



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Frutticoltura Mediterranea  
Dipartimento Scienze Agrarie e Forestali  
SSD AGR/12

## SPECIE BOTRYOSPHAERIACEAE E DIATRYPACEAE, AGENTI DI CANCRI DEI FRUTTIFERI

LA DOTTORESSA

**Selene Giambra**

IL COORDINATORE

**Prof. ssa Maria Antonietta Germanà**

IL TUTOR

**Prof. ssa Santella Burruano**



## INDICE

1 INTRODUZIONE.....	Pag.	1
<b>1.1 Botryosphaeriaceae.....</b>	“	1
<b>1.2 Diatrypaceae.....</b>	“	6
2 SCOPO DELLA RICERCA.....	“	10
3 MATERIALI E METODI.....	“	12
<b>3.1 <i>Vitis vinifera</i> .....</b>	“	12
3.1.1 Saggi di patogenicità <i>in planta</i> .....	“	12
3.1.2 Saggi di inoculazione in vigneto.....	“	13
<b>3.2 Saggi di attività biologica.....</b>	“	14
3.2.1 Preparazione dei filtrati colturali.....	“	14
3.2.2 Estrazione, isolamento e caratterizzazione dei metaboliti prodotti in coltura liquida.....	“	14
3.2.3 Saggi di fitotossicità.....	“	15
3.2.4 Saggi di antibiosi .....	“	16
<b>3.3 <i>Eriobotrya japonica</i>.....</b>	“	17
3.3.1 Rilievi epidemiologici e saggi di isolamento .....	“	17
3.3.2 Identificazione morfologica .....	“	18
3.3.3 Identificazione molecolare.....	“	19
3.3.4 Saggi di patogenicità.....	“	21
<b>3.4 Specie Diatrypaceae in <i>Vitis vinifera</i> .....</b>	“	21
3.4.1 Identificazione molecolare.....	“	22
3.4.2 Identificazione morfologica.....	“	23

4 RISULTATI.....	Pag.	24
<b>4.1 <i>Vitis vinifera</i></b> .....	“	24
4.1.1 Saggi di patogenicità <i>in planta</i> .....	“	24
4.1.2 Saggi di inoculazione in vigneto.....	“	24
<b>4.2 Saggi di attività biologica</b> .....	“	25
4.2.1 Identificazione chimica dei metaboliti.....	“	25
4.2.2 Saggi di fitotossicità e di antibiosi.....	“	25
<b>4.3 <i>Eriobotrya japonica</i></b> .....	“	27
4.3.1 Rilievi epidemiologici ed identificazione morfologica.....	“	27
4.3.2 Identificazione molecolare.....	“	28
4.3.3 Saggi di patogenicità.....	“	28
<b>4.4 Specie Diatrypaceae in <i>Vitis vinifera</i></b> .....	“	29
4.4.1 Identificazione molecolare.....	“	29
4.4.2 Identificazione morfologica.....	“	30
4.4.3 Distribuzione delle Diatrypaceae spp.....	“	31
5 CONCLUSIONI.....	“	32
TABELLE.....	“	36
FIGURE.....	“	46
BIBLIOGRAFIA.....	“	60

## 1 INTRODUZIONE

### 1.1 Botryosphaeriaceae

La famiglia Botryosphaeriaceae, ordine Botryosphaeriales, include 26 generi e oltre 1500 specie (Kirk *et al.*, 2008) in gran parte cosmopolite e polifaghe. Occupano infatti diverse nicchie ecologiche in regioni temperate, tropicali e subtropicali e colonizzano piante monocotiledoni, dicotiledoni, angiosperme e gimnosperme (Barr, 1987; Denman *et al.*, 2000; Slippers e Wingfield, 2007). Alcune specie sono endofite in piante asintomatiche, diverse saprofiti, altre fitopatogene (von Arx, 1987). Le specie dannose, agenti di deperimento dell'ospite al verificarsi di molteplici stress, sono ritenute patogeni deboli o funghi opportunisti (Schoeneweiss, 1981; Swart e Wingfield, 1991; Blodgett e Stanosz, 1995; Slippers e Wingfield, 2007). Dati sperimentali più recenti dimostrano, invece, il comportamento di patogeni primari dei funghi causa di malattie del tronco di vite (Úrbez-Torres, 2011). L'elevato e sempre crescente numero di piante ospiti in un dato ecosistema (*Malus domestica* Borkh., *Prunus persica* L. Batsch., *Pistacia vera* L., *Olea europea* L., *Mangifera indica* L. e *Vitis vinifera* L.) incrementa la fonte d'inoculo delle varie specie, fungine così come le diverse esigenze climatiche per la formazione delle strutture riproduttive è indice dell'ampia gamma di fattori che influenzano l'instaurarsi dell'infezione e la relativa dinamica di diffusione (Holmes e Rich 1970; Sutton, 1981; Brown e Britton, 1986; Arauz e Sutton, 1989; Pusey, 1989a; Pusey, 1989b; Michailides, 1991; Sutton e Arauz, 1991; Pusey e Bertrand, 1993; Jacobs, 2002; Ahimera *et al.*, 2004; Copes e Hendrix, 2004; Lazzizzera *et al.*, 2008). Per quanto concerne il livello di specializzazione parassitaria, nuove indagini accertano la polifagia di *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips e *Diplodia seriata* De Not. che, per l'elevata distribuzione geografica ed adattabilità ecologica, determinano rilevanti danni economici (Slippers *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2007; Slippers e Wingfield, 2007; de Wet *et al.*, 2008). Altrimenti, *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx fil. e *Diplodia cupressi* A.J.L. Phillips & Crous 2006 sono circoscritte a specie dei generi *Pinus* e *Cupressus*, rispettivamente (Alves

*et al.*, 2006; de Wet *et al.*, 2008). A tal proposito, dall'ultimo trentennio del secolo scorso ad oggi, diversi *taxa* fungini risultano responsabili, singolarmente o in associazione, di un deperimento di *V. vinifera*, recentemente denominato Botryosphaeria dieback (Úrbez-Torres, 2011). I funghi ricorrentemente coinvolti nella sindrome (*B. dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. & De Not., *Diplodia mutila* (Fr.: Fr.) Mont., *D. seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., *Neofusicoccum australe* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips e *N. parvum*) sono presenti in Australia (Taylor *et al.*, 2005; Savocchia *et al.*, 2007; Pitt *et al.*, 2010a), Bolivia (Kaiser *et al.*, 2009), Brasile (Úrbez-Torres *et al.*, 2006b), Canada (Shoemaker, 1964; Úrbez-Torres *et al.*, 2008; O'Garman *et al.*, 2010), Cile (Latorre *et al.*, 1986; Auger *et al.*, 2004), Cina (Li *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2011), Egitto (El-Goorani e El Meleigi, 1972), Francia (Larignon *et al.*, 2001), Messico (Chamberlain *et al.*, 1964; Candolfi-Arbello *et al.*, 2010), Portogallo (Phillips, 1998; 2002), Spagna (Armengol *et al.*, 2001; Luque *et al.*, 2005; Aroca *et al.*, 2006; Úrbez-Torres *et al.*, 2006b; 2009), Stati Uniti d'America (Milholland, 1991; Úrbez-Torres *et al.*, 2006a; 2006b; 2007; 2009; 2010a; 2010b; 2012), Sudafrica (van Niekerk *et al.*, 2004; Halleen *et al.*, 2005; van Niekerk *et al.*, 2010b) e Ungheria (Lehoczky, 1974). In Italia, la loro presenza è stata segnalata per la prima volta nel Molise (Cristinzio *et al.* 1978), successivamente in Emilia-Romagna (Rovesti e Montermini, 1987), nelle Marche (Romanazzi *et al.*, 2009), in Puglia (Pollastro *et al.*, 2000; Carlucci *et al.*, 2009; Carlucci *et al.*, 2015), in Sardegna (Linaldeddu *et al.*, 2010; Linaldeddu *et al.*, 2015), in Sicilia (Burruano *et al.*, 2008; Mondello *et al.*, 2013) e in Toscana (Spagnolo *et al.*, 2011).

Il riconoscimento degli agenti eziologici della sindrome è stato a lungo oggetto di discussione poichè i teleomorfi delle diverse specie, a differenza degli anamorfi, sono occasionali e poco discernibili (van Niekerk *et al.*, 2006). Il relativo inquadramento tassonomico basato, soprattutto, sui caratteri dello stadio anamorfo (Denmam *et al.*, 2000) in presenza di specie criptiche,

morfologicamente affini, non consente di valutare la reale diversità, limitando l'identificazione a livello di genere (Taylor *et al.*, 2000; Slippers e Wingfield, 2007). Negli ultimi anni, tuttavia, i progressi raggiunti nel campo della biologia molecolare hanno permesso di progredire in merito alla caratterizzazione molecolare delle Botryosphaeriaceae. L'analisi parziale delle sequenze delle regioni spaziatriche trascritte interne (ITS) dell'rDNA e del gene del fattore di allungamento EF1- $\alpha$  costituiscono, ad oggi, lo strumento informativo più valido (Phillips *et al.*, 2005; Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008; 2013).

Relativamente al quadro sintomatologico, le viti affette da Botryosphaeria dieback mostrano: crescita stentata, ritardo o arresto della ripresa vegetativa, necrosi di gemme e germogli, cancri perenni su speroni, cordoni, tralci e a volte marciume del grappolo (Úrbez-Torres, 2011). Nei tessuti sottocorticali compaiono striature brune che, in sezione trasversale, assumono l'aspetto di settori cuneiformi. Sporadicamente sulle foglie si osservano arrossamenti o clorosi, in cultivar a bacca rossa e bianca rispettivamente, che si originano al margine per poi stendersi agli spazi internervali. Poiché le diverse specie fungine associate al deperimento sono state isolate sempre ed esclusivamente dagli imbrunimenti dello xilema, si ipotizza che la rara comparsa dei sintomi fogliari dipenda dall'attività fitotossica di metaboliti secondari, prodotti nel tessuto vascolare e traslocati alla chioma (Martos *et al.*, 2008; Djoukeng *et al.*, 2009; Evidente *et al.*, 2010, Andolfi *et al.*, 2012; Abou-Mansour *et al.*, 2015). In particolare, il frazionamento biologico guidato del filtrato colturale di *D. seriata* ha permesso di isolare quattro melleine tutte fitotossiche (Djoukeng *et al.*, 2009). *B. dothidea*, *D. seriata*, *Dothiorella viticola* A.J.L. Phillips & J. Luque, *N. luteum* e *N. parvum* producono esopolisaccaridi tossici (Martos *et al.*, 2008), inoltre, l'ultima specie ha fornito anche quattro metaboliti lipofili tra i quali il più attivo è risultato l'isosclerone (Evidente *et al.*, 2010). Abou-Mansour *et al.* (2015), analizzando gli estratti grezzi dei filtrati colturali di 13 isolati di *N. parvum* provenienti da varie cultivar di vite d'età compresa fra 2 e 25 anni,

hanno caratterizzato 13 metaboliti fitotossici, appartenenti a quattro famiglie chimiche, tutti attribuiti all'isolato fungino dalla crescita più rapida. Inoltre, due delle fitotossine identificate sono state isolate direttamente dai tessuti xilematici. Uno studio recente segnala *L. mediterranea* Linaldeddu, Deidda & Berraf-Tebbal, una specie criptica isolata da viti deperienti in Sardegna, produttrice di dieci metaboliti secondari, tre dei quali nuovi e denominati lasiojasmonati A-C, ma solo il principale (acido jasmonico) fitotossico (Andolfi *et al.*, 2014).

Per quanto concerne l'epidemiologia delle Botryosphaeriaceae, ancora poco conosciuta e tuttora oggetto di studio, le principali fonti di inoculo in vigneto sono i picnidi che si sviluppano sul legno di viti infette o tralci di potatura, ma anche su altre specie vegetali definite "piante serbatoio". L'inoculo fungino aereo, costituito dai picnoconidi è diffuso in vigneto soprattutto da eventi piovosi o irrigazioni sovrachioma (Úrbez-Torres *et al.*, 2010a; van Niekerk *et al.*, 2010a) e ferite fresche di potatura sembrano essere la principale via di penetrazione nell'ospite, sebbene non ancora accertata (von Arx e Müller, 1954; Smith *et al.*, 1994). Saggi d'inoculazione artificiale hanno evidenziato un incremento della suscettibilità delle ferite subito dopo il taglio ed un decremento all'aumentare dell'intervallo di tempo fra potatura e inoculazione (Úrbez-Torres e Gubler, 2011). Le piante madri infette o le tecniche di propagazione in vivaio possono ritenersi altre modalità di diffusione dei funghi (Halleen *et al.*, 2003; Giménez-Jaime *et al.*, 2006; Gramaje e Armengol, 2011). Inoltre una virulenza variabile sia a livello interspecifico che intraspecifico caratterizza diverse specie Botryosphaeriaceae. Tale diversità potrebbe imputarsi al tipo di inoculo utilizzato, alla cultivar ed all'età dell'ospite, alla durata del periodo di incubazione, al clima, ma anche soltanto al microclima degli spazi adibiti alle prove (van Niekerk *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Laveau *et al.*, 2009; Rego *et al.*, 2009; Úrbez-Torres e Gubler, 2009). A tal riguardo Úrbez-Torres (2011) propone una classificazione delle specie Botryosphaeriaceae in funzione della virulenza su *V. vinifera*, di seguito riportata: altamente virulente (*Lasiodiplodia*



spp. e *Neofusicoccum* spp.), moderatamente virulente (*Botryosphaeria dothidea* e *Diplodia* spp.) e leggermente virulente (*Dothiorella* spp.)

Il controllo delle sindromi di deperimento causate da Botryosphaeriaceae risulta ad oggi di difficile realizzazione, in particolar modo da quando l'arsenito di sodio, unico prodotto in grado di limitarne lo sviluppo, è stato bandito dal commercio per l'attività cancerogena nei confronti dell'uomo e tossica per l'ambiente. In conseguenza di ciò, un ampio range di strategie di difesa (chimica, biologica, agronomica e igienico-sanitarie) sono state saggiate con esito poco risolutivo; l'impiego di una singola misura è generalmente inefficiente per ridurre l'incidenza della malattia, piuttosto è necessaria la combinazione di due o più misure compatibili. I metodi chimici consistono, essenzialmente, nella protezione delle ferite di potatura mediante fungicidi che mirano ad ostacolare o contenere l'infezione. Alcuni principi attivi (tubeconazolo, flusilazolo, benomyl e procloraz), impiegati singolarmente o miscelati in substrato colturale universale, hanno ridotto la germinabilità dei conidi e lo sviluppo del micelio di *D. seriata*, *L. theobromae*, *N. australe*, e *N. parvum*, *in vitro* e in serra (Bester *et al.*, 2007). In un vigneto californiano, inoltre, diversi principi attivi (tiofanato di metile, acido borico, piraclostrobina e una miscela di ciproconazolo e iodocarb) sono risultati efficaci nei confronti delle specie fungine *B. dothidea*, *D. seriata*, *D. viticola* e *L. theobromae* (Rolshausen *et al.*, 2010). In Nuova Zelanda soltanto cinque dei sedici principi attivi saggiati (carbendazim, procimidone, iprodione, mancozeb e flusilazolo) hanno mostrato attività inibente nei riguardi della capacità germinativa conidica e dello sviluppo miceliare di *N. australe*, *N. luteum* e *D. mutila* (Amponsah *et al.*, 2012); il flusilazolo è risultato anche il più efficace in vigneto su piante di 12 anni cv. Chardonnay, inoculate artificialmente con *N. luteum*. Negli ultimi anni particolare attenzione è stata rivolta al controllo biologico con formulati a base di *Trichoderma harzianum*, in grado di colonizzare asintomaticamente cordoni e fusti di *V. vinifera* (John *et al.*, 2001; Hunt, 2004; Pitt *et al.*, 2010a). Gli approcci di controllo con il suddetto antagonista sono ottimizzate

dall'impiego in associazione ad altre misure di difesa (prodotti chimici, altri microrganismi antagonisti di patogeni, misure agronomiche, etc.). Altri agenti biologici, (*Bacillus subtilis*, *Fusarium lateritium*, *Erwinia herbicola*, *Cladosporium herbarum*, *Aureobasidium pullulans* e *Rhodotorula rubra*) e molecole naturali (chitosano e cisteina), possono essere impiegati sia singolarmente che in combinazione con altri microrganismi o miscele di fungicidi. In mancanza di un controllo chimico preventivo o terapeutico efficace, le misure igienico-sanitarie o di risanamento rimangono quelle effettuate nella gran parte delle aree viticole. La sanità del materiale d'impianto e la disinfezione del materiale di propagazione in vivaio, con mezzi fisici e chimici, concorrono all'ottenimento di piante con requisiti sanitari tali da poter essere commercializzate. A tal proposito, l'immersione in acqua calda, 54°C per 5 minuti e 50°C per 30 minuti, è considerato il mezzo fisico più adeguato per il controllo dei patogeni esterni e interni all'ospite (Gramaje e Armengol, 2011).

## 1.2 Diatrypaceae

La famiglia Diatrypaceae, ordine Xylariales, include 13 generi, fra i quali i più ricorrenti sono: *Cryptosphaeria* Ces. & De Not., *Cryptovalsa* (Ces. & De Not.), *Diatrype* Fr., *Diatrypella* (Ces. & De Not.) De Not., *Eutypa* Tul. & C. Tul., ed *Eutypella* (Nitschke) Sacc. (Kirk *et al.*, 2008). Alla famiglia sono ascritte oltre 200 specie cosmopolite, molte sono saprofiti, altre patogene e polifaghe. *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. (syn: *E. armeniaca* Hansf. & Carter), la specie dannosa più nota e diffusa, è capace di infettare numerose piante coltivate (*Prunus armeniaca* L., *Prunus dulcis* Mill., *Prunus avium* L., *O. europea*, *P. persica*, *Juglans regia* L.) e soprattutto *V. vinifera* (Carter, 1957; Moller e Kasimatis, 1978; Glawe e Rogers, 1982; Carter *et al.*, 1983). Il fungo causa la sindrome Eutypa dieback, una delle più nocive fra le malattie del legno di *V. vinifera*, che può portare a morte la pianta nel giro di pochi anni provocando ingenti perdite economiche (Sosnowski *et al.*, 2013; Paolinelli-Alfonso *et al.*, 2015). Altre specie Diatrypaceae sono frequentemente associate

a viti deperienti, in particolare: *Anthostoma decipiens* (DC.) Nitschke, *Cryptosphaeria pullmanensis* Glawe, *Cryptovalsa ampelina* (Nitschke) Fuckel, *C. rabenhortsii* (Nitschke) Sacc., *Diatrype oregonensis* (Wehm.) Rappaz, *D. stigma* (Hoffm. : Fr.) Fr., *D. whitmanensis* J.D. Rogers & Glawe, *Diatrypella vulgaris* Trouillas, W. M. Pitt & Gubler, *D. verrucaeformis* (Ehrh.) Nitschke, *Eutypa leptoplaca* (Mont.) Rappaz, *Eutypella citricola* Speg., *E. leprosa* (Pers. ex Fr.) Berl., *E. microtheca* Trouillas, W.M. Pitt & Gubler, *E. scoparia* (Schwein. : Fr.) Ellis & Everh. e *E. vitis* (Schwein. : Fr.) Ellis & Everh. (Luque *et al.*, 2012; Rolshausen *et al.*, 2014). A conferma della loro ampia distribuzione geografica, un'indagine epidemiologica riporta la presenza del deperimento in quattro continenti: Africa, America, Australia ed Europa (Travadon *et al.*, 2012). Per quanto concerne quest'ultimo, quadri sintomatici riconducibili ad *Eutypa dieback* sono stati segnalati per la prima volta nella regione Estremadura (Spagna meridionale) (Arias e Moral, 1981) e nel decennio successivo nella regione La Rioja (Spagna settentrionale) (Mateo, 1995). Un recente studio epidemiologico ha verificato la presenza di *E. lata* in altre regioni spagnole (Armengol *et al.*, 2001; Úrbez-Torres e Peláez, 2001; Péros e Berger, 2003; Santiago *et al.*, 2005; Martín e Cobos, 2007; Luque *et al.*, 2009; Muruamendiaraz *et al.*, 2009; Luque *et al.*, 2012; 2014), sebbene il teleomorfo sia stato rinvenuto soltanto nelle prime due aree, rispettivamente Estremadura (Arias-Giralda, 1998) e Rioja Alavesa (Spagna settentrionale) (Muruamendiaraz *et al.*, 2009). *C. ampelina* è risultata associata a piante deperienti in aree viticole della Catalogna (Spagna nordorientale) (Luque *et al.*, 2006; 2012; 2014) e Castilla y León (Spagna centrale) (Martín *et al.*, 2009). Un'indagine sulla distribuzione attuale delle specie Diatrypaceae in Spagna segnala la presenza di *A. decipiens*, *C. ampelina*, *E. lata*, *E. citricola*, *E. microtheca* e di quattro isolati appartenenti al genere *Eutypa* (Luque *et al.* (2012).

Al momento la tassonomia delle Diatrypaceae, proposta da Rappaz (1987), è basata, principalmente, sulle peculiarità dello stadio teleomorfo e risulta obsoleta. I parametri considerati sono la morfologia dello stroma, dei

periteci in esso immersi e degli aschi allungati con otto o più ascospore con forma allantoide. Queste caratteristiche macro e microscopiche spesso indistinguibili non consentono un'esatta identificazione. Pertanto, al fine di superare queste difficoltà, Acero *et al.* (2004) hanno proposto un primo approccio di classificazione filogenetica basata solo sulle sequenze ITS dell'rDNA, che Trouillas *et al.* (2010a, 2011), hanno integrato successivamente con le sequenze parziali del gene  $\beta$ -tubulina. Nonostante ciò, differenti *taxa* dei generi *Diatrype* sp., *Diatrypella* sp., *Eutypa* sp. e *Eutypella* sp. non sono stati ancora caratterizzati (Rolshausen *et al.*, 2006; Úrbez-Torres *et al.*, 2009; Pitt *et al.*, 2010b; Trouillas *et al.*, 2010a; Trouillas *et al.*, 2011; Luque *et al.*, 2012; Úrbez-Torres *et al.*, 2012; Rolshausen *et al.*, 2014).

La manifestazione sintomatica di Eutypa dieback comprende germogli stentati, internodi raccorciati, crescita affastellata ed irregolare. Clorosi fogliari appaiono soprattutto nel periodo primaverile, conseguenti al danneggiamento di cloroplasti e tilacoidi associati anche a microfillia; le foglie mostrano la lamina deformata, margini frastagliati, necrosi marginali ed internervali (Moller *et al.*, 1974). I tessuti vascolari del tronco, colonizzati dal fungo, tendono a necrotizzare. Infine, anche il quadro ormonale della pianta risulta alterato, in quanto il processo infettivo provoca un aumento dell'acido abscissico che, modificando gli scambi gassosi con l'esterno, porta alla disidratazione dell'intero apparato fogliare (Koussa *et al.*, 2002). La maggior parte dei fiori a seguito dell'infezione dissecca, gli acini piccoli e radi, hanno una maturazione disomogenea all'interno dello stesso grappolo (Pitt *et al.*, 2013b).

Il fungo produce periteci, immersi negli organi legnosi infetti, sia in piante in piedi che nei residui colturali di diverse specie vegetali, oltre *V. vinifera*, costituendo ulteriori fonti di inoculo. Le ascospore raggiunta la maturazione vengono rilasciate durante tutto l'inverno e disseminate dalla pioggia (Moller *et al.*, 1965); nel dettaglio, la liberazione delle spore avviene 2-3 ore dopo l'avvio dell'evento piovoso e prosegue fino alle 24 ore successive alla fine dello stesso (Pearson, 1980). Attraverso ferite di potatura, il patogeno

penetra e si diffonde nell'ospite, completata la colonizzazione, compaiono i sintomi quando le viti raggiungono 8-10 anni.

La patogenicità di *E. lata* è stata dimostrata da saggi di inoculazione artificiale su piante di vite e successiva produzione di alcuni dei tipici sintomi (crescita stentata dei germogli, microfillia, clorosi e cancri; Moller *et al.*, 1978; Travadon *et al.*, 2013; Rolshausen *et al.*, 2014). Pitt e collaboratori (Pitt *et al.* 2013b) hanno confermato la patogenicità di *C. ampelina*, *C. rabenhortsii*, *D. vulgaris*, *E. leptoplaca*, *E. citricola*, *E. microtheca* e *E. vitis*, agenti di lesioni necrotiche su barbatelle cv. Cabernet Sauvignon. Ulteriori indagini, a tal riguardo, potrebbero contribuire ad ampliare il range di funghi delle specie Diatrypaceae dannose per la vite. E' stata accertata, inoltre, che *E. lata* produce metaboliti secondari fitotossici (eutipinolo, acido eutipinico, un composto polipeptidico ed eutipina) in grado di diffondersi all'interno della pianta e svolgere un ruolo patogenetico (Renaud *et al.*, 1989). L'eutipina, il più tossico dei metaboliti, è sintetizzata nel tronco della vite e con molta probabilità tramite l'ascesa della linfa grezza raggiunge foglie e infiorescenze, determinando l'espressione sintomatica (Tey-Rulh *et al.*, 1991). Il composto penetra nelle cellule vegetali con un meccanismo di diffusione passiva ed altera la fosforilazione ossidativa della respirazione riducendo la produzione di ATP (Deswarte *et al.*, 1996). Il composto polipeptidico, invece, danneggia sia l'attività respiratoria che quella fotosintetica, essenziali entrambi per la vita e lo sviluppo della pianta (Octave *et al.*, 2006).

La lotta contro il deperimento di *V. vinifera* causato da questi funghi è ad oggi estremamente difficile poiché le conoscenze riguardanti il processo infettivo e relative misure di controllo della sindrome sono ancora incomplete. Considerando la ferita di potatura quale via preferenziale di penetrazione nell'ospite, strategie difensive riguardano la protezione dei tagli con prodotti fungicidi, l'asportazione dei tralci infetti e/o l'estirpazione dell'intera pianta colpita con conseguente bruciatura dei residui vegetali. Nell'ambito della difesa chimica, indagini effettuate *in vitro* hanno evidenziato l'efficacia di alcuni principi attivi, in parte analoghi a quelli impiegati contro le

Botryosphaeriaceae (carbendazim, tubeconazolo, e quest'ultimo in miscela con protioconazolo e fluazinam), sull'inibizione della crescita miceliare di *E. lata* e di altre Diatrypaceae (Gramaje e Armengol, 2011). Per quanto riguarda, le strategie difensive biologiche, l'impiego di *T. harzianum* (AG1) per la protezione di ferite di potatura consente una riduzione della colonizzazione di *E. lata* (John *et al.*, 2001). Strategie d'intervento sanitario in vivaio consistono, soprattutto, nella verifica della sanità delle piante madri al momento dell'innesto, nel trattamento del materiale con acqua calda da eseguire con tempi e gradi analoghi a quelli riportati per le Botryosphaeriaceae, così come somministrazione di acqua di idratazione con prodotti fungicidi.

## **2 SCOPO DELLA RICERCA**

Molteplici indagini, avviate nell'ultimo decennio in vari continenti, evidenziano il ruolo preminente di specie Botryosphaeriaceae e Diatrypaceae nel deperimento di specie vegetali diverse ed in numero crescente. L'elevata ricorrenza di questi funghi è proporzionale ad un incremento della gravità dei danni causati (Lazzizzera *et al.*, 2008; Úrbez-Torres, 2011; Linaldeddu *et al.*, 2015). Per quanto concerne la sindrome Botryosphaeria dieback (Úrbez-Torres, 2011), dai tessuti sottocorticali di piante deperienti provenienti da vigneti siciliani, siti in diverse provincie della Sicilia centro-occidentale, dal 2007 al 2011 sono state isolate quattro specie Botryosphaeriaceae (*D. seriata*, *L. mediterranea*, *N. parvum* e *Neofusicoccum vitifusiforme* (Van Niekerk & Crous) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips), presenti singolarmente e in varia combinazione. Preliminari saggi *in vitro* ne hanno anche dimostrato la patogenicità (Burruano *et al.*, 2008; Mondello *et al.*, 2013). Di recente, inoltre, in un nespoletto sito in agro di Palermo, comprendente varietà autoctone ed alloctone, sono state osservate lesioni cancerose riconducibili al tipico sintomo corticale delle malattie del tronco di vite. Un analogo incremento della sindrome Eutypa dieback, segnalata per la prima volta in Estremadura (Arias e Moral, 1981), è stato osservato in tre provincie spagnole (Albacete, Cádiz e Valencia). Indagini epidemiologiche, hanno consentito di collezionare presso

l'Instituto Agroforestal Mediterráneo dell'Universidad Politécnica de Valencia, numerose specie fungine delle Diatrypaceae.

In considerazione della rapida diffusione delle nuove emergenze fungine insieme alla comparsa di cancri anche su un nuovo ospite, sia in Sicilia che in Spagna, assemblabile al ricorrente fenomeno “host jumps” (Slippers *et al.*, 2005), il presente lavoro di tesi è stato mirato allo studio di alcuni aspetti del processo infettivo di *Botryosphaeria dieback* ed *Eutypa dieback* accertando, nel contempo, l'eziologia del nuovo deperimento del nespolo (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl). Pertanto, il primo obiettivo ha riguardato il profilo patogenetico delle specie Botryosphaeriaceae, isolate in vigneti siciliani, verificandone la dannosità e la diversità d'aggressione nei confronti dell'ospite direttamente *in planta*. Allo scopo di esaminare la progressione fungina nei tessuti sottocorticali dei tralci, un isolato della specie più ricorrente (*D. seriata*) è stato inoculato anche su piante asintomatiche, in un vigneto di Chardonnay. L'attività fitotossica e antibiotica dei metaboliti secondari prodotti da *L. mediterranea*, *N. parvum* e *N. vitifusiforme* (un isolato per ciascuna specie) è stata testata mediante indagini metabolomiche, per accertarne il ruolo nell'espressione sintomatica della sindrome. La diversità genetica delle specie Diatrypaceae, provenienti da tre aree viticole spagnole, è stata studiata tramite identificazione morfologica e filogenetica.

### 3 MATERIALI E METODI

#### 3.1 *Vitis vinifera*

##### 3.1.1 Saggi di patogenicità *in planta*

Gli isolati ascritti alle specie Botryosphaeriaceae, in collezione presso il laboratorio di Patologia vegetale del Dipartimento SAF e riportati in Tabella 1, sono stati inoculati singolarmente in piante di *V. vinifera* cv. Inzolia, di 2 anni di età. Le viti provenivano da talee di un anno con 6-7 gemme dormienti, prelevate nel settembre 2011 da piante madri di un vigneto produttivo, in località Scirocco (Alcamo; TP). Accertata la sanità delle talee mediante saggi di isolamento, le stesse sono state avvolte in teli di plastica contenenti torba e conservate in celle frigorifere (4°C), per 3 mesi. Successivamente, il materiale vegetale messo a dimora in fitocelle con terriccio e vermiculite (3:1) è stato mantenuto in serra per 18 mesi. Nel luglio 2013, il fusto di ciascuna pianta, previa sterilizzazione superficiale con etanolo al 70%, è stato lesionato nella porzione basale con l'ausilio di una lama sterile. Frammenti di colonie monosporiche (diametro di 5 mm) allevate per 7 gg su Patata Destrosio Agar (PDA; Oxoid, Milano, Italia), e frammenti di PDA sterile, ottenuti con un foratappi, sono stati posti sulle ferite, di piante test e di controllo, rispettivamente. Per mantenere le condizioni di umidità ottimali per l'infezione, ogni sito di inoculazione è stato ricoperto dal lembo di corteccia, avvolto con cotone idrofilo imbibito di acqua distillata sterile e sigillato con parafilm (Parafilm<sup>®</sup>M). Per ciascun isolato e per il controllo sono state utilizzate 6 piante, ripetendo l'esperimento 2 volte. Le viti inoculate, esposte alle condizioni climatiche ambientali, sono state distribuite a random e monitorate settimanalmente per rilevare l'eventuale comparsa di sintomi. Trascorsi 6 mesi, le piante sono state sezionate longitudinalmente in corrispondenza del sito di inoculazione per misurare, al disopra e al disotto dello stesso, l'imbrunimento vascolare. Per il soddisfacimento del 4° postulato di Koch, porzioni di tessuto xilematico sintomatico sono state prelevate, sterilizzate con etanolo al 70% per 3 minuti, frammentate e poste ad incubare a



25±1°C in capsule Petri contenenti PDA. Le piastre così allestite sono state controllate, giornalmente, per verificare l'evasione delle colonie e confrontarne la morfologia con quelle degli isolati saggiati. Le misure degli imbrunimenti xilematici rilevate per ciascun isolato, compreso il controllo, sono state sottoposte all'analisi della varianza (ANOVA) e al test di confronto multiplo LSD (Least Significant Difference) di Fischer per  $P \leq 0.05$ , utilizzando il programma SAS version 9.0 (SAS Institute, Cary, NC).

### 3.1.2 Saggi di inoculazione in vigneto

Le infezioni artificiali sono state eseguite in un vigneto Chardonnay di 12 anni d'età, esteso 2 ha e sito in contrada Feotto, località San Giuseppe Jato (PA). Due parcelle di 500 m<sup>2</sup> distanti circa 120 metri, l'una dall'altra, sono state delimitate ed in ognuna sono stati selezionati a random 60 tralci sui quali è stato effettuato un taglio trasversale a 2.5 cm circa al di sopra di una gemma. Il giorno successivo, 50 µl di una sospensione di conidi dell'isolato B24 ( $2 \times 10^4$  conidi mL<sup>-1</sup>) è stata distribuita sui tralci lesionati presenti in una parcella, mentre nell'altra sulle superfici di taglio è stata ripartita una quantità analoga di acqua distillata sterile. Trascorsi sei mesi dall'inoculazione i tralci prelevati e trasportati in laboratorio sono stati sottoposti a saggi d'isolamento. In particolare, previa sterilizzazione superficiale mediante rapidi e ripetuti passaggi alla fiamma di un becco Bunsen, ciascun tralcio è stato sezionato trasversalmente a 0.5, 2 e 5 cm dal sito di inoculazione, ottenendo così tre rondelle di 1-2 mm. Ognuna di queste, suddivisa in 5 frammenti è stata inoculata in capsule Petri contenenti PDA con aggiunta di streptomicina, posta ad incubare a 25± 1°C e in assenza di luce per 4 giorni. Sono state conteggiate, quindi, le colonie fungine evase a diversa distanza dal sito di inoculazione, applicando la seguente formula (Ragazzi *et al.*, 2002):

$$FI = \frac{\text{Numero di frammenti colonizzati}}{\text{Numero totale di frammenti esaminati}} \times 100$$

I dati relativi alle frequenze di isolamento sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) e il test HSD (Honest Significant Difference) di Tukey a  $P < 0.05$  è stato usato per separare le medie, utilizzando il programma SAS version 9.0 (SAS Institute, Cary, NC).

### **3.2 Saggi di attività biologica**

#### 3.2.1 Preparazione dei filtrati colturali

Gli isolati B6, B8 e B19 sono stati allevati in coltura liquida per l'ottenimento dei rispettivi filtrati colturali (FC). Nel dettaglio, da colonie monoconidiche di ciascun isolato accresciute su PDA a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , con l'ausilio di un foratappi del diametro di 5 mm, sono stati prelevati 5 dischetti e posti in tubi contenenti 5 mL di acqua distillata sterile. Le sospensioni ottenute sono state distribuite, singolarmente, in beute da 2 L contenenti 400 mL di substrato Czapek (Oxoid) con aggiunta di farina di mais (pH 5.7) e poste ad incubare in termostato a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  per 21 giorni. Trascorso tale periodo, il contenuto di ciascuna beuta è stato filtrato, inizialmente con un doppio strato di garza per ridurre la biomassa fungina e successivamente con filtri per aspirazione mediante complessi filtranti a membrana porosa Stericup Millipore® (diametro dei pori =  $0,22 \mu\text{m}$ ). Per l'isolato B6 sono stati ottenuti 5 litri di filtrato, 3 per l'isolato B19 e 10 per l'isolato B8. 50 mL di ciascun filtrato sono stati conservati a  $-20^\circ\text{C}$ , mentre il resto è stato liofilizzato utilizzando un liofilizzatore FreeZone (Labconco, America).

#### 3.2.2 Estrazione, isolamento e caratterizzazione dei metaboliti prodotti in coltura liquida

Presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università Federico II di Napoli, il liofilizzato di ogni fungo è stato ridisciolti con acqua in 1/10 del volume iniziale; la sospensione ottenuta, acidificata fino a pH 4 con una soluzione di HCl 2M è stata estratta esaustivamente per tre volte con analogo volume di acetato di etile. Le fasi organiche di ogni isolato sono state riunite, anidificate con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro ed evaporate a pressione ridotta, fornendo un

residuo oleoso rosso scuro in differente quantità: B6 = 989.8 mg; B19 = 495.5 mg; B8 = 1800 mg. Ogni estratto organico è stato sottoposto ad un processo di purificazione bio-guidato che ha previsto l'utilizzo sia di colonne cromatografiche che di TLC (Thin Layer Chromatography) di gel di silice eluite con diversi sistemi eluenti. I metaboliti, così ottenuti sono stati caratterizzati con metodi chimici e spettroscopici (IR, UV, ed essenzialmente tecniche NMR mono e bidimensionali dell'<sup>1</sup>H e del <sup>13</sup>C), spettrometria di massa, metodi ottici per la determinazione della struttura e stereostruttura.

### 3.2.3 Saggi di fitotossicità

La fitotossicità dei FC è stata preliminarmente saggiata su piantine di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) e su foglie di vite cv. Inzolia, adottando la metodologia per "immersione". In particolare, l'attività tossica di ogni FC in 6 diverse concentrazioni (100, 50, 25, 10, 5, 1%), distribuito in tubi di vetro in ragione di 2 mL per tubo è stata verificata immergendo il singolo picciolo di foglie di vite o lo stelo di piantine di pomodoro per 24h, trasferendoli successivamente in acqua distillata sterile per 48h. Come tesi di controllo sono stati utilizzati acqua distillata sterile e substrato. Per la quantificazione dei sintomi comparsi si è fatto riferimento ad una scala comprendente 4 classi (0, nessun sintomo; 1, appassimento lieve; 2, appassimento medio con presenza di aree necrotiche; 3, appassimento totale). La tossicità è stata controllata anche su foglie di vite cv. Inzolia adottando la metodologia "per puntura". Per il singolo FC, gocce di 20 µl di ogni concentrazione di saggio sono state inoculate su 3 foglie previamente ferite in 3 siti, mentre, gocce di acqua distillata sterile e di substrato Czapek sono state distribuite sulle foglie di controllo. Durante incubazione al buio in camera umida, per evitare l'evaporazione delle gocce, le foglie sono state controllate giornalmente per rilevare la comparsa dei sintomi intorno al sito di inoculazione. Quindici giorni dopo l'avvio del saggio, mediante il software Image Tool versione 3.00 si è proceduto alla misurazione delle aree necrotiche e le dimensioni rilevate sono state espresse in mm<sup>2</sup>. Per ciascun isolato fungino oggetto d'indagine, sugli

stessi organi e con analoga metodologia, è stata anche accertata, quando possibile, la tossicità degli estratti di frazioni cromatografiche e metaboliti diluiti in MeOH (4%) e acqua distillata sterile alle seguenti concentrazioni: 0.5, 1, 2, and 4 mg mL<sup>-1</sup> per estratti e frazioni, 0.5, 1, 2, and 4 mg mL<sup>-1</sup> per i metaboliti. Il controllo è stato allestito in MeOH (4%) e acqua distillata sterile. Inoltre, l'influenza della luce sull'attività tossica dei metaboliti dell'isolato B19 è stata analizzata esponendo le foglie inoculate simultaneamente ad un fotoperiodo di 12 h luce e 12 h buio. Le dimensioni dei sintomi necrotici, includendo i controlli, sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) per  $P < 0.05$ , mediante il software SYSTAT (Systat software Inc., Richmond, CA, USA). Allo scopo di verificare per ciascun metabolita l'associazione tra concentrazione e area necrotica, le misure sono state sottoposte anche all'analisi delle regressioni lineari associata al test HSD (Honest Significant Difference) di Tukey per  $P < 0.05$  (SigmaPlot, SPSS INC., Chicago, IL); inoltre, i coefficienti angolari delle regressioni lineari sono stati posti a confronto, tramite coefficienti ed errori standard delle relative regressioni, separando le medie con l'impiego del test HSD, se appropriato.

#### 3.2.4 Saggi di antibiosi

L'attività antagonistica dei metaboliti prodotti da B6 e B19 è stata saggiata nei confronti di funghi fitopatogeni: nel dettaglio il primo isolato verso *D. seriata*, *N. parvum*, *N. vitifusiforme*, *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian (noto patogeno degli agrumi) ed il secondo per *D. seriata*, *L. mediterranea*, *N. vitifusiforme* e *P. citrophthora*. A tal proposito, dischetti sterili di cellulosa (Ø 6 mm; Oxoid, UK), imbibiti con 30 µl di una soluzione metanolica di ciascun metabolita (50 µg mL<sup>-1</sup>), sono stati posti al centro di capsule contenenti PDA, successivamente, ricoperti dalla sospensione miceliare (10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> propaguli mL<sup>-1</sup>) di ciascun patogeno; sono state così allestite 40 capsule (10 capsule patogeno<sup>-1</sup>) per ciascun metabolita. Il saggio ha richiesto l'impiego di Ridomil Gold SL (Metalaxyl-M 43.88%; Syngenta, Italia) e Pentachloronitrobenzene (99%; Sigma-Aldrich Co., USA) come

controllo positivo e di MeOH al 4%, cloroformio e dischetto sterile come controllo negativo. Ciascun trattamento è stato ripetuto 2 volte. L'attività fungicida è stata valutata, dopo un'incubazione di 3 giorni a 25°C, misurando l'alone di inibizione della crescita fungina.

### **3.3 *Eriobotrya japonica***

#### 3.3.1 Rilievi epidemiologici e saggi di isolamento

Il nespolito oggetto d'indagine di 25 anni d'età, sito in località Santa Maria di Gesù (PA) a 102 m di altezza sul livello del mare, si estende su un'area di 1000 m<sup>2</sup> e comprende cultivar autoctone (BRT20, Claudia, Fiore, La Mantia, Marceno, Nespolone Bianco Dolce, Nespolone di Trabia, San Filipparo e Virticchiara) e alloctone (Algerie, Bueno, El Buenet, Golden Nugget, Magdall, Peluche e Tanaka), quest'ultime importate direttamente dai paesi di origine. Un rilievo preliminare effettuato nel maggio 2014 ha consentito di visualizzare lesioni cancerose su fusti e rami di piante cv. Algerie e Bueno e, nel contempo, prelevare campioni vegetali sintomatici. Successivamente, sono state delimitate a random tre aree di saggio di circa 150 m<sup>2</sup> dove nel febbraio successivo (2015) sono state conteggiate le piante sintomatiche sul totale delle presenti per calcolare l'incidenza dei cancri, espressa in percentuale.

Anche in corrispondenza del secondo rilievo, sono stati prelevati campioni vegetali sintomatici che, posti in buste di plastica siglate con i riferimenti del prelievo, venivano sottoposti entro 48h dalla raccolta a saggi d'isolamento presso i laboratori di Patologia vegetale, del Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (SAF). Inizialmente, per rimuovere le particelle di polvere dalla superficie, tutti i campioni sono stati sciacquati abbondantemente in acqua corrente, asciugati con carta assorbente e sterilizzati mediante rapidi e ripetuti passaggi alla fiamma. Da ciascun campione sono stati prelevati asetticamente 5 frammenti di tessuto legnoso e posti in capsule Petri contenenti PDA, addizionato con solfato di streptomina allo 0.015% (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, USA). Per rilevare la comparsa di colonie, piastre così allestite e incubate a 25±1°C in assenza di luce, sono state

monitorate giornalmente allo stereomicroscopio. Si è proceduto quindi all'allevamento in purezza, prelevando, con l'ausilio di un'ansa e in condizioni di sterilità, porzioni marginali di micelio singolarmente trasferite al centro di capsule Petri con PDA; quest'ultima operazione è stata eseguita 3 volte per garantirne la crescita in purezza.

### 3.3.2 Identificazione morfologica

La formazione di picnidi è stata stimolata incubando i singoli isolati fungini sui seguenti substrati: PDA, PDA con aghi di pino, PDA con frammenti di tralci lignificati, Agar-Acqua (AA) con aghi di pino, AA con frammenti di tralci lignificati. Le capsule sono state, quindi, poste ad incubare a 23°C con luce fluorescente ad intermittenza (12h). Trascorsi 45 giorni i picnidi, sezionati trasversalmente con lama sterile, sono stati montati su un vetrino con una goccia di lattofenolo chiaro ed osservati al microscopio ottico (Axioskop, Zeiss, Germany) corredato di macchina digitale AxioCam MRc5 (Zeiss). Per ciascun isolato utilizzando AxioVision 4.6 (Zeiss) è stata rilevata la lunghezza e la larghezza di 50 conidi e i dati ottenuti sono stati riportati come valore minimo-(medio)-massimo. Per quanto riguarda le indagini sui caratteri morfoculturali (pigmentazione, tessitura, voluminosità), dal margine di colonie di 4 giorni di età sono stati prelevati dischetti di micelio ( $\varnothing = 5$  mm), posizionati in piastre Petri contenenti PDA e quindi trasferiti in termostato a 25°C al buio; i rilievi sono stati effettuati dopo 7 giorni. Inoltre, per definire la temperatura ottimale di crescita, da colonie di 7 giorni d'età di ogni isolato, sono state prelevate porzioni miceliari ( $\varnothing = 5$  mm) distribuite in piastre con PDA, poste ad incubare al buio a diversa temperatura (compresa tra 5 e 40°C con intervallo di 5°C). Per ogni fungo e ciascuna temperatura sono state allestite 3 piastre e la prova è stata ripetuta 2 volte. Nel momento in cui la colonia copriva l'intero diametro della piastra, si procedeva alla misurazione del diametro della colonia lungo i due assi perpendicolari, per determinare il tasso di crescita radiale giornaliera ( $\text{mm giorno}^{-1}$ ). Dopo 15 giorni dall'avvio del

saggio, le piastre prive di evasione miceliare sono state incubate a 25°C per accertare l'effetto fungistatico o fungicida delle temperature saggiate.

I dati relativi al tasso medio di crescita sono stati sottoposti a regressione lineare, facendo riferimento, per la stima della temperatura di crescita ottimale, al modello polinomiale migliore sulla base del coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) e del parametro di significatività ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.3 Identificazione molecolare

Il micelio di ciascun fungo, allevato su PDA a 25°C per 7 giorni e prelevato, con bisturi sterile, è stato inserito in un tubo eppendorf (1,5 mL) in cui si aggiungeva un volume di 50 µl di biglie sterili di vetro (212-300 µm, 50-70 U.S. sieve; Sigma) e 600 µl di CTAB extraction buffer (Tris 100 mM pH 8.4; NaCl 1.4 M; EDTA 25 mM pH 8.0; CTAB 2%; PVP 40.000). Dopo un breve trattamento con vortex, necessario per una prima rottura delle pareti cellulari, il micelio è stato incubato in bagno termostatico (65°C per 1 ora), addizionato con 300 µl di fenolo TE-saturo (Fluka) e 300 µl di cloroformio-alcool isoamilico (24:1, v/v), e centrifugato per 10 min a 5000 rpm. La fase acquosa ottenuta è stata trasferita in un nuovo tubo, risospesa in 600 µl di cloroformio-alcool isoamilico (24:1, v/v) e nuovamente centrifugato a 5000 rpm per 10 min. Il surnatante previo trasferimento in 600 µl di isopropanolo freddo (-20°C), è stato sottoposto ad ulteriore centrifugazione (10000 rpm per 10 min) allo scopo di consentire la precipitazione del DNA. Il pellet ottenuto è stato lavato per 2 volte con etanolo al 70% freddo (-20°C), asciugato sotto cappa a flusso laminare, sospeso in 100 µl di tampone TE 1x (Tris 10 mM pH 7.5; EDTA 1mM pH 7.5) ed incubato con RNase A (1mg mL<sup>-1</sup>) a 37°C per 30 minuti. L'amplificazione sia la regione ITS dell'rDNA, utilizzando i primer universali ITS1F (Gardes & Bruns 1993) e ITS4 (White *et al.*, 1990), che di una porzione del gene EF1- $\alpha$  con i primer EF1-728F e EF1-986R (Carbone and Kohn, 1999) è stata effettuata tramite PCR. Inoltre, da quattro isolati fungini è stato anche amplificato un frammento più grande del gene EF1- $\alpha$  con i primer EF1-688F e EF1-1251R (Alves *et al.*, 2008). La reazione è stata

realizzata in un volume totale di 25 µl contenente: 1x Dream Taq buffer (Fermentas), 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 160 µM di ciascun dNTP, 0.4 µM di ciascun primer, 0.5 U di Taq DNA polymerase (Dream Taq, Fermentas, Italy) e 1 µl di DNA. Impiegando il termociclatore Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) l'amplificazione è stata eseguita secondo le condizioni di seguito riportate: per l'ITS, iniziale denaturazione a 94°C per 3 min, 35 cicli di 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 45 s a 72°C, ed estensione finale di 10 min a 72°C; per l'EF1- $\alpha$ , denaturazione iniziale di 2 min a 94°C, seguita da 40 cicli di 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 1 min a 72°C, ed una estensione finale di 7 minuti a 72°C. La visualizzazione dei prodotti PCR è stata realizzata mediante elettroforesi su gel di agarosio (Agarose D-1 Low EEO, Eppendorf) all'1.5% in tampone TBE 1x (Tris-borato 89 mM, ac. borico 89 mM, EDTA 2 mM), usando il SYBR® Safe (Invitrogen) come tracciante molecolare ed un transilluminatore UV; il Gene-ruler 100-bp Plus DNA ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) ha fornito indicazioni sulle reali dimensioni delle bande di DNA. I prodotti PCR, spediti presso i laboratori della Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany), sono stati purificati e sequenziati in entrambe le direzioni con gli stessi primer utilizzati per l'amplificazione. Successivamente, le sequenze nucleotidiche sono state modificate usando il programma Sequencher (Version 4.7, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) e confrontate con quelle presenti in GenBank. Le sequenze ITS ed EF1- $\alpha$  sono state allineate contemporaneamente con il programma Clustal W (Geneious v. 6.1.6; Biomatters Ltd.), e quando necessario, sono state apportate delle modifiche negli allineamenti. Altre sequenze di riferimento, selezionate da GenBank, sono state incluse negli allineamenti e si è proceduto con l'analisi filogenetica, esclusivamente per il genere *Diplodia*, secondo il criterio "maximum likelihood" impiegando il programma Mega 5 (v.5.2.1; The Biodesign Institute). La robustezza dell'analisi filogenetica è stata effettuata utilizzando l'analisi di bootstrap con 1000 repliche. *L. theobromae* e *L. gonubiensis* Pavlic, Slippers & M.J. Wingf. sono state scelte come "outgroup" e l'albero filogenetico ottenuto è stato visualizzato e revisionato con l'ausilio del programma Mega 5.



#### 3.3.4 Saggi di patogenicità

La capacità patogenetica degli isolati è stata saggiata su piante di nespolo cv. San Filipparo di 2 anni di età. In particolare, sulla porzione centrale dei rami sterilizzati superficialmente con etanolo al 70%, sono state effettuate lesioni corticali dove sono stati posti frammenti di colonia fungina (dischetti del diametro di 6 mm) allevata per 7 gg su PDA; frammenti di PDA sterile sono stati inoculati su piante testimoni. I siti di inoculazione sono stati avvolti con cotone idrofilo imbibito di acqua distillata sterile e sigillati con parafilm, per evitare la rapida disidratazione del micelio. Per ciascun isolato, incluso il controllo, sono state inoculate 7 piante e l'esperimento è stato ripetuto 2 volte. I nespoli così infettati ed esposti alle condizioni di temperatura e umidità naturali, sono stati regolarmente monitorati per la comparsa di sintomi. Trascorsi 3 mesi dall'inoculazione, le piante sono state scortecciate in corrispondenza del sito di inoculazione per misurare l'imbrunimento sottocorticale al disopra e al disotto dello stesso. Si è proceduto quindi con il reisolamento inoculando frammenti di tessuto sintomatico in capsule Petri contenenti PDA, incubate in assenza di luce a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . I caratteri macro e microscopici delle colonie reisolate sono stati confrontati con quelli degli isolati inoculati. I dati relativi alle lunghezze degli imbrunimenti sottocorticali causate da ciascun isolato, includendo il controllo, sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza e il test LSD di Fischer per separare le medie con una significatività di  $P \leq 0.05$ , utilizzando il programma SAS version 9.0 (SAS Institute, Cary, NC).

#### 3.4 Specie Diatrypaceae in *Vitis vinifera*

I settantuno isolati appartenenti alla famiglia Diatrypaceae, in collezione presso l'Istituto Agroforestal Mediterráneo dell'Universidad Politécnica de Valencia, sono stati oggetto delle analisi riportate di seguito.

### 3.4.1 Identificazione molecolare

L'estrazione del DNA genomico di ciascun isolato è stata effettuata da porzioni miceliari (circa 200 mg) di colonie pure di 7gg di età, accresciute su PDA a 25°C al buio, poste in un mortaio di ceramica e meccanicamente disgregate, con l'ausilio di azoto liquido. Le successive fasi di estrazione del DNA sono state eseguite utilizzando E.Z.N.A. Plant Miniprep Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA), secondo le istruzioni riportate. E' stata amplificata la regione genica ITS e una porzione del gene  $\beta$ -tubulina (BT), mediante PCR, utilizzando rispettivamente i primer ITS1F (Gardes & Bruns 1993) - ITS4 (White *et al.*, 1990) e Bt2a - Bt2b (Glass and Donaldson, 1995). La reazione è stata realizzata in un volume totale di 25  $\mu$ l contenente: 1x PCR buffer, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M di ciascun dNTP, 0.4  $\mu$ M di ciascun primer, 0.8 U di Netzyme DNA polymerase (N.E.E.D. S.L., Valencia, Spain) e 1  $\mu$ l di DNA. E' stato impiegato un termociclatore Peltier Thermal Cyclor-200 (MJ Research, Waltham, MA), e le condizioni di amplificazione per entrambi i geni sono state le seguenti: una denaturazione iniziale di 3 min a 94°C, seguita da 35 cicli di 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 45 s a 72°C, ed una estensione finale di 10 min a 72°C. I prodotti PCR sono stati visualizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio (Agarose D-1 Low EEO, Eppendorf) all'1% in tampone TBE 1x (Tris-borato 89 mM, ac. borico 89 mM, EDTA 2 mM), con il SYBR® Safe (Invitrogen) come tracciante molecolare. Gene-ruler 100-bp DNA ladder plus è stato usato come marcatore di peso molecolare noto (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) e le relative bande sono state individuate mediante un transilluminatore UV. Gli stessi prodotti sono stati spediti presso i laboratori della MacroGen (MacroGen Europe, Amsterdam, The Netherlands) per essere purificati e sequenziati in entrambe le direzioni con gli stessi primer utilizzati per la PCR. Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state analizzate e modificate usando il programma Sequencher (Version 4.7, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) quindi, confrontate con quelle presenti nel database di GenBank. Le sequenze ITS e BT sono state allineate, prima separatamente e poi contemporaneamente, con il programma Clustal W

(Geneious v. 6.1.6; Biomatters Ltd.), e quando necessario, sono state apportate delle modifiche negli allineamenti. Altre sequenze di riferimento, selezionate da GenBank, sono state incluse negli allineamenti e l'analisi filogenetica è stata condotta utilizzando il criterio "neighbor-joining " con il programma Mega 5 (v.5.2.1; The Biodesign Institute). L'analisi di bootstrap, con 1000 replicazioni, è stata utilizzata per verificare la robustezza dell'albero filogenetico e la specie *E. scoparia* è stata scelta come "outgroup". L'albero filogenetico ottenuto è stato visualizzato e revisionato con l'ausilio del programma Mega 5.

#### 3.4.2 Identificazione morfologica

Gli isolati rappresentativi di ciascun clade sono stati selezionati per essere sottoposti ad identificazione morfologica, seguendo lo stesso protocollo descritto nel paragrafo 3.3.2., rilevando anche la lunghezza della corda dei conidi, ovvero la distanza tra le estremità del singolo conidio filiforme, parametro peculiare per i funghi ascritti alla famiglia in studio.

## 4 RISULTATI

### 4.1 *Vitis vinifera*

#### 4.1.1 Saggi di patogenicità *in planta*

Lesioni cancerose ed imbrunimenti sottocorticali formanti settori a cuneo in sezione trasversale si osservavano, dopo un'incubazione di circa sei mesi, sui fusti delle viti inoculate con ogni isolato delle specie Botryosphaeriaceae, rinvenute nei vigneti della Sicilia centro-occidentale. Nelle piante testimoni, inoculate con PDA sterile, invece, un callo cicatriziale aveva rimarginato completamente la ferita di saggio (Figura 1). Inoltre, picnidi scuri erompevano dal ritidoma dei tralci delle piante inoculate con *L. mediterranea* e *N. vitifusiforme*. Le modificazioni cromatiche del “legno” mostravano dimensioni diverse in funzione della specie e dell'isolato saggiato (Tabella 2). Le lesioni causate da tutti gli isolati saggiati sono risultate statisticamente significative per  $P < 0.05$  rispetto al controllo. Una maggiore variabilità intraspecifica è stata rilevata per gli isolati di *D. seriata* e *N. parvum*, con valori medi compresi fra  $3.8 \pm 1.3$  e  $15.5 \pm 0.5$  cm per l'una,  $5.3 \pm 0.8$  e  $10.3 \pm 1.1$  cm per l'altra. Mentre un'estensione pressoché simile mostravano i sintomi vascolari determinati dagli isolati di *L. mediterranea* e *N. vitifusiforme*, con misure medie di  $8.0 \pm 0.5$  cm,  $8.2 \pm 1.6$  cm,  $12.2 \pm 0.7$  cm, e  $9.3 \pm 1.8$  cm,  $12.0 \pm 3.0$  cm, rispettivamente. Differenze statisticamente significative per  $P < 0.05$  sono emerse a livello intraspecifico fra B22 e gli altri isolati, B7 rispetto B19 e B3 e B5 nei confronti di B4 e B6. Nessuna significatività statistica è stata riscontrata fra i valori medi degli isolati di *N. vitifusiforme*. I postulati di Koch sono stati soddisfatti con il reisolamento degli isolato fungini dai rispettivi tessuti sintomatici.

#### 4.1.2 Saggi di inoculazione in vigneto

Per quanto concerne l'indagine sulla progressione della colonizzazione di *D. seriata* (B24) nell'ospite, i tralci inoculati direttamente in pieno campo anche dopo un'incubazione di 180 giorni presentavano l'imbrunimento dei vasi

vascolari non associato ad alcuna lesione corticale. Un'analoga variazione cromatica, ma molto meno estesa, si osservava nei tralci trattati con PDA sterile. *D. seriata*, infatti, è stata reisolata dai tessuti interni di tralci inoculati e non, ma in percentuale diversa e differenze statisticamente significative per  $P < 0.05$  sono emerse in funzione della distanza dal sito di inoculazione (Tabella 3). In particolare, nei tralci inoculati artificialmente una riduzione statisticamente significativa per  $P < 0.05$  della frequenza di isolamento di *D. seriata* è stata riscontrata tra 0.5 e 2 cm di distanza dal sito di inoculazione, passando dal primo valore pari a 34.6% al secondo del 16.6%. Invece, nei tralci utilizzati come controllo tale riduzione è avvenuta tra 0.5 e 5 cm con valori che vanno dal 12.3% all'1.6%, rispettivamente.

## 4.2 Saggi di attività biologica

### 4.2.1 Identificazione chimica dei metaboliti

La purificazione degli estratti organici ha permesso l'isolamento di 10 metaboliti secondari, 6 prodotti dall'isolato B6 (*L. mediterranea*) e 4 da B19 (*N. parvum*). Dal confronto con i dati presenti in letteratura, 2 dei metaboliti dell'isolato B6 sono stati identificati per la prima volta e denominati lasiolattoli A e B (**1-2**), mentre, gli altri 4 erano già noti: botriosferiodiplodina (**3**), (5R)-5-idrossilasioplodina (**4**), (-)-acido jasmonico (**5**) e 4-idrossimetil-3,5-dimetildiidro-2-furanone (**6**) (Figura 2). Per quanto concerne l'isolato B19, il confronto fra la struttura dei 4 metaboliti prodotti e quelli presenti in letteratura ha permesso l'identificazione dei composti: botriosferone D e A (**1 e 2**), isosclerone (**3**), 3,4,5-triidrossi-1-tetralone (**4**) (Figura 3). Per l'isolato B8 non è stato possibile purificare ulteriormente le frazioni omogenee per l'elevata quantità di acidi grassi presenti nei gruppi delle stesse.

### 4.2.2 Saggi di fitotossicità e di antibiosi

I filtrati colturali con relativi estratti e frazioni cromatografiche degli isolati B6 e B19 hanno costantemente mostrato attività fitotossica, a differenza del B8.

Per l'isolato di *L. mediterranea*, sebbene il metabolita **4** fosse stato escluso dal saggio perchè presente in piccole quantità, per ciascun degli altri composti l'analisi della varianza ha evidenziato sia una relazione lineare tra aree necrotiche prodotte e concentrazione d'impiego, poichè all'aumento di quest'ultima è sempre corrisposto un incremento della tossicità, che un'interazione significativa tra metabolita e concentrazione ( $P < 0.05$ ). L'analisi delle regressioni lineari, pertanto, ha permesso la separazione di 4 relazioni lineari con differente inclinazione ( $P < 0.05$ ) (Figura 4). A tal riguardo, il metabolita **5** è risultato il più fitotossico, producendo un'area necrotica estesa  $5.3 \text{ mm}^2$  (Andolfi *et al.*, 2015, in corso di stampa). Per quanto riguarda l'isolato B19 già dopo 6 giorni dall'avvio dei saggi con ciascun metabolita sono state rinvenute lesioni necrotiche attorno al sito di inoculazione. L'analisi della varianza sia in condizioni di luce che di buio, ha rivelato per ciascun metabolita un'associazione lineare tra concentrazione e area necrotica. Inoltre, l'interazione significativa tra concentrazione e metabolita ( $P < 0.05$ ) così come l'analisi delle regressioni lineari, hanno permesso di distinguere 4 relazioni lineari con diversa inclinazione ( $P < 0.05$ ) (Figura 5). La successiva comparazione statistica dei coefficienti angolari di ciascuna regressione ha evidenziato la maggiore fitotossicità del metabolita **1** rispetto al metabolita **2**, ma entrambi sono risultati più tossici degli altri (**3** e **4**). I metaboliti **3** e **4** hanno causato sintomi necrotici, ma la differente estensione non è risultata statisticamente significativa. Fatta eccezione per il metabolita **1**, la cui capacità tossica tende a diminuire in presenza di luce, il diverso trattamento non ha determinato alcuna differenza statisticamente significativa per gli altri metaboliti (Tabella 4). Nessuno dei composti prodotti dalle specie *L. mediterranea* e *N. parvum* hanno inibito la crescita miceliare dei fitopatogeni saggiati.

### 4.3 *Eriobotrya japonica*

#### 4.3.1 Rilievi epidemiologici ed identificazione morfologica

Durante i rilievi epidemiologici condotti nel nespoletto in agro di Palermo, numerose piante deperienti appartenenti alle cvs. Algerie e Bueno erano contrassegnate da cancri di dimensioni variabili, su fusto e rami ed imbrunimenti sottocorticali che in sezione trasversale formavano aree necrotiche (Figura 6). L'incidenza dei sintomi per entrambe le cultivar è risultata pari a 48.2%. Dai saggi di isolamento sono stati ottenuti 10 isolati appartenenti a 4 specie Botryosphaeriaceae così distribuiti: 1 di *D. seriata*, 2 di *N. parvum*, 3 di *N. vitifusiforme* e 4 appartenenti al genere *Diplodia*, per i quali non è stato possibile accertare l'identità a livello di specie. Inoltre, le specie del genere *Diplodia* erano associate esclusivamente ai cancri presenti in piante cv. Bueno, mentre quelle ascritte al genere *Neofusicoccum* alla cv. Algerie. Le dimensioni dei conidi e le temperature ottimali di crescita degli isolati sporulanti picnidi scuri differenziati per lo più sul substrato PDA con aghi di pino sono riportati in tabella 5. Le colonie dei 4 isolati identificati solo a livello di genere (*Diplodia* sp.) erano caratterizzate da un abbondante feltro miceliare aereo, inizialmente bianco, virante al grigio scuro dal centro verso il margine esterno nell'arco di 5-6 giorni. I valori medi di lunghezza e larghezza dei conidi erano rispettivamente 23.7 e 10.7  $\mu\text{m}$ . Gli isolati sono cresciuti in un ampio range termico compreso tra 5 e 35°C, con un optimum a 25.6°C, mentre la temperatura di 40°C ha avuto un effetto fungistatico. L'unico isolato di *D. seriata* mostrava un micelio biancastro aereo compatto, che tendeva ad imbrunire dopo 4-5 giorni, e conidi misuranti in media 20.9 x 11.1  $\mu\text{m}$ . Le esigenze termiche di *D. seriata* sono risultate del tutto analoghe a quelle dei predetti isolati ascritti allo stesso genere. Le colonie di *N. parvum* hanno formato un micelio aereo, spesso cotonoso di colore bianco che diveniva grigio scuro nell'arco di 5-6 giorni. I valori medi di lunghezza e larghezza dei conidi erano rispettivamente 11.2 e 5.4  $\mu\text{m}$ , il range termico di crescita variava da 5 a 35°C con un optimum di crescita a 26.4°C, mentre la temperatura di

40°C è risultata letale. Un micelio aereo radente, compatto e virante dal bianco al grigio chiaro in 4-5 giorni, ha contrassegnato, invece, gli isolati di *N. vitifusiforme* con esigenze termiche di crescita comprese tra 10 e 40°C, con un optimum di 27.0°C; i conidi misuravano in media 17.1 x 5.8 µm (Figura 7).

#### 4.3.2 Identificazione molecolare

L'analisi delle sequenze ITS e EF1- $\alpha$  ha confermato l'identificazione morfologica di tutti gli isolati saggiati (*Diplodia* sp., *D. seriata*, *N. parvum* e *N. vitifusiforme*). L'amplificazione della regione ITS ha prodotto un frammento di circa 500 bp, mentre quella della regione EF1- $\alpha$  un frammento di circa 300 bp. Le ricerche in GenBank tramite il software BLAST, hanno indicato per entrambe le regioni geniche una similarità del 99-100% con le sequenze di riferimento dei ceppi rappresentativi, inclusi quelli tipo. Le sequenze di entrambe le regioni geniche si sono dimostrate informative per l'identificazione degli isolati ascritti alla specie *D. seriata*, *N. parvum* e *N. vitifusiforme*. Nel contempo, l'analisi filogenetica ha rilevato la totale identità genetica dei 4 isolati del genere *Diplodia* accertando, inoltre, la presenza di una nuova specie con un valore di bootstrap pari a 85% (Figura 8). I quattro isolati, in particolare, sono stati raggruppati in un unico clade unitamente a *Diplodia* sp. CAP 330; l'isolato NB4 di *D. seriata*, invece, è stato raggruppato insieme al ceppo tipo della stessa specie, con un valore di bootstrap pari a 99%. Le sequenze nucleotidiche dei geni ITS e EF1- $\alpha$  di tutti gli isolati saggiati sono state depositate in GenBank (Tabella 6).

#### 4.3.3 Saggi di patogenicità

Relativamente ai saggi di patogenicità effettuati i primi giorni di giugno del 2015, nella prima decade del mese di settembre tutti i rami inoculati con i diversi isolati fungini mostravano cancri esterni associati ad imbrunimento sottocorticale, al di sopra e al di sotto del sito di inoculazione (Figura 9). Alcune delle piante sintomatiche inoltre reagivano emettendo nuovi getti inferiormente alle ferite da saggio. I sintomi vascolari si sono estesi



differentemente in relazione alle specie fungina saggiata ed occasionalmente anche all'isolato. Nel dettaglio, gli imbrunimenti più estesi sono derivati dalle infezioni di *N. parvum* con NB5 (valore medio di  $83.8 \pm 6.3$  mm), seguita dalla specie *Diplodia* sp., in particolare con gli isolati NB8 e NB10 ( $72.0 \pm 7.9$  mm e  $57.7 \pm 15.3$  mm, rispettive dimensioni medie). Misure medie inferiori, oscillanti fra  $12.8 \pm 4.2$  mm e  $34.4 \pm 5.0$  mm sono state raggiunte invece da *N. vitifusiforme*, isolato NB3 e da NB4, l'unico di *D. seriata*. Dall'analisi della varianza (ANOVA) si evidenzia che i valori medi dell'estensione delle variazioni cromatiche vascolari causate da *D. seriata*, *Diplodia* sp., *N. parvum* si sono differenziati per  $P < 0.05$  dal controllo. Analoga significatività statistica è emersa fra le dimensioni medie degli imbrunimenti derivanti dall'inoculazione di NB4 e NB5 rispetto a NB1 e NB6. Per *Diplodia* sp. l'estensione del sintomo vascolare causato dall'isolato NB9 si è differenziata statisticamente dagli isolati NB8 e NB10. Infine, una variabilità è stata rilevata fra gli isolati di *N. vitifusiforme* poiché l'estensione media dell'isolato NB1 differiva statisticamente rispetto agli isolati NB2 e NB3; quest'ultimi 2 isolati non hanno mostrato una differenza significativa sia tra loro che rispetto al valore medio riportato per il controllo pari a  $10.4 \pm 1.7$  mm (Figura 10). Tutti gli isolati saggiati sono stati reisolati con successo dai tessuti sintomatici, soddisfacendo i postulati di Koch.

#### **4.4 Specie Diatrypaceae in *Vitis vinifera***

##### 4.4.1 Identificazione molecolare

Per quanto riguarda i 71 isolati fungini provenienti da vigneti spagnoli, il confronto fra le sequenze nucleotidiche dei geni ITS e BT e quelle di riferimento presenti in GenBank ha permesso di accertarne l'appartenenza alla famiglia Diatrypaceae. Inoltre, gli alberi filogenetici basati sulle sequenze ITS e BT hanno mostrato una topologia e valori di bootstrap simili, differenziando entrambi 7 cladi principali. Nel presente lavoro si riporta l'albero basato sulle sequenze ITS, poiché ha fornito una maggiore risoluzione dei taxa (Figura 11). In particolare, 45 isolati sono stati inclusi in un clade con *C. ampelina*, mentre

14 in un altro con *E. lata*; in entrambi i cladi si rileva una variazione intraspecifica. Dei rimanenti isolati, 3 sono stati raggruppati con *E. microtheca*, due con *E. citricola*, mentre per gli altri non è stato possibile identificarli a livello di specie. Infatti, due si approssimano ad *E. tetragona* (Duby) Sacc., *E. leptoplaca* e a quattro specie appartenenti al genere *Eutypa*, numerate da 1 a 4 e segnalate in Spagna da Luque *et al.* (2012). Pertanto, il primo taxon, costituito da un solo isolato, è stato denominato *Eutypa* sp. 5, mentre il secondo rappresentato da quattro isolati geneticamente identici *Eutypa* sp. 6. L'ultimo taxon, comprendente 2 isolati, poiché strettamente correlato alla specie *Diatrypella iranensis* Mehrabi, M e Hemmati, R, è stato nominato *Diatrypella* sp. Gran parte dei cladi ottenuti con questo tipo di analisi, sono stati supportati con valori di bootstrap piuttosto alti. Le sequenze nucleotidiche ITS e BT dei 71 isolati sono state depositate in GenBank (Tabella 7).

#### 4.4.2 Identificazione morfologica

I funghi hanno sporulato generalmente sul substrato AA con frammenti di tralci lignificati di vite, producendo conidi filiformi ialini. In Tabella 8 sono riportate le temperature ottimali di crescita degli isolati rappresentativi di ciascun clade, mentre nelle Figure 12-13 colonie e conidi. Si riportano di seguito soltanto i caratteri morfologici e le temperature di crescita delle diverse specie, poiché per un problema tecnico (calibratura del microscopio), i caratteri microscopici (in particolare le dimensioni) sono in fase di elaborazione.

*C. ampelina*: micelio bianco tendente al crema, cotonoso, regolare con sporodochi scuri e masse conidiche color crema; temperatura di crescita: 10 - 30°C, optimum a 26.3°C, effetto fungicida a 40°C.

*E. lata*: micelio bianco crema moderatamente aereo, picnidi neri e masse conidiche color crema; temperatura di crescita: 5 - 30°C, optimum a 24.3°C, effetto fungicida a 40°C.

*E. citricola*: micelio aereo bianco con sporodochi scuri e masse conidiche arancioni; temperatura di crescita: 10 - 30°C, con un optimum a 26.1°C, effetto fungicida a 40°C.

*E. microtheca*: micelio rosa chiaro con picnidi neri e masse conidiche giallo arancio; temperatura di crescita: 15 - 35°C, optimum a 29.5°C, effetto fungistatico a 40°C.

*Diatrypella* sp.: micelio aereo bianco con masse conidiche arancioni; temperatura di crescita: 5 - 30°C, optimum a 25.4°C, effetto fungicida a 35°C.

*Eutypa* sp. 5: micelio bianco moderatamente aereo con masse conidiche arancioni; temperatura di crescita: 5 - 30°C, optimum a 22.7°C, effetto fungicida a 40°C.

*Eutypa* sp. 6: abbondante micelio aereo bianco con masse conidiche gialle; temperatura di crescita: 5 - 30°C, con un optimum a 25.1°C ed effetto fungistatico a 40°C.

#### 4.4.3 Distribuzione delle Diatrypaceae spp.

Relativamente alla frequenza d'isolamento delle suddette specie, *C. ampelina* è stata rinvenuta in ciascuna provincia oggetto d'indagine ed ha raggiunto la percentuale più elevata (63.4%). Ricorrente è stata anche *E. lata* sebbene in percentuale inferiore (19.7%), occasionali sono risultate, invece, le rimanenti. Nelle aree viticole ricadenti nella provincia di Cádiz le Diatrypaceae hanno mostrato la maggiore biodiversità, solo *Diatrypella* sp. infatti non è stata mai isolata. Questa specie insieme a *C. ampelina* è stata rinvenuta nella provincia di Valencia, mentre *C. ampelina* ed *E. lata* in quella di Albacete (Figura 14).

## 5 CONCLUSIONI

Lo studio filogenetico e morfologico delle specie Diatrypaceae condotto durante lo stage a Valencia, sebbene tuttora in corso, ha consentito di accertarne la diversità genetica. La presenza nei vigneti spagnoli di sette diverse specie associate a viti in deperimento, infatti, è una valida conferma. In accordo ad indagini precedenti, *C. ampelina* ed *E. lata* risultano le più frequenti (Arias e Moral, 1981; Armengol *et al.*, 2001; Úrbez-Torres e Peláez, 2001; Péros e Berger, 2003; Santiago *et al.*, 2005; Luque *et al.*, 2006; Martin e Cobos, 2007; Luque *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2009; Muruamendiaraz *et al.*, 2009; Luque *et al.*, 2012; 2014), occasionali *E. citricola* ed *E. microtheca*, segnalate per la prima volta su vite da Luque e collaboratori in Spagna (Luque *et al.*, 2012), mentre, di nuova introduzione sono le tre specie putative. Poiché ad oggi per queste ultime è stato rinvenuto solo lo stadio anamorfo e la valutazione dei caratteri microscopici dei teleomorfi è indispensabile per l'identificazione delle specie Diatrypaceae, non è stato possibile caratterizzarle. L'analisi filogenetica ha rilevato una diversità intraspecifica per *E. lata* non legata probabilmente alla provenienza geografica e già riportata in California (Trouillas e Gubler 2010b). Nel contempo, *Eutypa* sp. 5 e *Eutypa* sp. 6 sono strettamente correlate alle specie *E. tetragona*, *E. leptoplaca* e a quattro isolati del genere *Eutypa*, mentre *Diatrypella* sp. alla specie *D. iranensis*. Relativamente alla distribuzione geografica, nella provincia di Cádiz è stata registrata la maggiore diversità di specie ad eccezione della specie putativa *Diatrypella* sp., presente solo in provincia di Valencia.

Le indagini patogenetiche e metabolomiche svolte nel triennio 2012-15 confermano l'eziologia complessa di *Botryosphaeria dieback* e il ruolo dei metaboliti fungini fitotossici sull'espressione delle manifestazioni macroscopiche della sindrome. L'inoculazione in *planta* e il successivo reisolamento delle specie Botryosphaeriaceae associate a *V. vinifera* nelle aree della Sicilia centro occidentale ne attesta la patogenicità. Tutti gli isolati hanno, infatti, provocato lesioni più o meno estese che si sono sempre differenziate statisticamente ( $P < 0.05$ ) da quelle rinvenute su piante

“controllo”. Tali risultati sono in accordo con quanto rilevato da altri autori per le specie *D. seriata* (van Niekerk *et al.*, 2004; Savocchia *et al.*, 2007; Úrbez-Torres *et al.*, 2008), *L. mediterranea* recentemente identificata in Sardegna (Linaldeddu *et al.*, 2015) e *N. parvum* (Mohammadi *et al.*, 2013; Pitt *et al.*, 2013a; Trovador *et al.*, 2013). Nel contempo è stata rilevata anche una diversa aggressività intraspecifica, variabile in funzione della specie, ad eccezione di *N. vitifusiforme*, ritenuto patogeno debole per la vite in Nord America e Sudafrica (van Niekerk *et al.*, 2004; Úrbez-Torres *et al.*, 2012) ma particolarmente dannoso in oliveti del Sud Italia (Lazzizzera *et al.*, 2008).

Le inoculazioni di un isolato di *D. seriata* direttamente in vigneto, accertato l’attecchimento dell’infezione, hanno consentito di verificare la progressione del patogeno nei tessuti dell’ospite fino a 5 cm dal sito di inoculazione, profondità maggiore rispetto a quella esaminata per *N. luteum*, in piante della cv. Pinot noir di 2 anni di età (Amponsah *et al.*, 2012). La presenza di *D. seriata* rilevata, anche se in misura inferiore, nelle piante trattate con PDA sterile oltre a ritenersi la possibile conseguenza di un’infezione naturale, agevolata dalla ferita di saggio, induce ad ipotizzare per il fungo lo stadio di endofita latente in viti asintomatiche che per lo stress abiotico provocato colonizza l’ospite divenendo patogeno (Smith *et al.*, 1994; Ragazzi *et al.*, 2002; Slippers e Wingfield, 2007). Lo studio metabolomico ha consentito di isolare e caratterizzare nuovi metaboliti secondari fungini e verificarne, unitamente ai metaboliti noti, la tossicità. L’isolato B6 della specie *L. mediterranea* ha fornito due nuovi composti, denominati lasiolattoli A e B in grado di causare aree necrotiche sia su foglie di pomodoro che di vite confermando, nel contempo, la maggiore tossicità dell’acido jasmonico, già rinvenuto nel filtrato colturale di *Botryosphaeria rhodina* l’anamorfo di *L. theobromae* insieme a botriosferiodiplodina e (5R)-5-idrossilasioplodina (Berk. & M.A. Curtis) Arx, (Matsuura *et al.* 1998; Yukimune *et al.* 2000; Rukachaisirikul *et al.*, 2009). Un’analoga attività fitotossica dell’acido jasmonico ha mostrato, recentemente, un altro isolato fungino della stessa specie, proveniente da un vigneto sardo (cv. Cannonau; Andolfi *et al.*, 2014).

Nonostante l'assonanza, sintomi fogliari sono stati rilevati in piante (cv. Inzolia) affette naturalmente da *Botryosphaeria dieback*, soltanto nel 2007 in agro di Marsala (TP). Il mancato rinvenimento del sintomo nello stesso vigneto in anni successivi, similmente all'assenza in quello sardo, potrebbe attribuirsi alle diverse condizioni climatiche regionali, alle variazioni del microclima da una stagione vegetativa all'altra ed in parte, anche, al tipo di cultivar. L'isolato B19 di *N. parvum* sebbene i metaboliti secondari fossero tutti già caratterizzati, è stato il primo in Italia ottenuto da vite a produrre l'isosclerone; inoltre il botriosferone D, rinvenuto nel filtrato colturale di *N. australe* (Xu *et al.*, 2011; Andolfi *et al.*, 2012), diversamente da quanto osservato su foglie della cv. Cannonau dove le aree necrotiche sono comparse solo se impiegato in concentrazione elevata (Andolfi *et al.*, 2014), su foglie di Inzolia ha sempre mostrato un'elevata tossicità, da imputare probabilmente alla maggiore suscettibilità della cultivar. Inoltre, l'esclusiva riduzione della tossicità del botriosferone D nelle foglie esposte alla luce, potrebbe derivare dalla detossificazione del composto operata da intermediari chimici preposti all'immagazzinamento dell'energia luminosa (Wojtaszek, 1997; Mittler, 2002). I suddetti risultati, ancora insufficienti per definire il meccanismo di azione delle tossine sull'espressione dei sintomi, attestano tuttavia il ruolo di possibili fattori di aggressione dei funghi produttori. La parziale similarità del profilo metabolico di alcuni isolati fungini appartenenti anche a specie differenti suggerisce una probabile correlazione fra grado di tossicità del composto, virulenza del patogeno e suscettibilità dell'ospite.

Nel biennio 2014-15, l'interazione di osservazioni epidemiologiche, filogenetiche, morfologiche e patogenetiche hanno consentito di diagnosticare una nuova malattia di *E. japonica*, segnalata per la prima volta in Italia, ed identificare una nuova specie del genere *Diplodia* (*Diplodia* sp. nov.), precedentemente isolata soltanto da piante di *P. coccinea* in Bulgaria (Phillips *et al.*, 2012). La sindrome, denominata "branch cankers of Loquat", è stata rinvenuta inizialmente nella comunità valenciana e in regioni andaluse dove è attribuita a diverse specie *Botryosphaeriaceae*, in maggioranza *D. seriata*

(González-Domínguez *et al.*, 2015). Un'eziologia complessa è stata ugualmente accertata nel nespolo siciliano aggregata anche ad una specificità d'ospite varietale. Sebbene le specie fungine più dannose siano risultate *Diplodia* sp. nov e *D. seriata.*, *N. vitifusiforme*, rinvenuto precedentemente su olivo in Puglia (Lazzizzera *et al.*, 2008) e su vite in Sicilia (Mondello *et al.*, 2013) viene isolato per la prima volta da cancri su nespolo. Allo stato attuale delle indagini è senz'altro prematuro avanzare delle ipotesi sull'origine delle infezioni da Botryosphaeriaceae su nespolo in Italia. Tuttavia, sebbene non si possa escludere a priori una loro introduzione accidentale con materiale vegetale infetto proveniente dalla Spagna, è lecito ipotizzare che i suddetti funghi abbiano trovato condizioni ambientali favorevoli per moltiplicarsi, diffondersi e manifestare appieno la loro aggressività, soprattutto, in seguito ai mutamenti climatici che indeboliscono le piante a scapito anche della naturale resistenza alle avversità abiotiche e biotiche.

La nuova interazione ospite-patogeno osservata sia in Spagna che in Sicilia, un classico esempio di “host jumps” (Slippers *et al.*, 2005), oltre ad evidenziare la rapidità di diffusione delle sindromi di deperimento causate da specie Botryosphaeriaceae ne accentua, ulteriormente, la pericolosità inducendo a considerarle reali “nuove emergenze fitosanitarie”. Attualmente, in varie nazioni, si assiste ad un incremento della frequenza dei casi di “salto di ospite” di molteplici patogeni fungini, dovuto probabilmente sia a tecniche colturali poco razionali che al commercio di materiale di propagazione infetto (Anderson *et al.*, 2004; Brasier, 2008). I rischi connessi a tale fenomeno inducono a riflettere sui probabili esiti negativi di alcune scelte dettate da criteri rivolti, principalmente, all'incremento della produttività delle colture tralasciando gli aspetti fitosanitari, suggerendo la necessità di varare idonee ed urgenti misure di esclusione legislativa che regolamentino il commercio di materiale vegetale.

## TABELLE

**Tabella 1** Isolati di Botryosphaeriaceae spp. utilizzati per i saggi di patogenicità su piante di vite cv. Inzolia.

<b>Specie</b>	<b>Isolato</b>	<b>Vigneto</b>	<b>Cultivar</b>
<i>D. seriata</i>	B13	Alcamo	Merlot
	B14	Alcamo	Merlot
	B22	Marsala	Inzolia
	B23	Marsala	Inzolia
	B24	Marsala	Inzolia
	B27	Marsala	Inzolia
	B29	Salemi	Grillo
	B30	Salemi	Grillo
	<i>L. mediterranea</i>	B4	Marsala
B5		Marsala	Inzolia
B6		Marsala	Inzolia
<i>N. parvum</i>	B2	Marsala	Inzolia
	B3	Marsala	Inzolia
	B7	Marsala	Inzolia
	B19	Marsala	Inzolia
<i>N. vitifusiforme</i>	B8	Montevago	Alicante
	B9	Montevago	Alicante



**Tabella 2.** Lunghezza degli imbrunimenti causati da *D. seriata*, *L. mediterranea*, *N. parvum* e *N. vitifusiforme*, in seguito ad inoculazione artificiale su vite cv. Inzolia.

Specie	Isolato	Lunghezza imbrunimenti	
<i>D. seriata</i>	B 30	3.8 ± 1.3	b*
	B 13	5.5 ± 0.5	bc
	B 23	4.9 ± 0.9	bc
	B 27	5.8 ± 0.8	bcd
	B 29	5.5 ± 0.5	bc
	B 14	7.6 ± 0.6	cde
	B 24	6.5 ± 1.5	bcd
	B 22	15.5 ± 0.5	g
<i>L. mediterranea</i>	B 6	8.0 ± 0.5	cde
	B 4	8.2 ± 1.6	cde
	B 5	12.2 ± 0.7	fg
<i>N. parvum</i>	B 7	5.3 ± 0.8	bc
	B 2	7.0 ± 2.0	bcde
	B 19	9.3 ± 0.8	def
	B 3	10.3 ± 1.1	ef
<i>N. vitifusiforme</i>	B 8	12.0 ± 3.0	fg
	B 9	9.3 ± 1.8	def
Controllo		0.9 ± 0.1	a

\* I valori rappresentano la lunghezza media degli imbrunimenti (cm) di ciascun isolato ± l'errore standard. A lettere uguali corrispondono valori non statisticamente significativi fra loro secondo il test di confronto multiplo LSD di Fischer a  $P \leq 0.05$ .

**Tabella 3.** Frequenza di isolamento media (%) di *D. seriata* dai tralci di vite cv. Chardonnay alle diverse distanze (cm) dal sito di inoculazione.

<b>Distanza</b>	<b>Controllo</b>	<b>Inoculato</b>
0.5	12.3	34.6
2	4.6	16.6
5	1.6	10.6
HSD*	8.9	

\* Test HSD di Tukey a  $P < 0.05$

**Tabella 4.** Confronto tra i coefficienti angolari delle associazioni lineari tra le aree necrotiche e le concentrazioni di ciascun metabolita prodotto da *N. parvum*, esposti sia al buio che alla luce (coefficiente angolare  $\pm$  errore standard).

<b>Metaboliti</b>	<b>Buio</b>	<b>Luce</b>
1	9.1 $\pm$ 0.5	6.0 $\pm$ 0.7
2	4.7 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.1
3	2.7 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1
4	2.1 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1
HSD*	1.6	

\* Test HSD di Tukey a  $P < 0.05$

**Tabella 5.** Dimensioni minime-(medie)-massime dei conidi ( $\mu\text{m}$ ) e temperature di crescita minime, massime e ottimali ( $^{\circ}\text{C}$ ) di *Diplodia* sp., *D. seriata*, *N.parvum* e *N. vitifusiforme* isolati da *E. japonica*.

Specie	Dimensione dei conidi		Temperature di crescita		
	Lunghezza	Larghezza	Min	Max	Optimum
<i>Diplodia</i> sp.	19.9-(23.7)-27.3	8.7-(10.7)-12.8	5	35	25.6
<i>D. seriata</i>	16.5-(20.9)-26.1	6.3-(11.1)-14.0	5	35	25.6
<i>N.parvum</i>	8.8-(11.2)-14.3	4.1-(5.4)-6.9	5	35	26.4
<i>N. vitifusiforme</i>	14.1-(18.1)-21.0	3.8-(5.8)-7.7	10	40	27.0

**Tabella 6.** Isolati appartenenti a *Diplodia* sp. nov, *D. seriata*, *N.parvum* e *N. vitifusiforme* isolati in questo studio da *E. japonica* e isolati di riferimento usati per l'analisi filogenetica.

Specie	Isolato	Ospite	Origine	GenBank accession no.	
				ITS	EF1- $\alpha$
<i>Diplodia africana</i>	CBS 120835	<i>Prunus persica</i>	Paarl, Western Cape, Sud Africa	EF445343	EF445382
<i>D. africana</i>	CBS 121104	<i>Prunus persica</i>	Paarl, Western Cape, Sud Africa	EF445344	EF445383
<i>D. agrifolia</i>	UCROK 1429	<i>Quercus agrifolia</i>	San Diego Co., California	JQ411412	JQ512121
<i>D. agrifolia</i>	UCROK 732	<i>Quercus agrifolia</i>	San Diego Co., California	JX693507	JQ517317
<i>D. alatafructa</i>	CBS 124931	<i>Pterocarpus angolensis</i>	Sudwala Caves area, Sud Africa	FJ888460	FJ888444
<i>D. alatafructa</i>	CBS 124933	<i>Pterocarpus angolensis</i>	Buffelsko Reserve, Sud Africa	FJ888478	FJ888446
<i>D. allocellula</i>	CMW 36468	<i>Acacia karroo</i>	Pretoria, Sud Africa	JQ239397	JQ239384
<i>D. allocellula</i>	CMW 36470	<i>Acacia karroo</i>	Pretoria, Sud Africa	JQ239399	JQ239386
<i>D. bulgarica</i>	CBS 124135	<i>Malus sylvestris</i>	Plovdiv, Bulgaria	GQ923852	GQ923820
<i>D. bulgarica</i>	CBS 124254	<i>Malus sylvestris</i>	Plovdiv, Bulgaria	GQ923853	GQ923821
<i>D. corticola</i>	CBS 112547	<i>Quercus ilex</i>	La Rozuela, Córdoba, Spagna	AY259110	DQ458872
<i>D. corticola</i>	CBS 112549	<i>Quercus suber</i>	Requeixo, Aveiro, Portogallo	AY259100	AY573227
<i>D. cupressi</i>	CBS 168.87	<i>Cupressus sempervirens</i>	Bet Dagan, Israele	DQ458893	DQ458878
<i>D. cupressi</i>	CBS 261.85	<i>Cupressus sempervirens</i>	Bet Dagan, Israele	DQ458894	DQ458879
<i>D. intermedia</i>	CBS 124134	<i>Cydonia</i> sp.	Torres Vedras, Portogallo	HM036528	GQ923851
<i>D. intermedia</i>	CBS 124462	<i>Malus sylvestris</i>	Setúbal, Portogallo	GQ923858	GQ923826
<i>D. malorum</i>	CBS 112554	<i>Malus sylvestris</i>	Setúbal, Portogallo	AY259095	DQ458870
<i>D. malorum</i>	CBS 124130	<i>Malus sylvestris</i>	Setúbal, Portogallo	GQ923865	GQ923833
<i>D. mutila</i>	CBS 112553	<i>Vitis vinifera</i>	Montemor-o-Novo, Portogallo	AY259093	AY573219
<i>D. mutila</i>	CBS 230.30	<i>Phoenix dactylifera</i>	California	DQ458886	DQ458869
<i>D. neojuniperi</i>	CPC 22753	<i>Juniperus chinensis</i>	Chiang Mai, Thailandia	KM006431	KM006462
<i>D. neojuniperi</i>	CPC 22754	<i>Juniperus chinensis</i>	Chiang Mai, Thailandia	KM006432	KM006463
<i>D. olivarum</i>	CAP 301	<i>Ceratonia siliqua</i>	Sicilia, Italia	GQ923873	GQ923841
<i>D. olivarum</i>	CBS 121887	<i>Olea europaea</i>	Lecce, Puglia, Italia	EU392302	EU392279
<i>D. pinea</i>	CBS 109725	<i>Pinus patula</i>	Habinsaran, Indonesia	DQ458896	DQ458881
<i>D. pinea</i>	CBS 393.84	<i>Pinus nigra</i>	Putten, Olanda	DQ458895	DQ458880
<i>D. pseudoseriata</i>	CBS 124906	<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	Uruguay	EU080927	EU863181

<i>D. pseudoseriata</i>	CBS 124907	<i>Hexachlamis edulis</i>	Uruguay	EU080922	EU863179
<i>D. quercivora</i>	CBS 133853	<i>Quercus canariensis</i>	Tabarka, Tunisia	JX894205	JX894229
<i>D. quercivora</i>	CBS 133852	<i>Quercus canariensis</i>	Tabarka, Tunisia	JX894206	JX894230
<i>Diplodia</i> sp.	CAP 330	<i>Pyracantha coccinea</i>	Plovdiv, Bulgaria	GQ923881	GQ923849
<b><i>Diplodia</i> sp. 1 *</b>	<b>NB7</b>	<b><i>Eriobotrya japonica</i></b>	<b>Palermo, Sicilia, Italia</b>	KT956270	KU378605
<b><i>Diplodia</i> sp. 2</b>	<b>NB8</b>	<b><i>Eriobotrya japonica</i></b>	<b>Palermo, Sicilia, Italia</b>	KT956271	KU378606
<b><i>Diplodia</i> sp. 3</b>	<b>NB9</b>	<b><i>Eriobotrya japonica</i></b>	<b>Palermo, Sicilia, Italia</b>	KT956272	KU378607
<b><i>Diplodia</i> sp. 4</b>	<b>NB10</b>	<b><i>Eriobotrya japonica</i></b>	<b>Palermo, Sicilia, Italia</b>	KT956273	KU378608
<i>D. rosulata</i>	CBS 116470	<i>Prunus africana</i>	Gambo, Etiopia	EU430265	EU430267
<i>D. rosulata</i>	CBS 116472	<i>Prunus africana</i>	Gambo, Etiopia	EU430266	EU430268
<i>D. scrobiculata</i>	CBS 109944	<i>Pinus greggii</i>	Messico	DQ458899	DQ458884
<i>D. scrobiculata</i>	CBS 113423	<i>Pinus greggii</i>	Messico	DQ458900	DQ458885
<i>D. scrobiculata</i>	CMW 189	<i>Pinus banksiana</i>	USA	AY253292	AY624253
<i>D. seriata</i>	CAP 148	<i>Vitis vinifera</i>	Italia	DQ458889	DQ458874
<i>D. seriata</i>	CBS 112555	<i>Vitis vinifera</i>	Montemor-o-Novo, Portogallo	AY259093	AY573219
<b><i>D. seriata</i></b>	<b>NB4</b>	<b><i>Eriobotrya japonica</i></b>	<b>Palermo, Sicilia, Italia</b>	KT956267	KU310680
<i>D. tsugae</i>	CBS 418.64	<i>Tsuga heterophylla</i>	British Columbia, Canada	DQ458888	DQ458873
<b><i>Neofusicoccum parvum</i></b>	<b>NB5</b>	<b><i>Eriobotrya japonica</i></b>	<b>Palermo, Sicilia, Italia</b>	KT956268	KU310681
<b><i>N. parvum</i></b>	<b>NB6</b>	<b><i>Eriobotrya japonica</i></b>	<b>Palermo, Sicilia, Italia</b>	KT956269	KU310682
<b><i>N. vitifusiforme</i></b>	<b>NB1</b>	<b><i>Eriobotrya japonica</i></b>	<b>Palermo, Sicilia, Italia</b>	KT956264	KU310677
<b><i>N. vitifusiforme</i></b>	<b>NB2</b>	<b><i>Eriobotrya japonica</i></b>	<b>Palermo, Sicilia, Italia</b>	KT956265	KU310678
<b><i>N. vitifusiforme</i></b>	<b>NB3</b>	<b><i>Eriobotrya japonica</i></b>	<b>Palermo, Sicilia, Italia</b>	KT956266	KU310679

\* Sono riportati in grassetto tutti gli isolati ottenuto in questo studio da *E. japonica*.

**Tabella 7.** Isolati appartenenti a *C. ampelina*, *Diatrypella* sp., *Eutypa* sp. 5, *Eutypa* sp. 6, *E. citricola*, *E. lata*, *E. microtheca* caratterizzati in questo studio e isolati di riferimento usati per l'analisi filogenetica.

Species	Isolate	Host	Origin	Collector	GenBank accession no.	
					ITS	BT
<i>Cryptovalsa ampelina</i> **	<b>JL413</b>	<i>Vitis vinifera</i>	<b>Tarragona, Spain</b>	<b>J. Luque</b>	<b>JN975335</b>	<b>JN975371</b>
<i>C. ampelina</i>	DT-5	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851344	KM851409
<i>C. ampelina</i>	DT-6	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851347	KM851418
<i>C. ampelina</i>	DT-10	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851317	KM851389
<i>C. ampelina</i>	DT-11	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851339	KM851393
<i>C. ampelina</i>	DT-12	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851332	KM851394
<i>C. ampelina</i>	DT-13	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851320	KM851395
<i>C. ampelina</i>	DT-17	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851318	KM851396
<i>C. ampelina</i>	DT-18	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851356	KM851397
<i>C. ampelina</i>	DT-20	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851357	KM851398
<i>C. ampelina</i>	DT-21	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851348	KM851399
<i>C. ampelina</i>	DT-22	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851341	KM851400
<i>C. ampelina</i>	DT-23	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851331	KM851401
<i>C. ampelina</i>	DT-26	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851340	KM851402
<i>C. ampelina</i>	DT-29	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851350	KM851403
<i>C. ampelina</i>	DT-30	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851342	KM851404
<i>C. ampelina</i>	DT-31	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851333	KM851405
<i>C. ampelina</i>	DT-35	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851322	KM851406
<i>C. ampelina</i>	DT-47	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851334	KM851407
<i>C. ampelina</i>	DT-49	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851358	KM851408
<i>C. ampelina</i>	DT-50	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851343	KM851410
<i>C. ampelina</i>	DT-51	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851330	KM851411
<i>C. ampelina</i>	DT-52	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851335	KM851412
<i>C. ampelina</i>	DT-54	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851329	KM851413
<i>C. ampelina</i>	DT-55	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851359	KM851414
<i>C. ampelina</i>	DT-56	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851360	KM851415
<i>C. ampelina</i>	DT-58	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851345	KM851416
<i>C. ampelina</i>	DT-59	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851328	KM851417

<i>C. ampelina</i>	DT-60	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851336	KM851419
<i>C. ampelina</i>	DT-61	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851337	KM851420
<i>C. ampelina</i>	DT-62	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851319	KM851421
<i>C. ampelina</i>	DT-63	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851361	KM851422
<i>C. ampelina</i>	DT-64	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851349	KM851423
<i>C. ampelina</i>	DT-65	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851323	KM851424
<i>C. ampelina</i>	DT-66	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851321	KM851425
<i>C. ampelina</i>	DT-67	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851325	KM851426
<i>C. ampelina</i>	DT-68	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851354	KM851427
<i>C. ampelina</i>	DT-75	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851338	KM851428
<i>C. ampelina</i>	DT-76	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851326	KM851429
<i>C. ampelina</i>	DT-77	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851324	KM851430
<i>C. ampelina</i>	DT-79	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851355	KM851431
<i>C. ampelina</i>	DT-93	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851346	KM851432
<i>C. ampelina</i>	DT-94	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851327	KM851433
<i>C. ampelina</i>	DT-100	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851351	KM851390
<i>C. ampelina</i>	DT-101	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851353	KM851391
<i>C. ampelina</i>	DT-102	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851352	KM851392
<i>Diatrype stigma</i>	<b>CA075</b>	<i>Vitis vinifera</i>	<b>Napa, California</b>	<b>F. P. Trouillas</b>	<b>GQ293946</b>	<b>GQ294004</b>
<i>Diatrypella iranensis</i>	<b>KDQ18</b>	<i>Quercus brantii</i>	<b>Sisakht, Iran</b>	<b>M. Mehrabi</b>	<b>KM245033</b>	<b>n/d*</b>
<i>Diatrypella</i> sp.	DT-7	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851381	KM851453
<i>Diatrypella</i> sp.	DT-9	<i>Vitis vinifera</i>	Valencia, Spain	J. Armengol	KM851382	KM851454
<i>Eutypa lata</i>	<b>UCD795St</b>	<i>Vitis vinifera</i>	<b>Stanislauss, California</b>	<b>J. R. Úrbez-Torres</b>	<b>HM167410</b>	<b>HM164744</b>
<i>E. lata</i>	<b>DCA900</b>	<i>Vitis vinifera</i>	<b>Sonoma, California</b>	<b>F. P. Trouillas</b>	<b>GQ293948</b>	<b>GQ294007</b>
<i>E. lata</i>	<b>UCREL38</b>	<i>Vitis vinifera</i>	<b>California</b>	<b>P. E. Rolshausen</b>	<b>KF453559</b>	<b>KF453530</b>
<i>E. lata</i>	<b>JL479</b>	<i>Vitis vinifera</i>	<b>Tarragona, Spain</b>	<b>J. Luque</b>	<b>JN975344</b>	<b>JN975381</b>
<i>E. lata</i>	<b>JL407</b>	<i>Vitis vinifera</i>	<b>Barcelona, Spain</b>	<b>J. Luque</b>	<b>JN975340</b>	<b>JN975377</b>
<i>E. lata</i>	<b>JL399</b>	<i>Vitis vinifera</i>	<b>Barcellona, Spain</b>	<b>J. Luque</b>	<b>JN975339</b>	<b>JN975376</b>
<i>E. lata</i>	<b>JL731</b>	<i>Vitis vinifera</i>	<b>Burgos, Spain</b>	<b>J. Luque</b>	<b>JN975353</b>	<b>JN975390</b>
<i>E. lata</i>	DT-4	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851379	KM851441
<i>E. lata</i>	DT-40	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851380	KM851442
<i>E. lata</i>	DT-83	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851378	KM851443
<i>E. lata</i>	DT-84	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851377	KM851444
<i>E. lata</i>	DT-85	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851376	KM851445

<i>E. lata</i>	DT-86	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851375	KM851446
<i>E. lata</i>	DT-88	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851372	KM851447
<i>E. lata</i>	DT-90	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851374	KM851448
<i>E. lata</i>	DT-91	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851371	KM851449
<i>E. lata</i>	DT-92	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851370	KM851450
<i>E. lata</i>	DT-95	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851373	KM851451
<i>E. lata</i>	DT-97	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851369	KM851452
<i>E. lata</i>	DT-103	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851368	KM851439
<i>E. lata</i>	DT-104	<i>Vitis vinifera</i>	Albacete, Spain	J. Armengol	KM851367	KM851440
<b><i>E. leptoplaca</i></b>	<b>CBS 287.87</b>	<b><i>Frangula alnus</i></b>	<b>Vaud, Switzerland</b>	<b>F. Rappaz</b>	<b>DQ006924</b>	<b>DQ006961</b>
<b><i>Eutypa</i> sp.1</b>	<b>JL488</b>	<b><i>Vitis vinifera</i></b>	<b>Tarragona, Spain</b>	<b>J. Luque</b>	<b>JN975360</b>	<b>JN975397</b>
<b><i>Eutypa</i> sp.2</b>	<b>JL690</b>	<b><i>Vitis vinifera</i></b>	<b>Huesca, Spain</b>	<b>J. Luque</b>	<b>JN975362</b>	<b>JN975399</b>
<b><i>Eutypa</i> sp.3</b>	<b>JL688</b>	<b><i>Vitis vinifera</i></b>	<b>Huesca, Spain</b>	<b>J. Luque</b>	<b>JN975361</b>	<b>JN975398</b>
<b><i>Eutypa</i> sp.4</b>	<b>JL742</b>	<b><i>Vitis vinifera</i></b>	<b>Albacete, Spain</b>	<b>J. Luque</b>	<b>JN975363</b>	<b>JN975400</b>
<i>Eutypa</i> sp.5	DT-3	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851384	KM851456
<i>Eutypa</i> sp.6	DT-43	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851385	KM851457
<i>Eutypa</i> sp.6	DT-44	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851386	KM851458
<i>Eutypa</i> sp.6	DT-45	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851387	KM851459
<i>Eutypa</i> sp.6	DT-46	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851388	KM851460
<b><i>E. tetragona</i></b>	<b>190802-3</b>	<b><i>Laburnum alpinum</i></b>	<b>Vaud, Switzerland</b>	<b>F. Rappaz</b>	<b>AY684223</b>	<b>AY684202</b>
<b><i>E. tetragona</i></b>	<b>CBS 284.87</b>	<b><i>Sarothamnus scoparium</i></b>	<b>Alpes-Maritimes, France</b>	<b>F. Rappaz</b>	<b>DQ006923</b>	<b>DQ006960</b>
<b><i>Eutypella citricola</i></b>	<b>JL583</b>	<b><i>Vitis vinifera</i></b>	<b>Barcelona, Spain</b>	<b>J. Luque</b>	<b>JN975364</b>	<b>JN975401</b>
<i>E. citricola</i>	DT-1	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851362	KM851434
<i>E. citricola</i>	DT-2	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851363	KM851435
<b><i>E. microtheca</i></b>	<b>JL609</b>	<b><i>Vitis vinifera</i></b>	<b>Girona, Spain</b>	<b>J. Luque</b>	<b>JN975366</b>	<b>JN975403</b>
<i>E. microtheca</i>	DT-36	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851364	KM851436
<i>E. microtheca</i>	DT-37	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851365	KM851437
<i>E. microtheca</i>	DT-38	<i>Vitis vinifera</i>	Cádiz, Spain	J. Armengol	KM851366	KM851438
<b><i>E. scoparia</i></b>	<b>DFMAL100</b>	<b><i>Robinia pseudoacacia</i></b>	<b>Adèche, France</b>	<b>F. P. Trouillas</b>	<b>GQ293962</b>	<b>GQ294029</b>
<b><i>E. vitis</i></b>	<b>MI-9-24-3</b>	<b><i>Vitis labrusca</i></b>	<b>Lawton, Michigan</b>	<b>n/d</b>	<b>AY462577</b>	<b>n/d</b>
<b><i>E. vitis</i></b>	<b>MI-2</b>	<b><i>Vitis labrusca</i></b>	<b>Lawton, Michigan</b>	<b>n/d</b>	<b>AY462565</b>	<b>n/d</b>

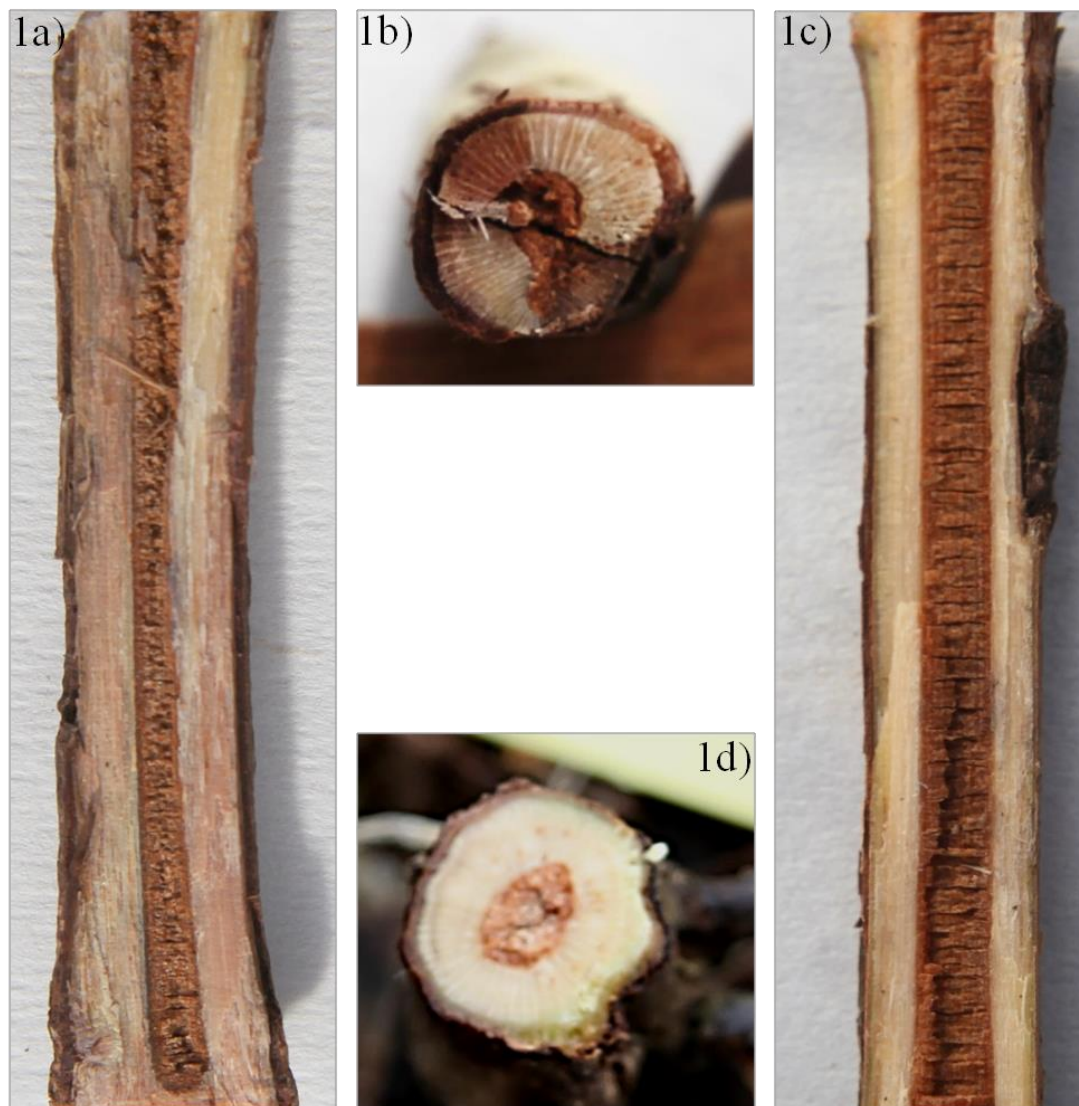
\* n/d non disponibile; \*\* Sono riportati in grassetto tutti gli isolati di riferimento usati per l'analisi filogenetica



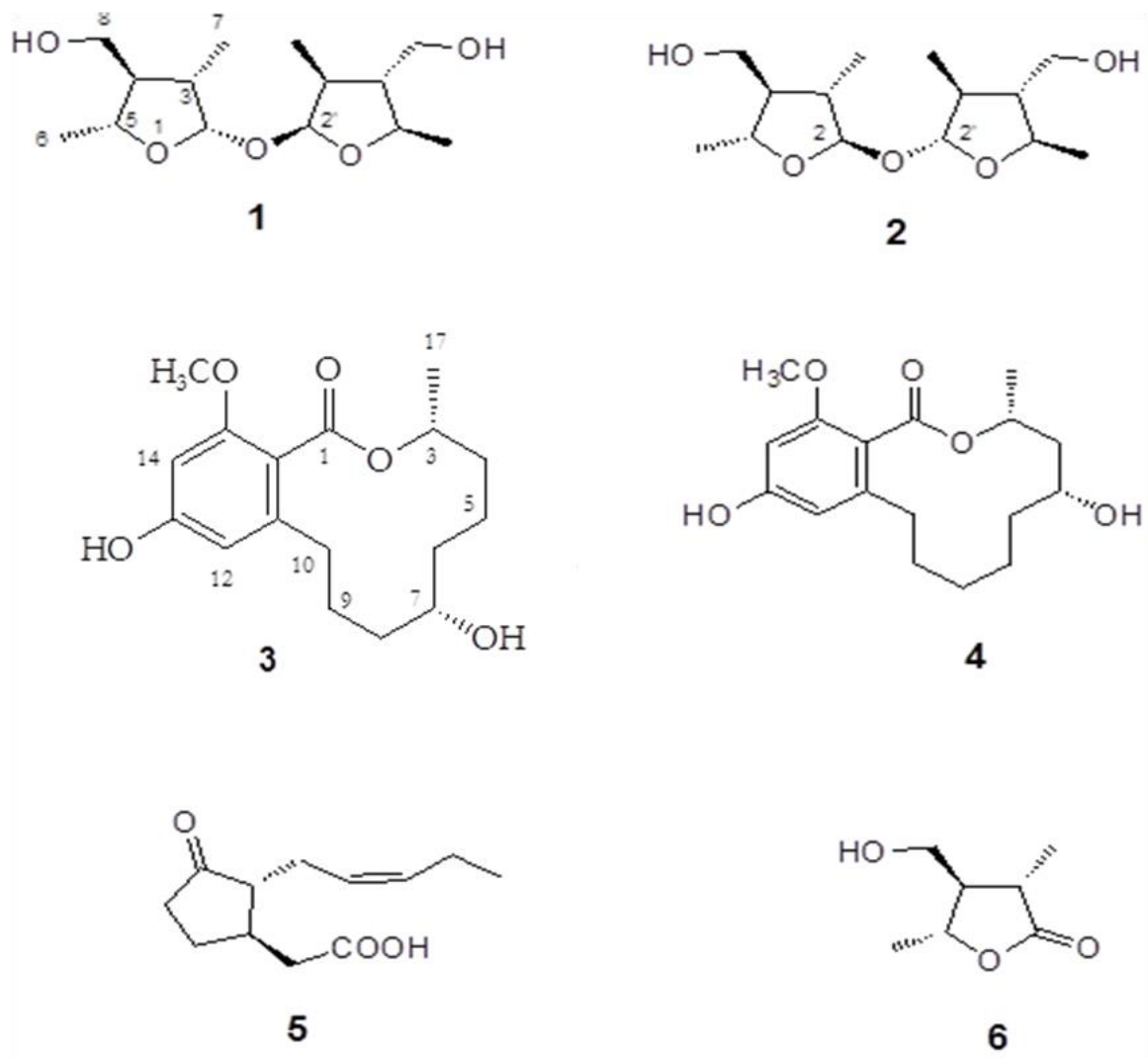
**Tabella 8.** Temperature di crescita minime, massime e ottimali (°C) di *Diatrypaceae* spp.

Specie	Temperature (°C)		
	Min	Max	Optimum
<i>Cryptovalsa ampelina</i>	10	30	26.3
<i>Eutypa</i> sp.5	5	30	22.7
<i>Eutypa</i> sp.6	5	30	25.1
<i>Diatrypella</i> sp.	5	30	25.4
<i>Eutypa lata</i>	5	30	24.1
<i>Eutypella citricola</i>	10	30	26.1
<i>Eutypella microtheca</i>	15	35	29.5

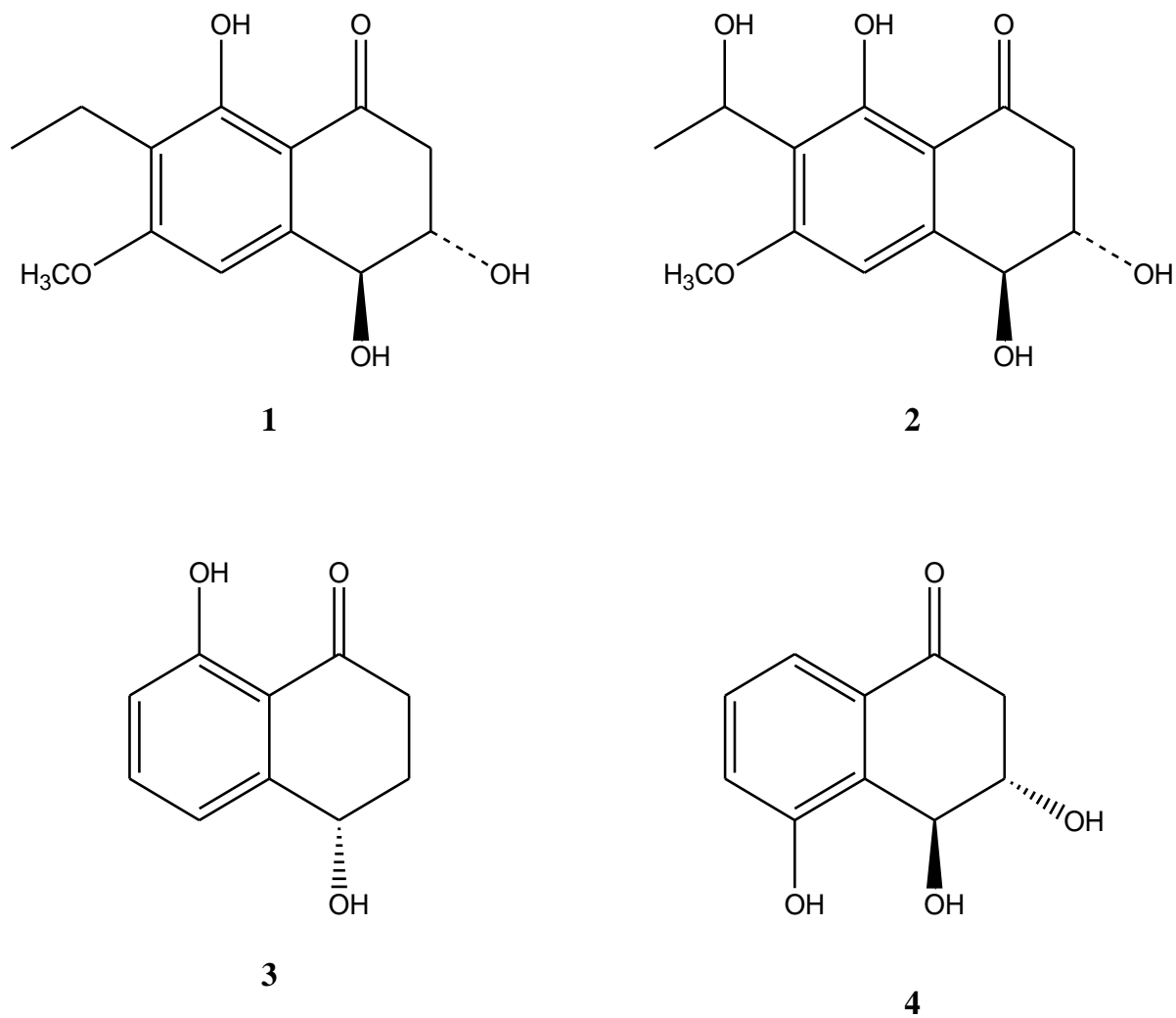
## FIGURE



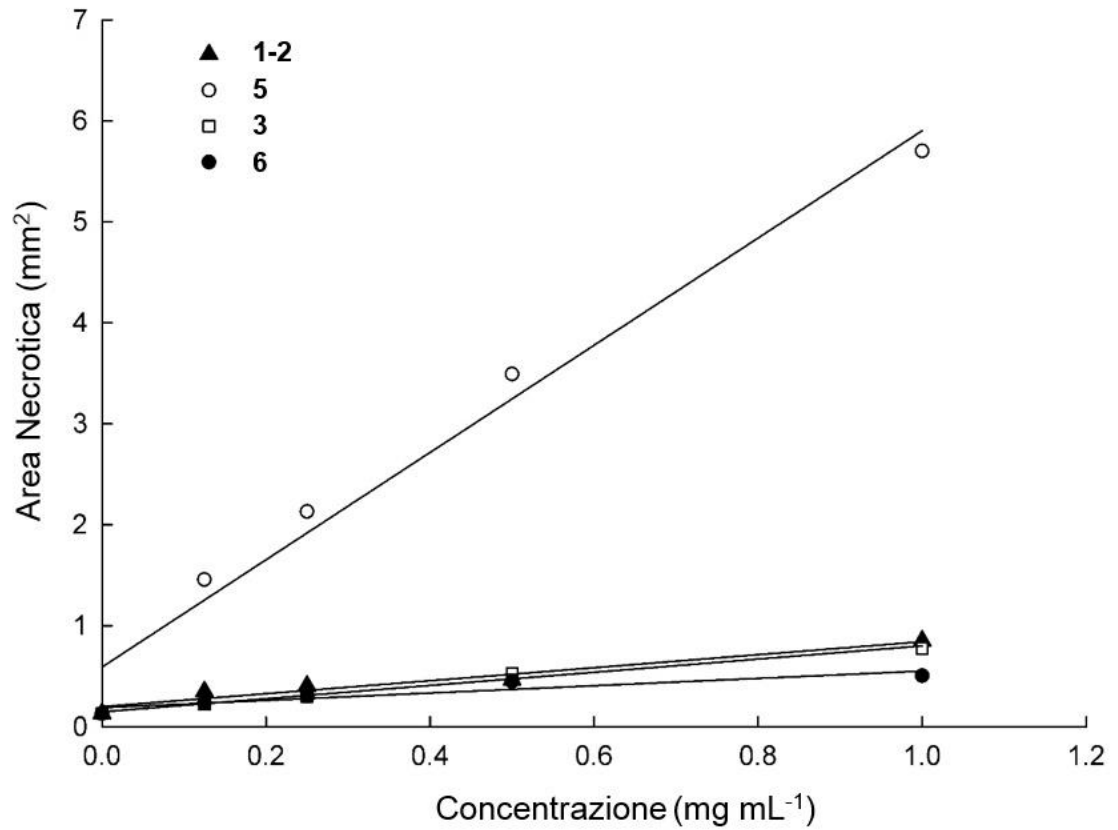
**Figura 1.** Esempio di imbrunimenti sottocorticali causati da *Botryosphaeriaceae* spp. in piante di *V. vinifera* cv. Inzolia, sei mesi dopo l'inoculazione artificiale, visibile sia in sezione longitudinale (1a) che trasversale (1b). Assenza di sintomi nel controllo in sezione longitudinale con formazione del callo cicatriziale in prossimità della ferita (1c) e in sezione trasversale (1d).



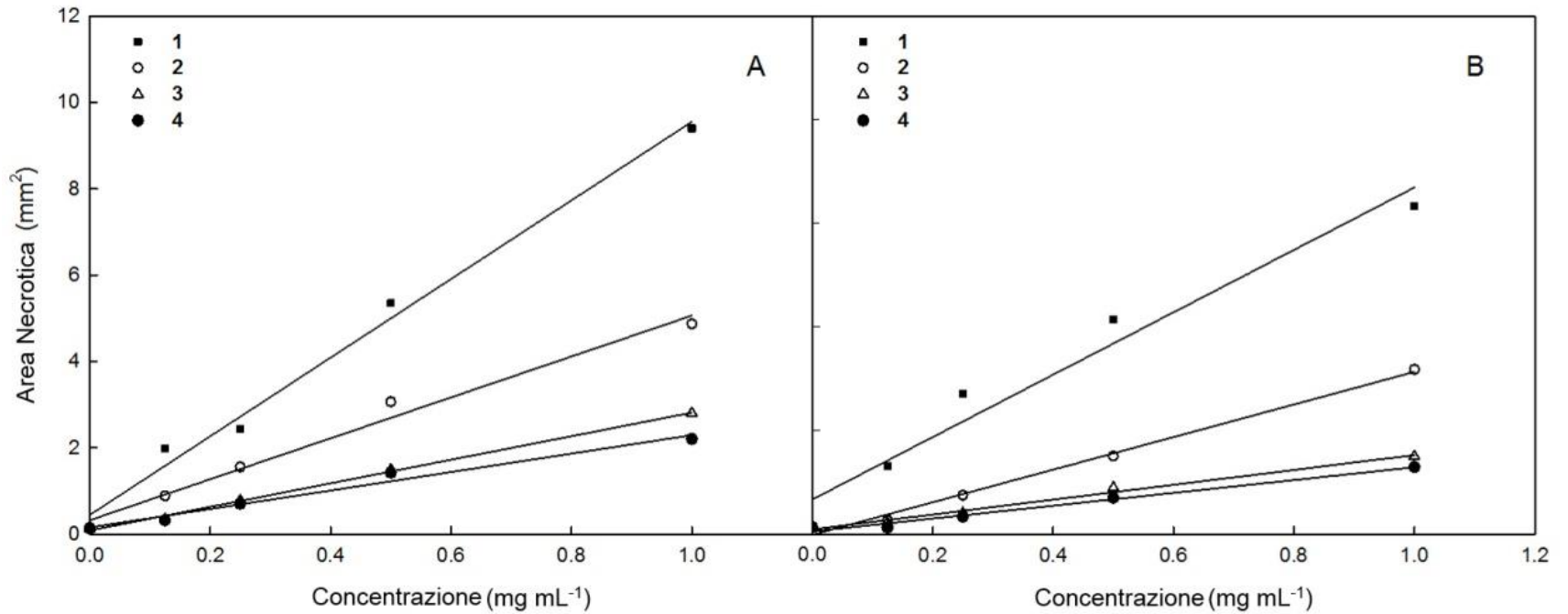
**Figura 2.** Strutture dei metaboliti prodotti da *L. mediterranea*: lasiolattoli A e B (1-2), botriosferiodiplodina (3), (5R)-5-idrossilasioplodina (4), (-)-acido jasmonico (5) e 4-idrossimetil- 3,5-dimetildiidro-2-furanone (6).



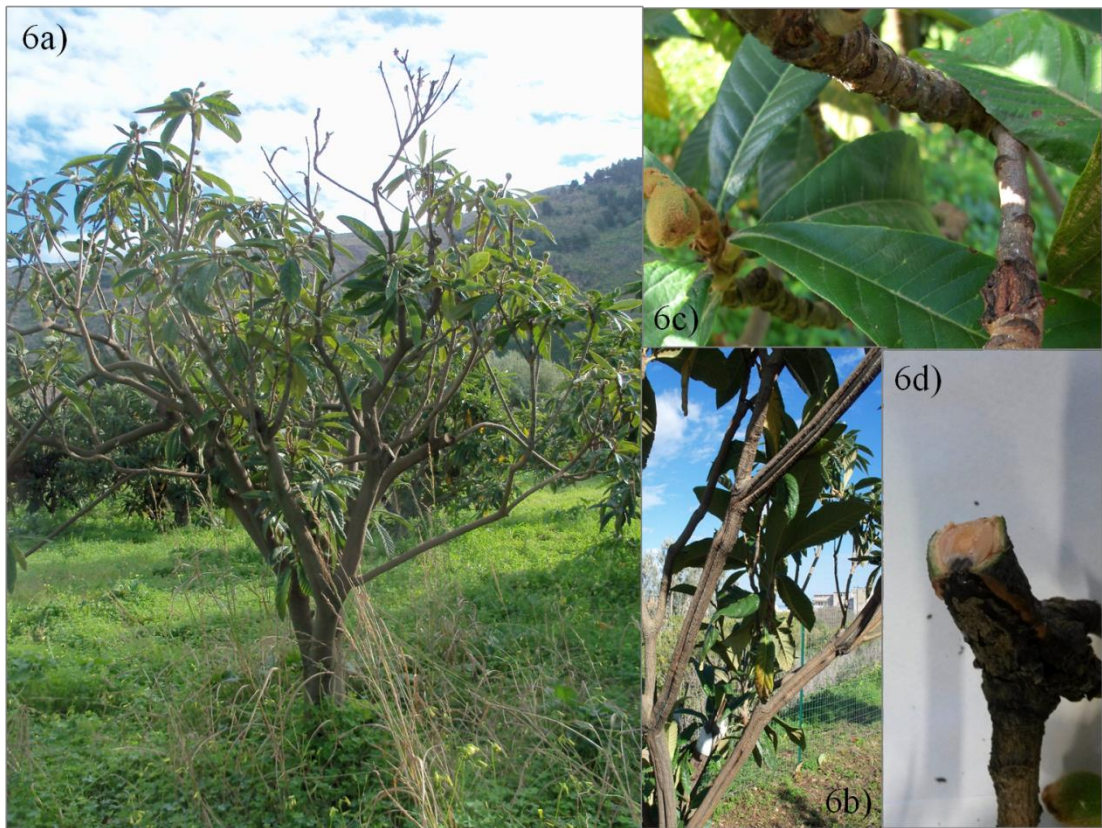
**Figura 3.** Strutture dei metaboliti prodotti da *N. parvum*: botriosferone D e A (1 e 2), isosclerone (3) e 3,4,5-triidrossi-1-tetralone (4).



**Figura 4.** Associazioni lineari tra le aree necrotiche (AN) e le concentrazioni (Conc) di ciascun metabolitaprodotto da *L. mediterranea*. **1-2:**  $AN = 0.198 + 0.644Conc$   $R^2 = 0.947$   $P < 0.05$ ; **5:**  $AN = 0.590 + 5.312Conc$   $R^2 = 0.978$   $P < 0.05$ ; **3:**  $AN = 0.147 + 0.653Conc$   $R^2 = 0.985$   $P < 0.05$ ; **6:**  $AN = 0.189 + 0.362Conc$   $R^2 = 0.8709$   $P < 0.05$ .

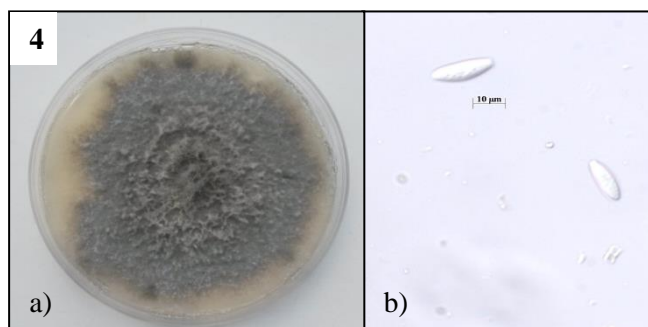
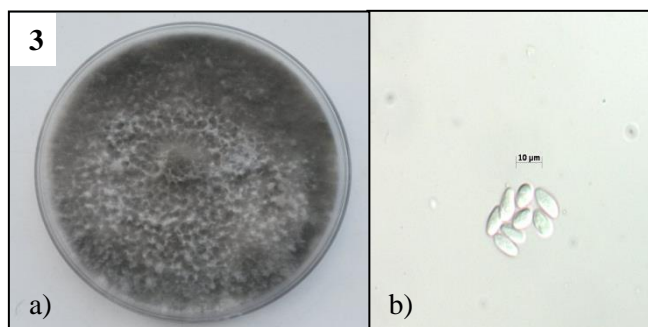
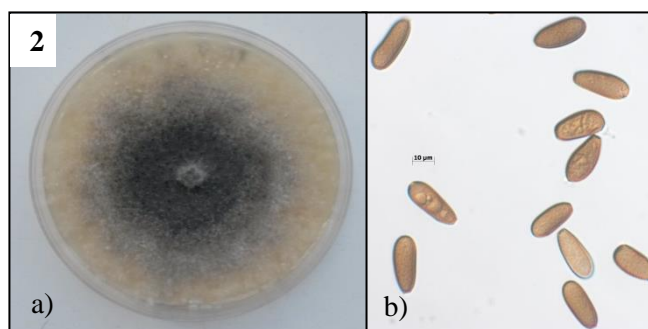
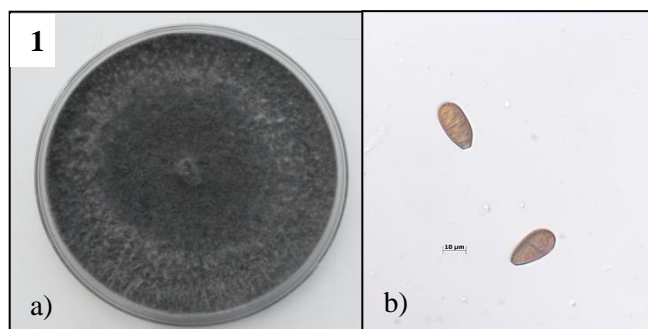


**Figura 5.** Associazioni lineari tra le aree necrotiche (AN) e le concentrazioni (Conc) di ciascun metabolita prodotto da *N. parvum*, in condizioni di buio (A) e di luce (B). Buio: **1**,  $AN = 0.44 + 9.11conc$   $R^2 = 0.99$   $P < 0.05$ ; for **2**,  $AN = 0.32 + 4.74conc$   $R^2 = 0.99$   $P < 0.05$ ; for **3**,  $AN = 0.08 + 2.73conc$   $R^2 = 0.99$   $P < 0.05$ ; for **4**,  $AN = 0.15 + 2.13conc$   $R^2 = 0.98$   $P < 0.05$ . Luce: **1**,  $AN = 0.67 + 6.03conc$   $R^2 = 0.96$   $P < 0.05$ ; for **2**,  $AN = -0.01 + 3.15conc$   $R^2 = 0.99$   $P < 0.05$ ; for **3**,  $AN = 0.09 + 1.43conc$   $R^2 = 0.99$   $P < 0.05$ ; for **4**,  $AN = 0.05 + 1.24conc$   $R^2 = 0.99$   $P < 0.05$ .



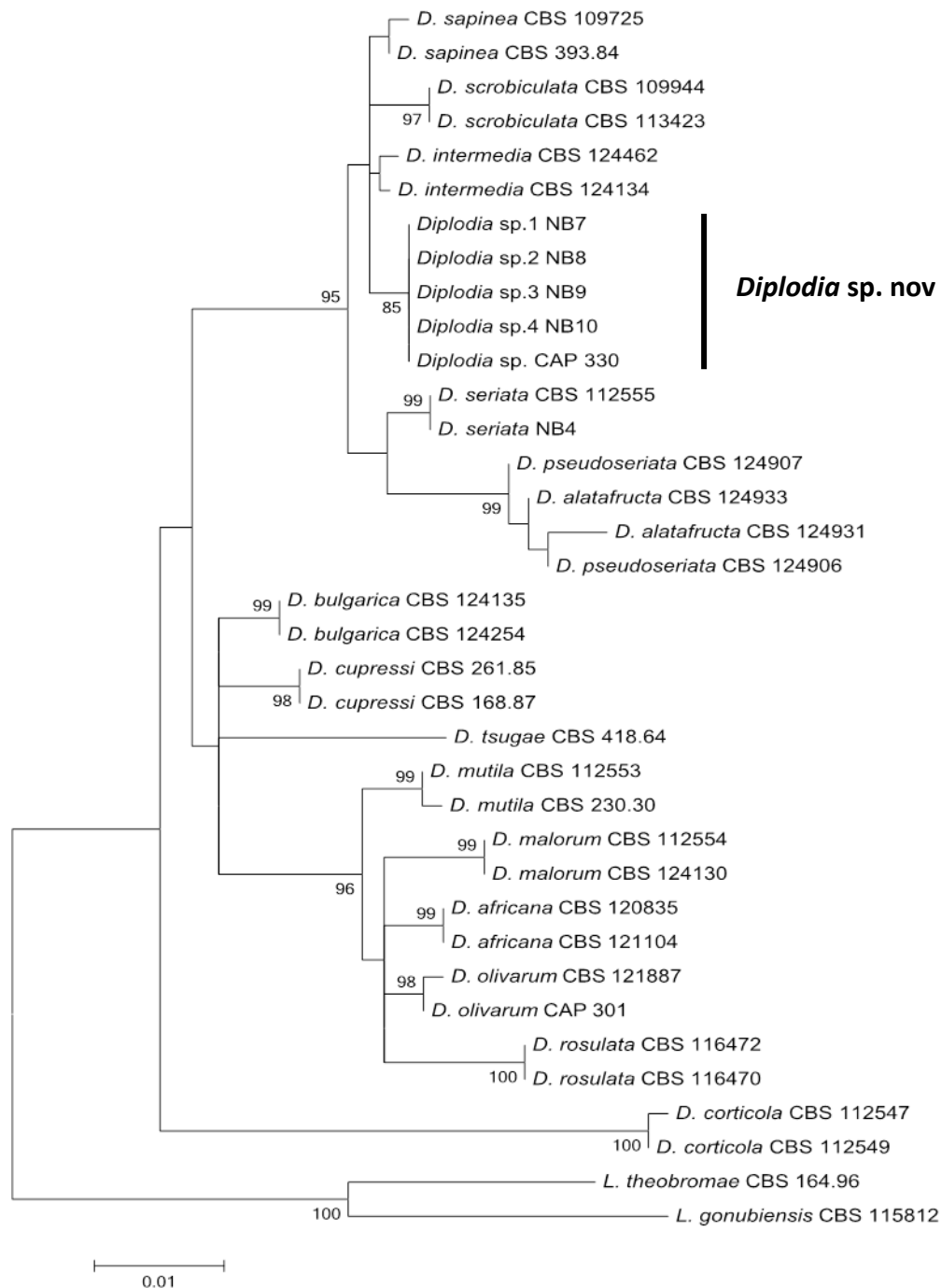
**Figura 6.** Sintomi osservati su *E. japonica* cv. Algerie e Bueno: piante deperienti (6a); cancri sul fusto (6b) e sui rami (6c); aree necrotiche in sezione trasversale (6d).



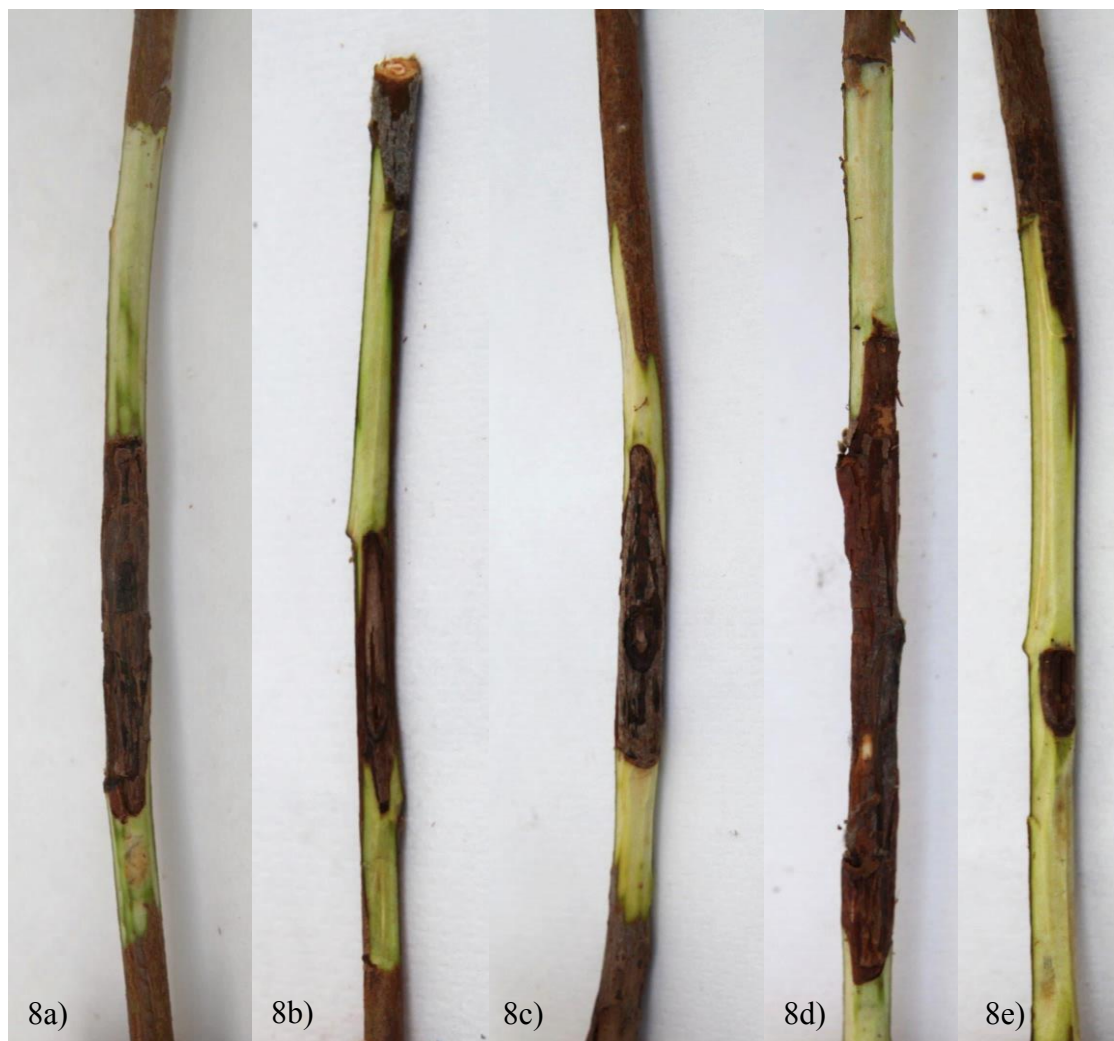


**Figura 7.** Aspetto delle colonie cresciute su PDA dopo 7 gg di incubazione a 25°C al buio (a) e morfologia dei conidi (b) delle specie: *D. seriata* (1), *Diplodia* sp. (2), *N. parvum* (3) e *N. vitifusiforme* (4).

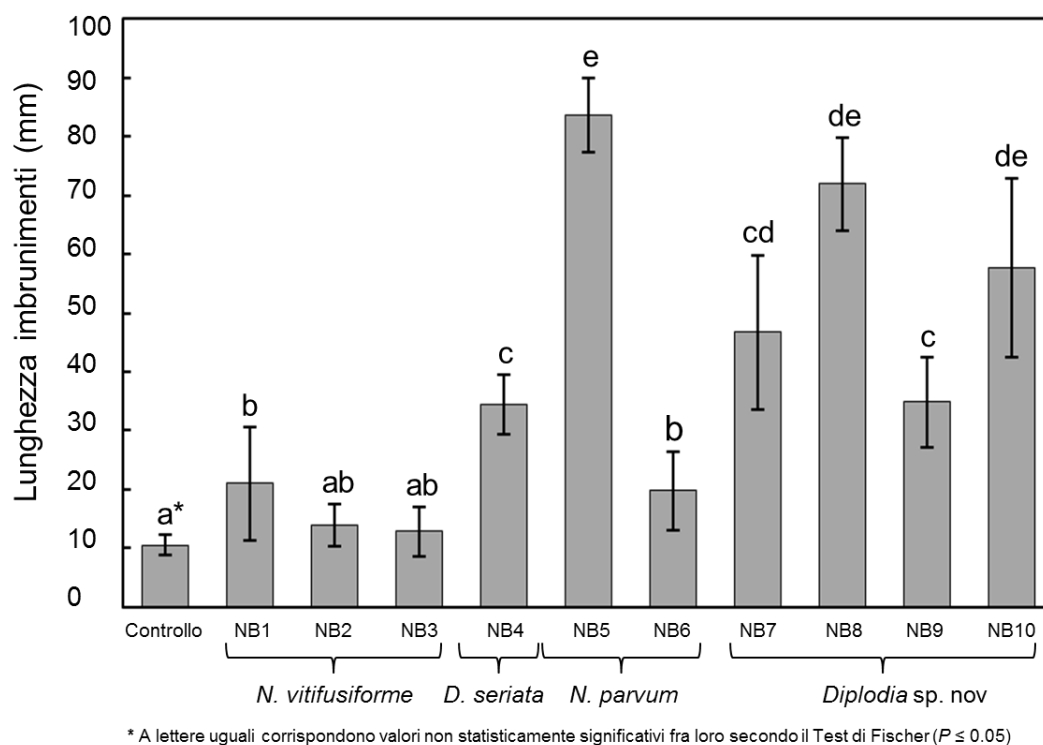




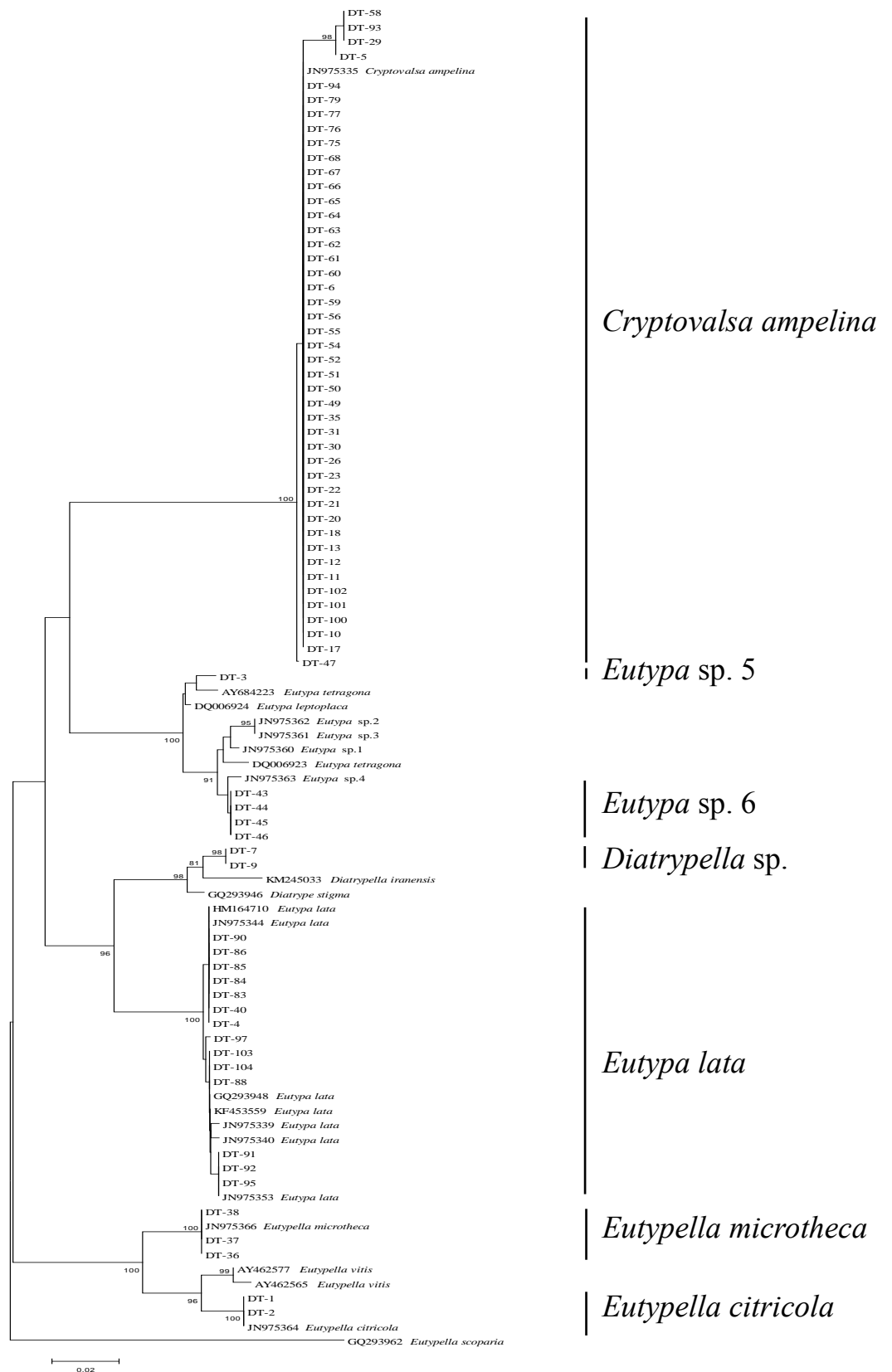
**Figura 8.** Analisi filogenetica di *Diplodia* spp. basata sulle sequenze ITS e EF1- $\alpha$ . I valori di bootstrap sono riportati in corrispondenza dei nodi. Le sequenze ottenute da GenBank sono indicate dal loro numero CBS, mentre gli isolati ottenuti in questo studio dal codice dell'isolato.



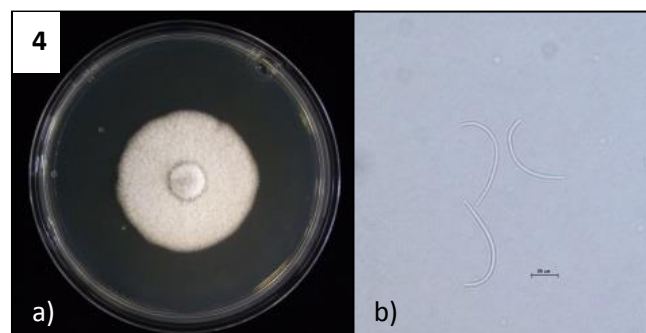
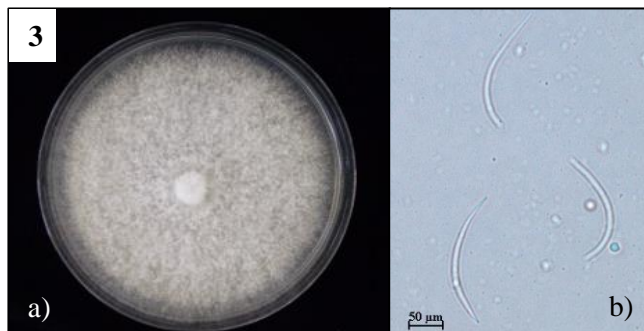
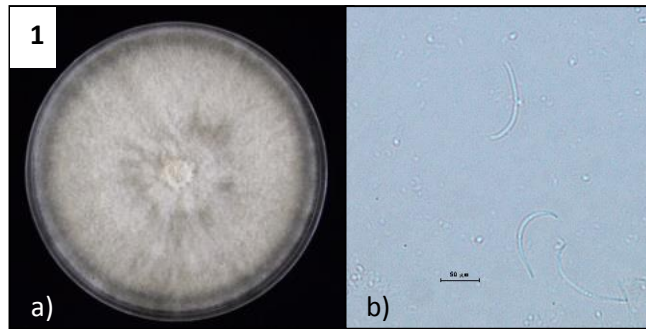
**Figura 9.** Lesioni corticali causate da *Diplodia* sp. nov (8a), *N. vitifusiforme* (8b), *D. seriata* (8c), *N. parvum* (8d) e dal controllo (8e) in piante di *E. japonica* cv. San Filipparo, sei mesi dopo l'inoculazione artificiale.



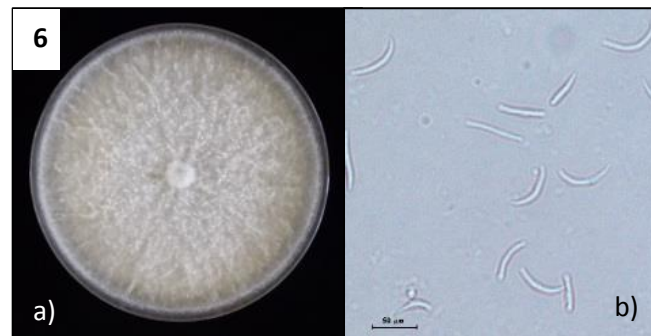
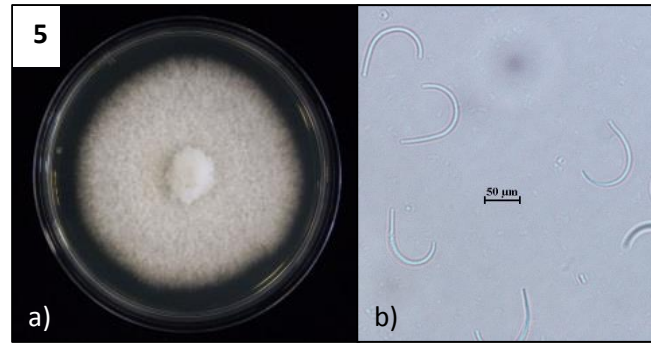
**Figura 10.** Lunghezza media degli imbrunimenti (mm) causati da 10 isolati appartenenti alle specie *Diplodia sp. nov*, *D. seriata*, *N. parvum* e *N. vitifusiforme*. Le barre sopra le colonne rappresentano la deviazione standard delle medie.



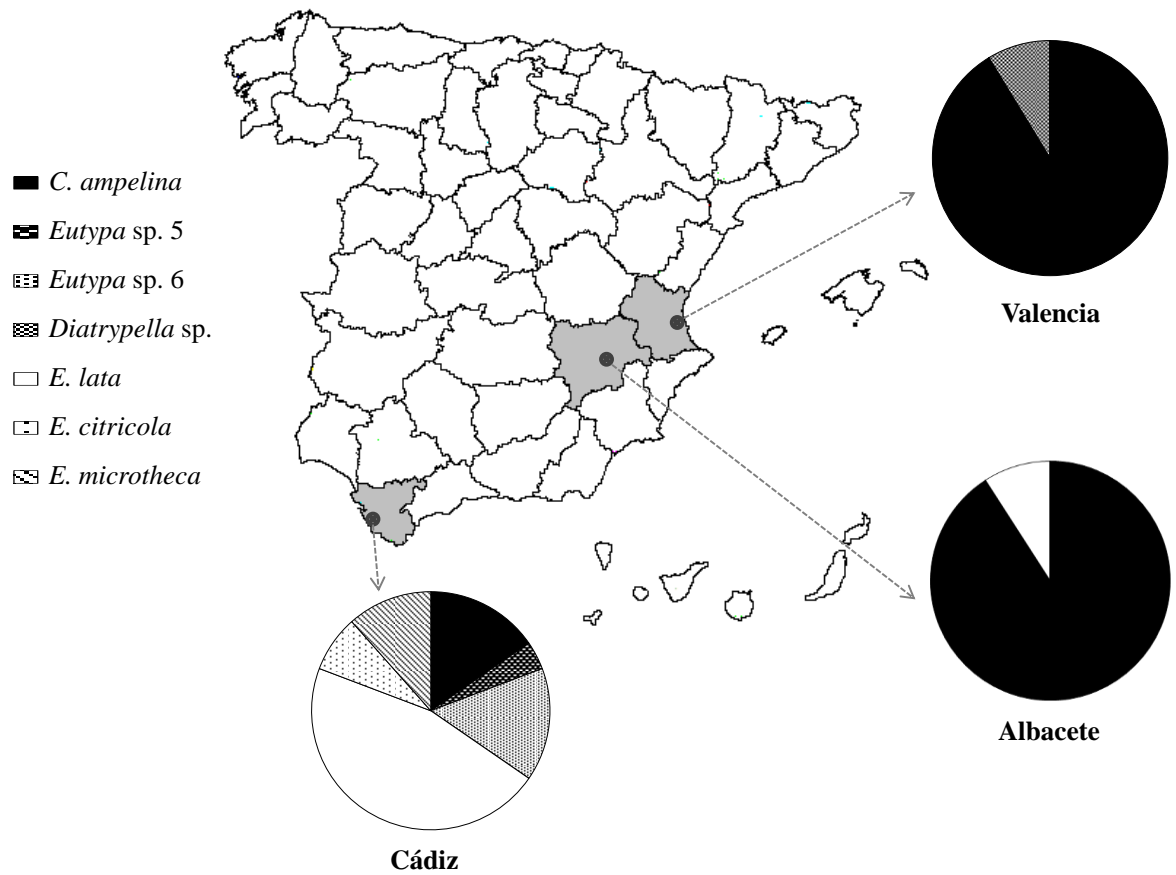
**Figura 11.** Analisi filogenetica di Diatrypeaceae spp. basata sulle sequenze ITS. I valori di bootstrap sono riportati in corrispondenza dei nodi. Le sequenze ottenute da GenBank sono indicate dal loro Accession number, mentre gli isolati ottenuti in questo studio dal codice dell'isolato.



**Figura 12.** Aspetto delle colonie cresciute su PDA dopo 7 gg di incubazione a 25°C al buio (a) e morfologia dei conidi (b) delle specie: *C. ampelina* (1), *Diatrypella* sp. (2), *E. lata* (3) ed *Eutypa* sp.5 (4).



**Figura 13.** Aspetto delle colonie cresciute su PDA dopo 7 gg di incubazione a 25°C al buio (a) e morfologia dei conidi (b) delle specie: *Eutypa* sp.6 (1), *E. citricola* (2) ed *E. microtheca* (3).



**Figura 14.** Distribuzione geografica e frequenza d'isolamento delle specie Diatrypaceae nelle province spagnole di Albacete, Cádiz e Valencia.

## Bibliografia

Abou-Mansour E., Débieux J.L., Ramírez-Suero M., Bénard-Gellon M., Magnin-Robert M., Spagnolo A., Chong J., Farine S., Bertsch C., L'Haridon F., Serrano M., Fontaine F., Rego C. e Larignon P., 2015. Phytotoxic metabolites from *Neofusicoccum parvum*, a pathogen of *Botryosphaeria* dieback of grapevine. *Phytochemistry* 115, 207.

Acero F.J., González V., Sánchez-Ballesteros J., Rubio V., Checa J., Bills G.F., Salazar O., Platas G. e Peláez F., 2004. Molecular phylogenetic studies on the Diatripaceae based on rDNA-ITS sequences. *Mycologia* 96, 249.

Ahimera N., Gisler S., Morgan D.P. e Michailides T.J., 2004. Effects of single-drop impactions and natural and simulated rains on the dispersal of *Botryosphaeria dothidea* conidia. *Phytopathology* 94, 1189.

Alves A., Correia A. e Phillips 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.

Alves A., Crous P.W., Correia A. e Phillips A.J.L., 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28, 1.

Amponsah N.T., Jones E., Ridgway H.J. e Jaspers M.V., 2012. Evaluation of fungicides for the management of botryosphaeria dieback diseases of grapevines. *Pest Management Science* 68, 676.

Amponsah N.T., Jones E., Ridgway H.J. e Jaspers M.V., 2012. Susceptibility of grapevines tissues to *Neofusicoccum luteum* conidial infection. *Plant Pathology* 61, 719.

Anderson P., Cunningham A.A., Patel N.G., Morales F.J., Epstein P.R. e Daszak P., 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *TRENDS in Ecology and Evolution* 19, 535.

Andolfi A., Maddau L., Cimmino A., Linaldeddu B.T., Franceschini A., Serra S., Basso S., Melck D. ed Evidente A., 2012. Cyclobotryoxide, a phytotoxic metabolite produced by the plurivorous pathogen *Neofusicoccum australe*. *Journal of Natural Products* 75, 1785.

Andolfi A., Maddau L., Cimmino A., Linaldeddu B.T., Basso S., Deidda A., Serra S. e Evidente A., 2014. Lasiojasmonates A–C, three jasmonic acid esters



produced by *Lasiodiplodia* sp., a grapevine pathogen. *Phytochemistry* 103, 145.

Andolfi A., Basso S., Giambra S., Conigliano G., Lo Piccolo S., Alves A. e Burruano S., 2015. Lasiolactols A and B produced by the grapevine fungal pathogen *Lasiodiplodia mediterranea*. *Chemistry and Biodiversity* DOI: 10.1002/cbdv.201500104.

Arauz L.F. e Sutton T.B., 1989. Influence of temperature and moisture on germination of ascospores and conidia of *Botryosphaeria obtusa*. *Phytopathology* 79, 667.

Arias A. e Moral A., 1981. Un hongo de la madera, nuevo peligro de la vid en España. Apareció en Badajoz en 1978. La Eutipiosis, precauciones a observar en la poda de la viña. *Agricultura* 592, 827.

Arias-Giralda A., 1998. Eutipiosis. In: Los Parásitos de la Vid. Estrategias de Protección Razonada, 4th edition. (G. Barrios i Sanromá, R. Coscollá-Ramón, A. Lucas-Espadas, J.L. Pérez-Marín, J. Toledo Paños, ed.), Mundiprensa, Madrid, Spain, 202.

Armengol J., Vicent A., Torné L., García-Figueres F. e García-Jiménez J., 2001. Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S325.

Aroca A., García-Figueres F., Bracamonte L., Luque J. e Raposo R., 2006. A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 115, 195.

Auger J., Esterio M., Ricke G. e Perez I., 2004. Black dead arm and basal canker on *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Disease* 88, 1286.

Barr, M. E. 1987. Prodomus to the class Loculoascomycetes. Published by the author, Amherst, MA.

Bester W., Crous P.W. e Fourie P.H., 2007. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology* 36, 73.

Blodgett, J.T. e Stanosz G.R., 1995. *Sphaeropsis sapinea* and host water stress in a red pine plantation in central Wisconsin. *Phytopathology* 85, 1044.

Brasier C.M., 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathology* 57, 792.

- Brown E.A. e Britton K.O., 1986. *Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the Southeastern United States. *Plant Disease* 70, 480.
- Burruano S., Mondello V., Conigliaro G., Alfonzo A., Spagnolo A. e Mugnai L., 2008. Grapevine decline in Italy caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytopathologia Mediterranea* 47, 132.
- Candolfi-Arballo O., Valenzuela-Solano C., Gubler W.D. e Hernández-Martínez R., 2010. Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in Mexico. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 105.
- Carbone I. e Kohn L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous *Ascomycetes*. *Mycologia* 91, 553.
- Carlucci A., Lops F., Raimondo M.L., Gentile V., Mucci M. e Frisullo S., 2009. The *Botryosphaeria* species from vineyards of Apulia. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 180.
- Carlucci A., Cibelli F., Lops F., Phillips Alan J.L., Ciccarone C. e Raimondo M., 2015. *Pleurostomophora richardsiae* associated with trunk diseases of grapevines in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 45, 109.
- Carter M.V., 1957. *Eutypa armeniaca* Hansf. & Carter, sp. nov., an airborne vascular pathogen of *Prunus armeniaca* L. in southern Australia. *Australian Journal of Botany* 5, 21.
- Carter M.V., Bolay A. e Rappaz F., 1983. An annotated host list and bibliography of *Eutypa armeniaca*. *Rev. Plant Pathology* 62, 251.
- Chamberlain G.C., Willison R.S., Townshend J.L. e De Ronde J.H., 1964. Two fungi associated with the dead-arm disease of grapes. *Canadian Journal of Botany* 42, 351.
- Chen S.Y, Chi W.C., Trinh N.N., Cheng K.T., Chen Y.C., Lin T.C., Lin Y.C, Huang L.Y., Huang H.J. e Chiang T.Y., 2015. Alleviation of allelochemical juglone-induced phytotoxicity in tobacco plants by proline. *Journal of Plant Interactions* 10, 167.
- Copes W.E. e Hendrix F.F.Jr., 2004. Effect of temperature on sporulation of *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtusa*, and *B. rhodina*. *Plant Disease* 88, 292.
- Cristinzio G. 1978. Gravi attacchi di *Botryosphaeria obtusa* su vite in provincia di Isernia. *Informatore Fitopatologico* 6, 21.

- Crous P.W., Slippers B., Wingfield M. J., Rheeder J., Marasas W.F.O., Phillips A. J.L., Alves A., Burgess T., Barber P. e Groenewald J. Z., 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55, 235.
- de Wet J., Slippers B., Preisig O., Wingfield B.D. e Wingfield M.J., 2008. Phylogeny of the *Botryosphaeriaceae* reveals patterns of host association. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46, 116.
- Denman S., Crous P.W., Taylor J.E., Kang J-C., Pascoe I. e Wingfield M.J., 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a reevaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45, 129.
- Deswarte C., Canut H., Kläbe A., Roustan J.P. e Fallot J., 1996. Transport, cytoplasmic accumulation and mechanisms of action of the toxin eutypine in *Vitis vinifera* cells. *Journal of Plant Physiology* 149, 336.
- Djoukeng J.D., Polli S., Larignon P. e Abou-Mansour E., 2009. Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 124, 303.
- El-Goorani M.A. e El Meleigi M.A., 1972. Dieback of grapevine by *Botryodiplodia theobromae* Pat. in Egypt. *Phytopathologia Mediterranea* 11, 210.
- Evidente A., Punzo B., Andolfi A., Cimmino A., Melck D. e Luque J., 2010. Lipophilic phytotoxins produced by *Neofusicoccum parvum*, a grapevine canker agent. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 74.
- Gardes M. e Bruns T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for *Basidiomycetes*: application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology* 2, 113.
- Giménez-Jaime A., Aroca A., Raposo R., García-Jime´nez J. e Armengol J., 2006. Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *Journal of Phytopathology* 154, 598.
- Glass N.L. e Donaldson G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1323.
- Glawe D.A. e Rogers J.D., 1982. Observations on the anamorphs of six species of *Eutypa* and *Eutypella*. *Mycotaxon* 14, 334.

- González-Domínguez E., León M. e Armengol J., 2015. Branch Cankers of Loquat Caused by Botryosphaeriaceae spp. in Spain. *Acta horticultrae*, DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1092.45
- Gramaje D. e Armengol J., 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: Potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease* 95, 1040.
- Halleen F., Crous P.W. e Petrini O., 2003. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australian Plant Pathology* 32, 47.
- Halleen F., van Niekerk J., Mostert L., Fourie P. e Crous P., 2005. Trunk disease pathogens associated with apparently healthy nursery grapevines. *Wineland* July, 79.
- Holmes J. e Rich A.E., 1970. Factors affecting release and dissemination of *Phyalospora obtusa* spores in a New Hampshire apple orchard. *Phytopathology* 60, 1052.
- Hunt J.S., 2004. *Trichoderma* and trunk disease fungi: prospects for new protective management options. *The Australian E New Zealand Grapegrower E Winemaker* 484, 17.
- Jacobs R., 2002. Characterization of Botryosphaeria species from mango in South Africa. M.Sc. thesis. *Pretoria, South Africa: University of Pretoria* 162.
- John S., Lardner R., Scott E., Stummer B. e Wicks T., 2001. Eutypa dieback research on biological control and diagnostics. *The Australian Grapegrower e Winemaker* 449, 73.
- Kaiser W.J., Rivero G.M. e Valverde E., 2009. First report of diplodia cane dieback of grapevines in Bolivia. *Plant Disease* 93, 320.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C. e Stalpers J.A. (eds.), 2008. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th Edition. Wallingford, UK: CABI.
- Koussa T., Dubos B., Cherrad M., 2002. Les teneurs en acide gras, en eau et en acide abscissique des feuilles de vigne (*Vitis vinifera* cv Cabernet Sauvignon) infectées par *Eutypa lata*. *Vitis* 43, 143.
- Larignon P. e Dubos B., 2001. The villany of Black dead arm. *Wines & Vines* 3, 86.

- Latorre B.A., Besoain X. e Flores V., 1986. Botryosphaeria canker of table grapes. *Phytopathology* 76, 1112.
- Laveau C., Letouze A., Louvet G., Bastien S. e Guérin-Dubrana L., 2009. Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 32.
- Lazzizzera C., Frisullo S., Alves A. e 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.
- Lehoczky J., 1974. Black dead arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 9, 319.
- Li X., Yan J., King F., Qiao G., Zhang Z. e Wang Z., 2010. *Botryosphaeria dothidea* causing canker of grapevine newly reported in China. *Plant Pathology* 59, 1170.
- Linaldeddu B.T., Scanu B., Schiaffini A. e Serra S., 2010. First report of *Neofusicoccum australe* associated with grapevine cordon dieback in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 417.
- Linaldeddu B.T., Deidda A., Scanu B., Franceschini A., Serra S., Berraf-Tebbal A., Zouaoui Boutiti M., Ben Jamâa M.L. e Phillips A.J.L., 2015. Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine and other woody hosts in Italy, Algeria and Tunisia, with descriptions of *Lasiodiplodia exigua* and *Lasiodiplodia mediterranea* sp. nov. *Fungal Diversity* 71, 201.
- Luque J., Martos S. e Phillips A.J.L., 2005. *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia* 97, 1111.
- Luque J., Sierra D., Torres E. e Garcia F., 2006. *Cryptovalsa ampelina* on grapevines in N.E. Spain: identification and pathogenicity. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S101.
- Luque J., Martos S., Aroca A., Raposo R. e Garcia-Figueroes F., 2009. Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in Northeast Spain. *Journal of Plant Pathology* 91, 381.
- Luque J., García-Figuéres F., Legorburu F.J., Muruamendiaraz A., Armengol J. e Trouillas F.P., 2012. Species of Diatrypaceae associated with grapevine trunk diseases in Eastern Spain. *Phytopathologia Mediterranea* 51, 528.

- Luque J., Elena G., Garcia-Figueres F., Reyes J., Barrios G. e Legorburu F.J., 2014. Natural infections of pruning wounds by fungal trunk pathogens in mature grapevines in Catalonia (Northeast Spain). *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20, 134.
- Martín M.T. e Cobos R., 2007. Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y Leon (Spain). *Phytopathologia Mediterranea* 46, 18.
- Martín M.T., Martín L., de-Francisco M.T. e Cobos R., 2009. First report of *Lasiodiplodia theobromae* and *Cryptovalsa ampelina* associated with grapevine decline from Castilla y Leon, Spain. *Plant Disease* 93, 545.
- Martos S., Andolfi A., Luque J., Mugnai L., Surico G. e Evidente A., 2008. Production of phytotoxic metabolites by five species of Botryosphaeriaceae causing decline on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. *European Journal of Plant Pathology* 121, 451.
- Mateo J., 1995. Incidencia de la eutipiosis en el viñedo de Rioja Alavesa. *Phytoma-España* 66, 15.
- Matsuura H., Nakamori K., Omer E.A., Hatakeyama C. e Yoshihara T., 1998. Three lasiodiplodins from *Lasiodiplodia theobromae* ifo 31059. In honour of professor G. H. Neil Towers 75th birthday. *Phytochemistry* 49, 579.
- Michailides T.J., 1991. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. *Phytopathology* 81, 566.
- Milholland R.D., 1991. Muscadine grapes: Some important diseases and their control. *Plant Disease* 75, 113.
- Mittler R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7, 405.
- Mohammadi H., Gramaje D., Banishashemi Z. e Armengol J., 2013. Characterization of *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine decline in Iran. *Journal of Agricultural and Science Technology* 15, 603.
- Moller W.J. e Carter M.V., 1965. Production and dispersal of ascospores in *Eutypa armeniacae*. *Australian Journal of Biological sciences* 53, 828.

- Moller W.J., Kasimatis A.N., Kissler J.J., 1974. A dying arm disease of grape in California. *Plant Disease Reporter* 58, 869.
- Moller W.J., e Kasimatis A.N., 1978. Dieback of grapevines caused by *Eutypa armeniacae*. *Plant Disease Reporter* 62, 254.
- Mondello V., Lo Piccolo S., Conigliaro G., Alfonzo A., Torta L. e Burruano S., 2013. First report of *Neofusicoccum vitifusiforme* and presence of other Botryosphaeriaceae species associated with Botryosphaeria dieback of grapevine in Sicily (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 52, 388.
- Muruamendiaraz A., Lecomte P. e Legorburu F.J., 2009. Occurrence of the *Eutypa lata* sexual stage on grapevine in Rioja. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 140.
- O’Gorman D.T., Haag P. e Sholberg P.L., 2010. First report of Eutypa dieback and other emerging grapevine diseases in the Okanagan Valley. *Canadian Plant Disease Survey* 90, 158.
- Octave S., Amborabé B.E., Fleurat-Lessard P., Bergès T. e Roblin G., 2006. Modifications of plant cell activities by Proteic compounds excreted by *Eutypa lata*, a vineyard fungal pathogen. *Physiologia Plantarum* 128, 103.
- Paolinelli-Alfonso M., Serrano-Gomez C. e Hernandez-Martinez R., 2015. Occurrence of *Eutypella microtheca* in grapevine cankers in Mexico. *Phytopathologia Mediterranea* 54, 86.
- Pearson R.C., 1980. Discharge of ascospores of *Eutypa armeniacae* in New York. *Plant Disease* 64, 171.
- Péros J.P. e Berger G., 2003. Genetic structure and variation in aggressiveness in European and Australian populations of the grapevine dieback fungus, *Eutypa lata*. *European Journal of Plant Pathology* 109, 909.
- Phillips A.J.L., 1998. *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology* 146, 327.
- Phillips A.J.L., 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 3.
- Phillips A.J.L., Alves A., Correia A. e Luque J., 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97, 513.

- Phillips A.J.L., Crous P.W. e Alves A., 2007. *Diplodia seriata*, the anamorph of “*Botryosphaeria*” *obtusa*. *Fungal Diversity* 25, 141.
- Phillips A.J.L., Alves A., Pennycook S.R., Johnston P.R., Ramaley A., Akulov A. e Crous P.W. 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*. *Persoonia* 21, 29.
- Phillips A.J.L., Lopes J., Abdollahzadeh J., Bobev S. e Alves A., 2012. Resolving the *Diplodia* complex on apple and other *Rosaceae* hosts. *Persoonia* 29, 29.
- Phillips A.J.L., Alves A., Abdollahzadeh J., Slippers B., Wingfield M.J., Groenewald J.Z. e Crous P.W., 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76, 51.
- Pitt W.M., Huang R., Steel C.C. e Savochia S., 2010a. Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 16, 258.
- Pitt W.M., Huang R., Trouillas F.P., Savocchia, S. e Steel C.C. 2010b. Evidence that *Eutypa lata* and other diatrypaceous species occur in New South Wales vineyards. *Australian Plant Pathology* 39, 97.
- Pitt W.M., Huang R., Steel C.C. e Savocchia S., 2013a. Pathogenicity and epidemiology of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevines in Australia. *Australian Plant Pathology* 42, 573.
- Pitt W.M., Trouillas F.P., Gubler W.D., Savocchia S. e Sosnowski M.R., 2013b. Pathogenicity of Diatrypaceous Fungi on Grapevines in Australia. *Plant Disease* 97, 749.
- Pollastro S., Dongiovanni C., Abbatecola A. e Faretra F., 2000. Observations on the fungi associated with esca and on spatial distribution of esca-symptomatic plants in Apulian (Italy) vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 206.
- Pusey P.L., 1989a. Influence of water stress on susceptibility on nonwounded peach bark to *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 73, 1000.
- Pusey P.L., 1989b. Availability and dispersal of ascospores and conidia of *Botryosphaeria* in peach orchards. *Plant Disease* 79, 635.
- Pusey P.L. e Bertrand P.F., 1993. Seasonal infection of nonwounded peach bark by *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology* 83, 825.



- Ragazzi A., Moricca S., Capretti P., Della Valle I., Turco E. e Marianelli L., 2002. Endofiti fungini in *Quercus cerris*: frequenza temporale di isolamento in piante asintomatiche. In: *Atti del Convegno Nazionale "L'endofitismo di funghi e batteri fitopatogeni in piante arboree ed arbustive"*. Sassari, 19-21 Maggio 2002, 269.
- Rappaz F., 1987 Taxonomie et nomenclature des Diatrypacées à asques octosporées. *Mycologia Helvetica* 2, 285.
- Rego C., Vaz A., Nascimento T., Cabral A., e Oliveira H., 2009. Diseases incited by Botryosphaeriaceae fungi in Portuguese vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 181.
- Renaud J.M., Tsoupras G. e Tabacchi R., 1989. Biologically active natural acetylenic compounds from *Eutypa lata*. *Helvetica Chimica Acta* 72, 929.
- Rolshausen P.E., Mahoney N.E., Molyneux R.J. e Gubler W.D., 2006. A reassessment of the species concept in *Eutypa lata*, the causal agent of Eutypa dieback of grapevine. *Phytopathology* 96, 369.
- Rolshausen P.E., Úrbez-Torres J.P. e Rooney-Latham S., 2010. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevines trunk disease. *American Journal of Enology and Viticulture* 61, 113.
- Rolshausen P.E., Baumgartner K., Travadon R., Fujiyoshi P., Pouzoulet J. e Wilcox W.F., 2014. Identification of *Eutypa* spp. causing Eutypa dieback of grapevine in eastern North America. *Plant Disease* 98, 483.
- Romanazzi G., Murolo S., Pizzichini L. e Nardi S., 2009. Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. *European Journal of Plant Pathology* 125, 277.
- Rovesti L. e Montermini A., 1987. A grapevine decline caused by *Sphaeropsis malorum* widespread in the province of Reggio-Emilia. *Informatore Fitopatologico* 37, 59.
- Rukachaisirikul R., Arunpanichlert J., Sukpondma Y., Phongpaichit S. e Sakayaroj J., 2009. Metabolites from the endophytic fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114. *Tetrahedron* 65, 10590.
- Santiago Y., Martín de María M.C., Moreno Vargas C., Vicente Pinto J.M., Úrbez-Torres J.R. e Peláez Rivera H., 2005. Hongos implicados en los decaimientos de la vid. *Viticultura y Enología Profesional* 96, 20.

- Savocchia S., Steel C.C., Stodart B.J. e Somers A., 2007. Pathogenicity of *Botryosphaeria* species from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis* 46, 27.
- Schoeneweiss D.F., 1981. The role of environmental stress in diseases of woody plants. *Plant Disease* 65, 308.
- Shoemaker R.A., 1964. Conidial states of some *Botryosphaeriaceae* species on *Vitis* and *Quercus*. *Canadian Journal of Botany* 42, 1297.
- Slippers B., Crous P.W., Denman S., Couthino T.A., Wingfield B.D. e Wingfield M.J., 2004. Combine multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96, 83.
- Slippers B., Stenlid J. e Wingfield M.J., 2005. Emerging pathogens: fungal host jumps following anthropogenic introduction. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20, 420.
- Slippers B. e Wingfield M.J., 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21, 90.
- Smith H., Kemp G.H.J. e Wingfield M.J., 1994. Canker and dieback of *Eucalyptus* in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Pathology* 43, 1031.
- Sosnowski M.R., Loschiavo A.P., Wicks T.J. e Scott E.S., 2013. Evaluating treatments and spray application for the protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Plant Disease* 97, 1599.
- Spagnolo A., Marchi G., Peduto F., Phillips A.J.L. e Surico G., 2011. Detection of *Botryosphaeriaceae* species within grapevine woody tissues by nested PCR, with particular emphasis on the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *European Journal of Plant Pathology* 129, 485.
- Sutton T.B., 1981. Production and dispersal of ascospores and conidia by *Phyalospora obtusa* and *Botryosphaeria dothidea* in apple orchards. *Phytopathology* 71, 584.
- Sutton T.B. e Arauz L.F., 1991. Influence of temperature and moisture on germination of ascospores and conidia of *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 75, 1146.

- Swart W.J. e Wingfield M.J., 1991. Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. *Plant Disease* 75, 761.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbett D.S. e Fisher M.C., 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31, 21.
- Taylor A., Hardy G.E. St J., Wood P. e Burgess T., 2005. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 34, 187.
- Tey-Rulh P., Phillippe I., Renaud J.M., Tsoupras G., De Angelis P., Fallot J. e Tabacchi R., 1991. Eutypine, a phytotoxin produced by *Eutypa lata*, the causal agent of dying-arm disease of grapevine. *Phytochemistry* 30, 471. 1991
- Travadon R., Baumgartner K., Rolshausen P.E., Gubler W.D., Sosnowski M.R., Lecomte P., Halleen F. e Peros J.P., 2012. Genetic structure of the fungal grapevine pathogen *Eutypa lata* from four continents. *Plant Pathology*. 61, 85.
- Travadon R., Rolshausen P.E., Gubler W.D., Cadle-Davidson L. e Baumgartner K., 2013. Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* spp. to wood infection by fungal trunk pathogens. *Plant Disease* 97, 1529.
- Trouillas F.P., Úrbez-Torres J.R. e Gubler W.D., 2010a. Diversity of diatrypaceous fungi associated with grapevine canker diseases in California. *Mycologia* 102, 319.
- Trouillas F.P. e Gubler W.D., 2010b. Host range, biological variation, and phylogenetic diversity of *Eutypa lata* in California. *Phytopathology* 100, 1048.
- Trouillas F.P., Pitt W.M., Sosnowski M.R., Huang R.J., Peduto F., Loschiavo A., Savocchia S., Scott E.S. e Gubler W.D., 2011. Taxonomy and DNA phylogeny of Diatrypaceae associated with *Vitis vinifera* and other woody plants in Australia. *Fungal Diversity* 49, 203.
- Úrbez-Torres J.R. e Peláez H., 2001. Eutipiosis, una gran amenaza para el viñedo. *Agroalimentaria* 60, 16.
- Úrbez-Torres J.R., Leavitt G.M., Voegel T.M. e Gubler W.D., 2006a. Identification and distribution of *Botryosphaeria* species associated with grapevines cankers in California. *Plant Disease* 90, 1490.
- Úrbez-Torres J.R., Peláez H., Santiago Y., Martín C., Moreno C. e Gubler W.D., 2006b. Occurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea* and *B. parva*

associated with grapevine trunk diseases in Castilla y León region, Spain. *Plant Disease* 90, 835.

Úrbez-Torres J.R., Luque J. e Gubler W.D., 2007. First report of *Botryosphaeria iberica* and *B. viticola* associated with grapevine decline in California. *Plant Disease* 91, 772.

Úrbez-Torres J.R., Leavitt G.M., Guerrero J.C., Guevara J. e Gubler W.D., 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease* 92, 519.

Úrbez-Torres J.R., Adams P., Kama J. e Gubler W.D., 2009. Identification, incidence and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas. *American Journal of Enology and Viticulture* 60, 497.

Úrbez-Torres J.R. e W.D. Gubler, 2009. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease* 93, 584.

Úrbez-Torres J.R., Battany M., Bettiga L.J., Gispert C., McGourty G., Roncoroni J., Smith R.J., Verdegaal P. e Gubler W.D., 2010a. *Botryosphaeriaceae* species spore-trapping studies in California vineyards. *Plant Disease* 94, 717.

Úrbez-Torres J.R., Peduto F. e Gubler W.D., 2010b. First report of grapevine cankers caused by *Lasiodiplodia crassispora* and *Neofusicoccum mediterraneum* in California. *Plant Disease* 94, 785.

Úrbez-Torres J.R., 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 50, S5.

Úrbez-Torres J.R. e Gubler W.D., 2011. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathology* 60, 261.

Úrbez-Torres J.R., Peduto F., Striegler K., Rupe J.C., Cartwright R.D. e Gubler W.D., 2012. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Diversity* 52, 169.

van Niekerk J.M., Crous P.W., Groenewald J.Z.E., Fourie P.H. e Halleen F., 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96, 781.

- van Niekerk J.M., Fourie P.H., Halleen F. e Crous P.W., 2006. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S43.
- van Niekerk J.M., Frikkie J.C., Halleen F. e Fourie P.H., 2010a. Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 127, 375.
- van Niekerk J.M., Webster W., Halleen F., Crous P.W. e Fourie P.H., 2010b. First report of *Lasiodiplodia crassispora* as a pathogen of grapevine trunks in South Africa. *Plant disease* 94, 1063.
- von Arx J.A. e Müller E. 1954. Die Gattungen der amersporen Pyrenomyceten. *Beitraege zur Kryptogamenflora der Schweiz* 11, 1.
- von Arx J.A., 1987. *Plant-pathogenic Fungi*. J. Cramer, Berlin, Germany.
- White T.J., Bruns T., Lee S. e Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications* (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, ed.). *Academic Press, San Diego, CA, USA* 315.
- Wojtaszek P., 1997. The oxidative burst: a plant's early response against infection. *Biochemical Journal* 322, 4158.
- Xu Y.X., Lu C.H., Zheng Z.H. e Shen Y.N., 2011. New polyketides isolated from *Botryosphaeria australis* Strain ZJ12-1A. *Helvetica Chimica Acta* 94, 897.
- Yan J.Y., Li X.H., Kong F.F., Wang Z.Y., Gong L.Z. e He H.P., 2011. Occurrence of grapevine trunk disease caused by *Botryosphaeria rhodina* in China. *Plant Disease* 95, 219.
- Yukimune Y., Hara Y., Nomura E., Seto H. e Yoshida S., 2000. (-)-Jasmonic Acid, a Phytotoxic Substance from *Botryodiplodia theobromae*: Characterization by NMR Spectroscopic Methods. *Phytochemistry* 54, 13.

## RINGRAZIAMENTI

Sentiti ringraziamenti vanno al Prof. Josep Armengol per la preziosa opportunità di studio e ricerca offertami durante la mia permanenza presso la sua struttura, per i validi consigli e la sua assistenza, alla Dott.ssa Anna Andolfi per il contributo riguardante la caratterizzazione e lo studio chimico dei metaboliti secondari, al Prof. Riccardo Lo Bianco per gli utili suggerimenti relativi l'elaborazione statistica, alla Prof. Maria Luigia Alicata e alla Dott.ssa Francesca Mazza per il supporto riguardante la liofilizzazione dei filtrati colturali. Desidero, inoltre, ringraziare tutto il gruppo di lavoro di cui faccio parte e la Prof.ssa Santella Burruano per aver messo a disposizione la sua esperienza per la realizzazione di questo lavoro donandomi insegnamenti preziosi, per la continua disponibilità avuta nei miei confronti anche nei momenti più impegnativi.