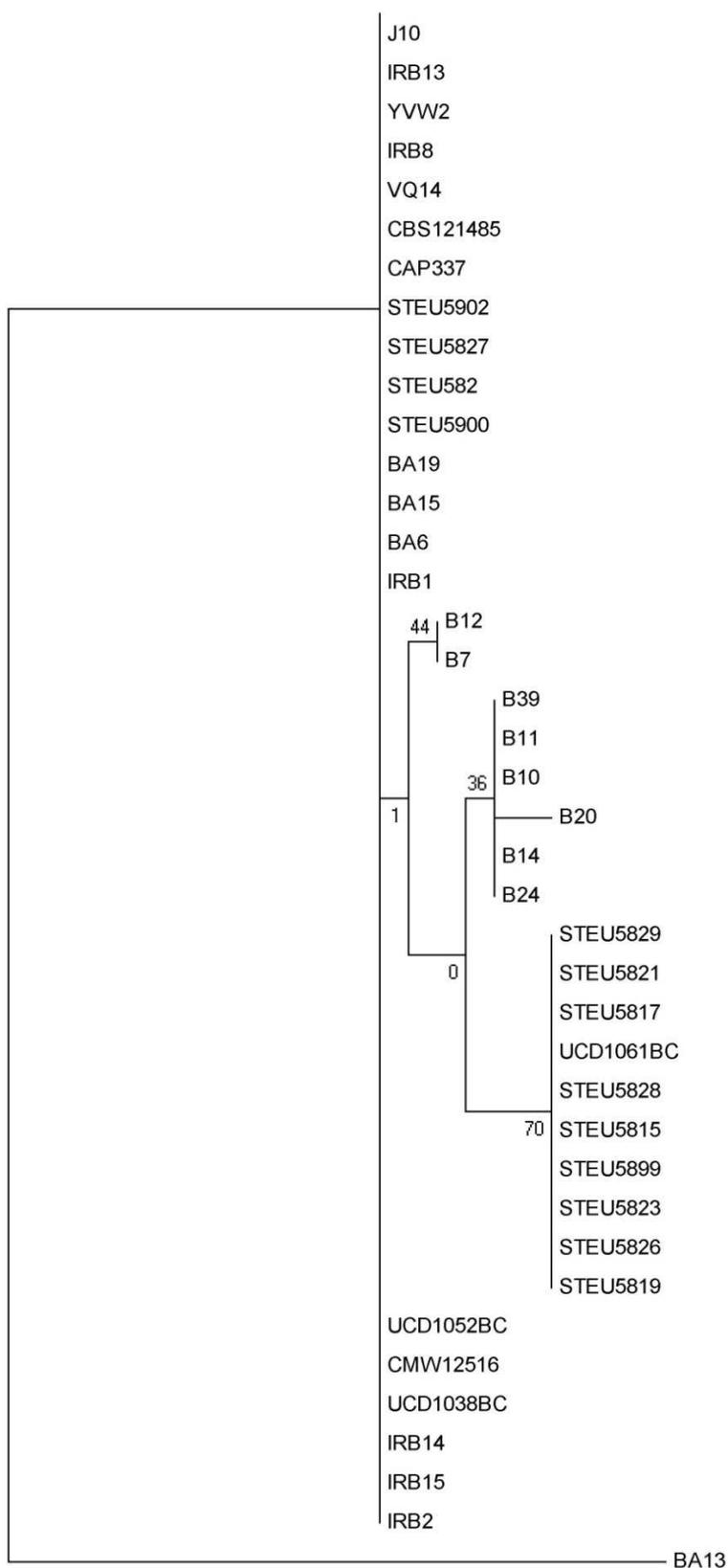


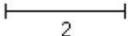
Fig 7 P.2 

Fig. 11 – *Diplodia seriata*: ITS dataset elaborato con il metodo Maximum Parsimony, il modello di sostituzione nucleica Jukes Cantor, validato con bootstrap con 1000 repliche.

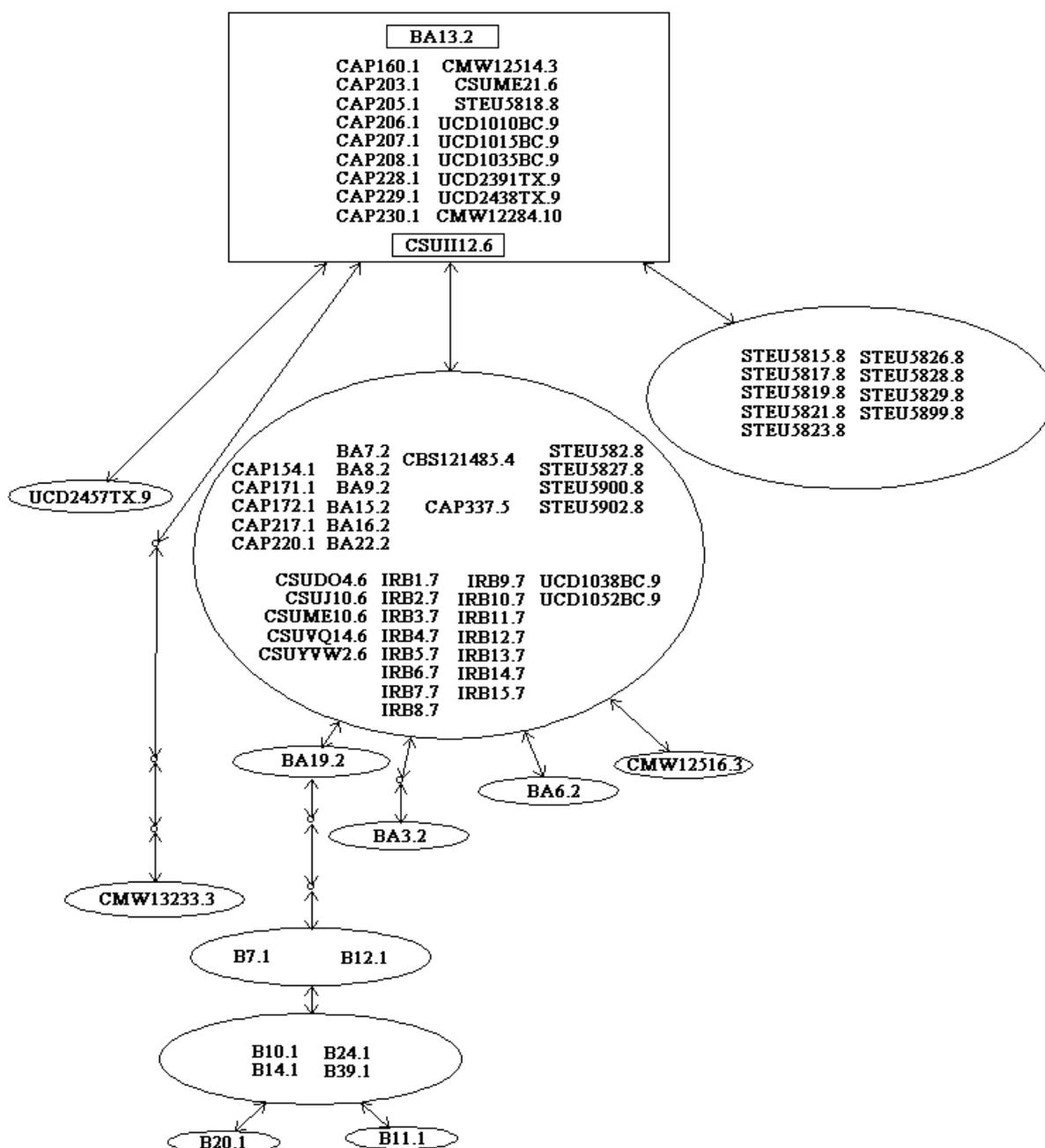


Fig. 12 – Network filogeografico della regione ITS degli isolati di *Diplodia seriata* riportati in Tab. 3. Le sigle alfanumeriche rappresentano il nome del ceppo, come riportato in Tab. 3, seguito da un punto ed un numero: detto numero si riferisce all'area geografica di provenienza del ceppo. Le aree geografiche, indicate dalla cifra successiva al punto, sono: 1: Sud Italia; 2: Milano (Nord Italia); 3: Francia; 4: Spagna; 5: Bulgaria; 6: Australia; 7: Iran; 8: Sud Africa; 9: America Centro-Settentrionale (Messico e Texas, USA); 10: Minnesota, USA.

Capitolo 5

Conclusioni

Le *Botryosphaeriaceae* sono organismi complessi e con un'elevata variabilità, sia a livello interspecifico che all'interno della stessa specie. Questa complessità ne rende difficile la caratterizzazione patogenetica perché numerosi sono i fattori coinvolti, fattori che vanno dal grado di suscettibilità dell'ospite alla potenziale virulenza del singolo ceppo, coinvolgendo i fattori ambientali, che si riflettono sulle condizioni vegetative delle piante infette, ma anche sull'attività del patogeno.

In un quadro così complesso e, ancora per molti versi poco conosciuto, sarebbe incauto maturare delle conclusioni di carattere assoluto perché ogni sistema ambiente-ospite-parassita presenta delle caratteristiche peculiari. Ciò non toglie che si possano riscontrare degli elementi comuni che possano rappresentare dei riferimenti sui quali costruire il prosieguo della ricerca.

Un elemento comune emerso nella presente ricerca connette la presenza delle *Botryosphaeriaceae* a stati di deficit idrico cui sono sottoposte le piante ospite. Nel Capitolo 2, infatti, l'isolato B7 di *Botryosphaeria dothidea* è sembrato influenzato dall'andamento delle precipitazioni, mostrandosi più virulento in fasi della stagione a carattere siccitoso, per poi essere ben contenuto dal sistema difensivo delle piante infettate in periodi immediatamente successivi a precipitazioni. In tale fase del lavoro, anche l'isolato BA8 di *Diplodia seriata* ha mostrato scarsa virulenza durante una stagione in cui è arrivato un costante apporto idrico al suolo dovuto a condizioni meteorologiche favorevoli alla vegetazione dei semenzali infetti.

Diverso è stato il comportamento dell'isolato BA20 di *Neofusicoccum parvum*, che nella stessa sperimentazione si è dimostrato virulento nonostante il costante approvvigionamento di acqua dovuto alle piogge; nell'evoluzione delle lesioni provocate, tale specie è apparsa più sensibile all'andamento stagionale della temperatura ed è emerso che il Frassino maggiore sia in grado di contenere l'infezione anche dell'isolato più virulento. Da tale tipo di prove emerge una possibile strategia per il contenimento della diffusione di questi ascomiceti, strategia che prevede l'individuazione di specie scarsamente suscettibili all'azione patogenetica delle *Botryosphaeriaceae*; questo tipo di strategia, comunque, non può basarsi su indicazioni universali sulle specie, ma può essere perseguita solo a

livello empirico, testando la virulenza degli individui presenti in un determinato ambiente su ospiti adattati a vivere in quelle condizioni.

Inoltre, la presenza di più *Botryosphaeriaceae* all'interno degli stessi tessuti non sembra aggravare lo stato di sofferenza delle piante, anzi sembra che fra le varie specie vi sia una sorta di antagonismo nella colonizzazione dell'ospite, dovuto alla sottrazione di risorse (nel nostro caso) da parte di ceppi meno virulenti nei confronti di *Neofusicoccum parvum*. Resta da chiarire, comunque, se vi possano essere dinamiche simili in contesti in cui le infezioni sono dovute a due o più ceppi altamente virulenti.

Le condizioni di stress idrico sono apparse connesse alla presenza delle *Botryosphaeriaceae* anche nella seconda fase del lavoro (Capitolo 3), fase nella quale le regioni di provenienza di tutti gli isolati testati sono state caratterizzate da fattori climatici, legati principalmente ad una diffusa diminuzione delle precipitazioni. In questa fase è emerso che anche la temperatura gioca un ruolo importante, sia nel determinare il fronte di avanzamento dell'areale di questi ascomiceti, sia nell'assortimento di ecotipi che è possibile all'interno di una regione: in ambienti caratterizzati da temperature medie tendenzialmente elevate si è riscontrata una maggiore variabilità di espressione fenotipica da parte degli isolati testati, mentre le regioni in cui si suppone una recente colonizzazione sono caratterizzate per lo più da ecotipi a rapido accrescimento e con optimum di crescita alle temperature in cui, nelle regioni di origine, si raggiunge il picco di calore estivo; questo fatto si può spiegare considerando che in regioni così a nord, come Milano e la Slovenia, durante gran parte dell'anno vigano condizioni termiche sfavorevoli allo sviluppo delle *Botryosphaeriaceae* e che quindi si affermino maggiormente ecotipi più celeri nella colonizzazione del substrato, colonizzazione che possono effettuare durante un arco ridotto della stagione vegetativa, situazione in cui isolati a più rapido accrescimento sono avvantaggiati.

La fase finale del lavoro ha confermato la complessità tassonomica delle *Botryosphaeriaceae*. In questa fase è stato possibile osservare come la regione ITS, pur fornendo delle utili indicazioni, risulta essere insufficiente per l'identificazione corretta di numerose specie e per un'accurata ricostruzione filogenetica, soprattutto a livello intraspecifico.

Nonostante ciò, l'ottimizzazione della tecnica di ITS-RFLP, che si riflette sulla scelta degli enzimi di restrizione, può offrire un valido strumento per l'identificazione veloce ed economica, per quanto meno sensibile ed accurata, delle *Botryosphaeriaceae*, proponendosi come un possibile metodo alternativo al sequenziamento di una o più regioni del DNA.

La regione ITS è stata utilizzata per individuare la diffusione mondiale di *Diplodia seriata* tramite un approccio filogeografico. Le sequenze di 81 isolati, di differente provenienza geografica, sono state elaborate con i classici metodi filogenetici e dai risultati si è visto come i dendrogrammi ottenuti offrirono dei raggruppamenti con un basso tasso di affidabilità (valori di bootstrap inferiori a 50), risultando così scarsamente credibili e poco informativi.

Le stesse sequenze, elaborate inserendo nel computo la variabile della provenienza geografica, ha permesso di meglio raggruppare gli isolati secondo la variabilità genetica all'interno della regione geografica di origine, permettendo di individuare dei percorsi di diffusione di tale specie in altre aree. Anche in questo caso, pur se le sequenze della regione ITS hanno offerto utili indicazioni, un approccio di natura multiloculare è auspicabile per ottenere risultati più precisi in quanto da tale tipo di approccio è possibile ricavare dei modelli di diffusione che, abbinati ad uno studio climatico ed ai modelli previsionali delle condizioni meteorologiche, possono offrire gli strumenti necessari per la costruzione di adeguati modelli epidemiologici, tarabili a livello di specie.

Per la comprensione della biologia delle *Botryosphaeriaceae*, data la loro complessità, rimane ancora molto lavoro da fare: accanto ad una più accurata caratterizzazione fenotipica, molecolare e climatica, è importante studiarne il processo infettivo in condizioni climatiche controllate; tale tipo di studio, attraverso la correlazione fra la dimensione delle lesioni sul fusto e il potenziale idrico delle foglie delle piante inoculate, può permettere di individuare per questi microrganismi la soglia di passaggio dalla fase endofitica a quella parassitaria.

Uno studio istologico delle sezioni di piante inoculate, prelevate in momenti diversi del processo infettivo, può aiutare a far luce sull'interazione ospite-parassita ed inquadrare meglio questi microrganismi nel loro *habitus* patogenetico. A questa fase deve essere accompagnato uno studio sul genoma, al

fine di individuare le regioni che si attivano nel passaggio dalla fase endofitica a quella patogenetica.

Riguardo ai possibili metodi di lotta, le piante forestali non si prestano a trattamenti con fitofarmaci per le difficoltà legate al lungo ciclo vitale e per i costi che questo tipo di lotta comporterebbe. Il metodo di lotta principale risiede sempre nelle scelte selvicolturali, che devono essere prese ponderando le condizioni climatiche e la micoflora presente nell'area; nell'impianto di un bosco occorre un tipo di lungimiranza che permetta di inserire, in un determinato contesto, essenze adattate a viverci in maniera ottimale. Nella scelta di queste, quindi, deve influire una profonda conoscenza dell'ambiente in cui dovranno vegetare, conoscenza che non può limitarsi soltanto alla parte climatica ma deve comprendere fattori come la fauna selvatica, l'impatto dell'uomo, la natura del suolo, la qualità ma anche la cenosi microbica potenzialmente pericolosa, fattore questo in genere non adeguatamente considerato.