



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dipartimento DEMETRA, Facoltà di Agraria

GESTIONE FITOSANITARIA ECO-COMPATIBILE IN AMBIENTI AGRO-FORESTALI E URBANI

Caratterizzazione di isolati di *Colletotrichum* spp. agenti causali dell'antracnosi dell'olivo

S.S.D. AGR/12
Patologia Vegetale

TESI DI
SAVERIA MOSCA

COORDINATORE DEL DOTTORATO
Prof. Stefano Colazza

TUTOR
Prof.ssa Antonella Pane

Co-tutor
Prof. Leonardo Schena

Co-tutor
Dott. Roberto Faedda

XXIII CICLO - ANNO ACCADEMICO 2010/2011

DOTTORATO



CAPITOLO I

1. Introduzione

1.1. Il genere *Colletotrichum* spp.

Colletotrichum Corda in Sturm, e il relativo telomorfo riferibile al genere *Glomerella*, rappresenta un genere eterogeneo e cosmopolita appartenente al *phylum* degli Ascomiceti (Tab. 1) che comprende funghi endofiti ed epifiti con stile di vita saprofitario e fitopatogeno (Adaskaveg e Hartin, 1997; Photita *et al.*, 2005). Al genere appartengono diverse specie in grado di causare malattie economicamente importanti in pre- e in post-raccolta di piante erbacee, arboree, coltivate e spontanee, ornamentali, foraggere, ortive e perenni diffuse nelle regioni tropicali, subtropicali e temperate (Freeman *et al.*, 1998; Sreenivasaprasad e Talhinhos, 2005; Hyde *et al.*, 2009).

Le malattie causate dalle specie appartenenti a questo genere, comunemente note con il termine di antracnosi, causano nei tessuti colpiti tipiche infossature, depressioni sub-circolari o lesioni angolari conseguenti al collasso dei tessuti profondi nei quali si sviluppa la massa miceliale. I sintomi si manifestano su differenti organi dell'ospite in particolare sui frutti, sulle foglie, sui rami, sui piccioli e talvolta anche sui fiori causando marciume e caduta dei frutti, disseccamenti delle infiorescenze, alterazioni del processo fotosintetico e marciumi post-raccolta dovuti a infezioni latenti o quiescenti (Freeman *et al.*, 1998; Peres *et al.*, 2005). Il genere *Colletotrichum* presenta acervuli su cui si inseriscono conidiofori di forma tendenzialmente discoidale, formati da stromi miceliali dapprima sottoepidermici e poi erompenti, costituiti da uno strato compatto di fialidi cilindriche, ialine, sostenute da uno o più strati di cellule corte, moderatamente punteggiate, a volte lunghe, originatesi dallo stroma basale, provvisti di lunghe setole brune, rigide, uni o pluricellulari. I conidi possono essere cilindrici, fusiformi o falciformi e sono unicellulari, ialini a parete liscia, riuniti in masse vischiose di colore vario.

1.2. Classificazione tassonomica

Le prime informazioni riguardanti i funghi appartenenti al genere *Colletotrichum* si sono avute con hanno avuto inizio con la descrizione di Tode (1790) del genere *Vermicularia*, nome utilizzato in maniera interscambiabile con *Colletotrichum* durante il XIX e XX secolo. Successivamente, il genere *Colletotrichum* (stato asessuato o anamorfo), caratterizzato dalla presenza di conidi ialini, diritti o falcati, fu istituito da Corda in Sturm (1837). Nonostante la sua descrizione, il genere fu identificato spesso con nomi differenti, presentando sino a 17 sinonimi tra cui *Vermicularia*, *Dicladium*, *Ellisiella* e *Gloeosporium* (Sutton, 1992). Nel 1957, Von Arx effettuò la prima revisione del genere sulla base dei caratteri morfologici e degli ospiti, riducendo le centinaia di specie associate a *Colletotrichum* (ca. 900) a 11 taxa, molti dei quali trattati come sinonimi di *C. gloeosporioides* (ca. 600 sinonimi), *C. dematium* (86), *C. graminicola* (33), *C. crassipes* (18) e *C. atramentarium* (15). Questa prima revisione è stata seguita da numerose altre con l'identificazione di nuove specie (Cai *et al.*, 2011). Sutton (1992) con la sua revisione incrementò le specie associate al genere *Colletotrichum* a 39. Tuttavia, secondo l'Autore, la posizione tassonomica di alcune specie rimaneva poco chiara. *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. graminicola* e *C. dematium*, vennero considerate infatti gruppo o complessi di specie. La forma perfetta o sessuale del genere *Colletotrichum* fu identificata per la prima volta da Atkinson (1892) e in seguito confermata da Stoneman (1898) come *Gnomoniopsis cingulata*. Tuttavia, questo nome generico era stato usato per identificare altri funghi e von Schrenk e Spaulding (1903) introdussero il genere *Glomerella* per ospitare il telomorfo di *Colletotrichum* Corda e *Gloeosporium* Auct. (Bryson *et al.*, 1992). Il genere *Glomerella* Spauld & Schrenk, *phylum Ascomycotina*, appartiene alla famiglia delle *Phyllachoraceae* (Tab. 1) e si caratterizza per la presenza di un ascoma di colore nero, con pareti sottili e con la mancanza di materiale stromale (Sutton, 1992).

Fra le specie di *Colletotrichum* spp. che rivestono particolare interesse fitopatologico un ruolo di primo piano è occupato da *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, specie molto spesso associate allo stesso ospite la cui identificazione, attraverso criteri morfologici, ha spesso generato grande confusione a causa dell'elevata variabilità fenotipica delle due specie (Freeman *et al.*, 1998; Peres *et al.*, 2005). *C. acutatum*, insieme al *C. gloeosporioides* rappresentano i principali agenti causali di antracnosi su

una vasta gamma di ospiti, appartenenti a più di 40 famiglie, causando perdite economicamente importanti in pre- e post-raccolta di piante erbacee, arboree, foraggere, ortive e ornamentali (Sreenivasaprasad e Talhinhos, 2005; Talhinhos *et al.*, 2005; Shivas e Tan, 2009).

Tab. 1- Classificazione Tassonomica del genere *Colletotrichum* secondo la “10th edition of the Dictionary of the Fungi” <http://www.indexfungorum.org/Names/fundic.asp>

<i>Regno</i>	<i>Fungi</i>
<i>Phylum</i>	<i>Ascomycota</i>
<i>Classe</i>	<i>Sordariomycetes</i>
<i>Sottoclasse</i>	<i>Sordariomycetidae</i>
<i>Ordine</i>	<i>Incertae sedis</i>
<i>Famiglia</i>	<i>Glomerellaceae</i>
<i>Genere</i>	<i>Colletotrichum</i> Corda 1832 <i>Glomerella</i> Spauld. & H. Schrenk 1903

1.2.1. *Colletotrichum gloeosporioides*

C. gloeosporioides è una specie ubiquitaria ed estremamente polifaga che si comporta sia da patogeno primario, sia da patogeno opportunisto, diffusa nelle regioni tropicali, subtropicali e in climi temperati. È agente responsabile di malattie note con il nome di antracnosi con ripercussioni economicamente importanti su una vasta gamma di piante ospiti. È stato associato ad almeno 470 generi diversi, compresi *Agavaceae*, *Pomaceae*, avocado, stative (Freeman *et al.*, 2000; Maymon *et al.*, 2006), agrumi (*Citrus* spp.), mandorlo (*Prunus dulcis*), fragola (*Fragaria x ananassa*) (Adaskaveg e Hartin, 1997) caffè, mango, *Cucurbitaceae*, pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) (Maymon *et al.*, 2006), olivo (*Olea europaea.*) (Martin Garcia e Figueres, 1999), papaya, frutto della passione, *Proteaceae* e piante appartenenti al genere *Stylosanthes* (Hyde *et al.*, 2009a). Dalla sua descrizione originale, come *Vermicularia gloeosporioides* Penz., la definizione di questa specie, basata prevalentemente su caratteri morfologici e sull'ospite in cui si trovava, è tuttora controversa (Sutton, 1992),

rendendo difficoltosa l'identificazione degli isolati appartenenti alla specie *C. gloeosporioides*. Attualmente questa specie costituisce un complesso che comprende una serie di sottogruppi che mostrano vari gradi di patogenicità, ospite-specificità e omogeneità genetica. È stata riconosciuta come un *taxon* complesso da von Arx (1957) cui fanno riferimento circa 600 specie in sinonimia tra loro (Hyde *et al.*, 2009 a; Sutton, 1992). In seguito alla revisione di von Arx, con la quale molte specie venivano separate, Sutton (1992) ha differenziato *C. gloeosporioides sensu stricto* dalle altre sette forme speciali indicate come *C. gloeosporioides sensu lato* (Moriwaki *et al.*, 2003).

Il fungo è caratterizzato da rami conidiofori acervulari sub-epidermici (80-280 µm di diametro) talvolta circondati da una corona biancastra periferica di lunghe ife sinuose “acervuli stellati” (Graniti *et al.*, 1993). I rami conidiofori settati portano cellule eteroplastiche, fialoconidiche, ialine, conidiogene. I conidi sono ialini e unicellulari. La maggior parte di essi sono dritti, leggermente ellissoidali o subcilindrici con le parti terminali arrotondate; qualche volta sono sub-clavati e le loro dimensioni sono di 12-25 x 3,5-6 µm (Sutton, 1992; Adaskaveg e Hartin, 1997). Con la germinazione dei conidi si ha la formazione di appressori bruni, ovati, clavati o irregolarmente lobati di dimensioni variabili da 4 a 7 micron di diametro. Il micelio che si forma su agar patata destrosio (PDA) è variabile, assumendo colorazioni dal bianco chiaro al grigio scuro, aereo, infeltrito o fioccoso verso i margini della colonia, con colorazioni scure o nere nel tempo per la produzione dei conidiomata. Le setole possono essere presenti o assenti; gli sclerozi sono assenti possono essere confusi con ascomata immaturi (Sutton, 1992). Il fungo può infettare tra 20 e 28°C, ma la sua temperatura ottimale di crescita è di 27 ± 1°C (Freeman *et al.*, 1995; Prusky *et al.*, 2001; Talhinhos *et al.*, 2005;). Il pH ottimale per la crescita del fungo è 5,5-7 (Prusky *et al.*, 2001). La specie, inoltre, è sensibile al *benomyl* (Peres *et al.*, 2004; Nakaune e Nakano, 2007). I conidi di *C. gloeosporioides* sono prodotti all'interno acervuli che, a loro volta, sono la principale fonte di inoculo per lo sviluppo e la diffusione della malattia. La dispersione può avvenire attraverso il vento o la pioggia grazie alla presenza di uno strato mucillaginoso che ricopre gli acervuli, composto da polisaccaridi e glicoproteine, responsabili dell'idrofobicità dei conidi sulla superficie cellulare dell'ospite (Rodrigos-Lopez *et al.*, 2009). Il telomorfo è riferibile a *G. cingulata* (Stoneman) Spaulding et von Schrenk (Sutton, 1992).

1.2.2. *Colletotrichum acutatum*

Colletotrichum acutatum J.H. Simmonds ex J.H. Simmonds è stato descritto per la prima volta da Simmonds (1965) come specie separata e agente causale dell'antracnosi della papaya in Australia (Shivas e Tan, 2009). Prima di questa data, questa specie era stata considerata una delle numerose varianti morfologiche di *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz e Sacc. in Penz., poiché spesso associata al medesimo ospite, o appartenente alla specie *Gloeosporium* (Von Arx), (Guerber *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005). *C. acutatum*, specie eterogenea, rappresenta uno dei principali patogeni; ha ampia distribuzione mondiale essendo stato riscontrato in ospiti appartenenti a 34 generi di 22 famiglie differenti (Lardener *et al.*, 1999; Sreenivasaprasad e Talhinhos, 2005). I sintomi causati da *C. acutatum* si manifestano principalmente sui frutti ma anche su altri organi quali fiori, foglie, piccioli e radici. Fra gli ospiti più importanti vi sono la fragola (*Fragaria x ananassa*), il melo (*Malus pumila*), il mandorlo (*Prunus dulcis*), il pesco (*Prunus persica*), l'olivo (*Olea europaea*), il noce (*Juglans regia*), il mirtillo (*Vaccinium* spp.), gli agrumi (*Citrus* spp.), il pomodoro (*Lycopersicon esculentum*), la melanzana (*Solanum melongena*), il sedano (*Apium graveolens*) oltre a piante ornamentali come camelia (*Camellia* sp.), anemone (*Anemone coronaria*), ranuncolo (*Ranunculus* sp.). La gamma di ospiti è tuttavia molto più ampia dal momento che la specie è stata isolata da molte altre famiglie tra le seguenti: *Adoxaceae*, *Amaryllidaceae*, *Anacardiaceae*, *Annonaceae*, *Asteraceae*, *Balsaminaceae*, *Berberidaceae*, *Bignoniaceae*, *Caricaceae*, *Cucurbitaceae*, *Cruciferae*, *Dryopteridaceae*, *Ebenaceae*, *Ericaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Fagaceae*, *Gentianaceae*, *Juglandaceae*, *Lardizabalaceae*, *Lauraceae*, *Leguminosae*, *Liliaceae*, *Magnoliaceae*, *Moraceae*, *Myrsinaceae*, *Myrtaceae*, *Nelumbonaceae*, *Pinaceae*, *Plumbaginaceae*, *Polemoniaceae*, *Primulaceae*, *Proteaceae*, *Ranunculaceae*, *Rhamnaceae*, *Rhodoraceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae*, *Salicaceae*, *Salvinaceae*, *Simmondsiaceae*, *Solanaceae*, *Theaceae*, *Tiliaceae*, *Umbelliferae*, *Urticaceae*, *Verbenaceae* e *Vitaceae*. *C. acutatum* attacca, inoltre, pini di origine non europea come il *Pinus radiata* e il *Pinus eliottii*, (Martín e García-Figueres, 1999; Guerber *et al.*, 2003; Moriwaki *et al.*, 2003; Lubbe *et al.*, 2004; Peres *et al.*, 2005; Hyde *et al.*, 2009a). Il micelio del fungo su substrato colturale (PDA) forma colonie di colore variabile dal bianco al grigio al marrone scuro e al grigio-salmone. Guardando le colonie dal lato opposto delle capsule Petri queste

appaiono di colore beige o panna con produzione di pigmenti cangianti dal rosa al rosso o all'arancione (Adaskaveg e Hartin, 1997). Gli sclerozi sono assenti ma la specie presenta appressori di forma obovata, ovata, clavata o leggermente irregolare, con margini interi o leggermente lobati di colore variabile dal marrone chiaro al marrone scuro, di dimensioni 8,5-10 x 4,5-6 micron (Sutton, 1992; Adaskaveg e Hartin, 1997). I conidi formano delle masse di colore rosa, rosa-salmone e arancio, fusiformi o ellittici, affusolati alla base e all'apice, con dimensioni di 8,5-16,5 x 2,5-4 micron. I conidi sono prodotti da conidiofori, tipo fialidi, e anche da acervuli. La crescita è lenta rispetto ad altre specie appartenenti al genere *Colletotrichum*; l'*optimum* termico è di 24°C. La specie è tollerante al *benomyl* (Adaskaveg e Hartin, 1997; Talhinhos *et al.*, 2005; Nakaune e Nakano, 2007). Il teleomorfo è riferibile a *G. acutata* J.C. Guerber & J.C. Correll che produce un peritecio sub globoso, globoso o piriforme con abbondante produzione di ascospore (Adaskaveg e Hartin 1997; Sutton, 1992; Freeman *et al.*, 1998; Guerber *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005).

2. Antracnosi dell'olivo

L'antracnosi dell'olivo (*Olea europaea* L.) rappresenta un'importante malattia diffusa in differenti aree olivicole mondiali e in particolar modo nei Paesi del Bacino Mediterraneo quali Spagna, Portogallo, Grecia, Montenegro (Martin and Garcia-Figueres, 1999; Talhinhos *et al.*, 2005; Moral *et al.*, 2009), e alcune regioni dell'Italia centrale e meridionale come Puglia, Calabria e Sardegna (Graniti *et al.*, 1993; Cacciola *et al.*, 1996). La sua presenza è stata segnalata anche in America (Michailides *et al.*, 2011), Australia, India, Cina, Giappone, Brasile (Sergeeva *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2010) e Tunisia (Rhouma *et al.*, 2010).

I sintomi tipici dell'antracnosi dell'olivo, conosciuta anche con nomi differenti quali "aceituna jabonosa", "vivo", "vivillo" o "mommificado" (Spagna) "gaffa" (Portogallo) e "lebbra" (Italia), si manifestano principalmente sui frutti e, in minor misura, su altri organi vegetativi quali foglie, rami e fiori (Graniti *et al.*, 1993; Moral *et al.*, 1999; Trapero Casas, 2003; Seergeva *et al.*, 2008; Seergeva *et al.*, 2008b; Moral *et al.*, 2009, Moral e Trapero, 2009). L'antracnosi dell'olivo è nota nella sua forma epidemica sin dal 1898 quando fu osservata e descritta per la prima volta in Portogallo da Almeida (1899) il quale attribuì all'alterazione il nome volgare di "gaffa". Fu

ritrovata in Grecia, a Corfù, da Petri (1930) e in Spagna dove si è rivelata particolarmente dannosa in Andalusia e sulle varietà tardive. In Italia la malattia fu segnalata per la prima volta da Ciccarone nel 1950 in Puglia, introdotta probabilmente da Grecia e Albania, e da lì si diffuse in seguito nelle altre regioni meridionali, quali Calabria e Sicilia, causando ingenti perdite di produzione per circa un ventennio (Ciccarone, 1950; Martelli, 1960). Negli anni successivi le epidemie iniziarono a regredire, sia in termini di diffusione sia di entità delle perdite provocate, in tutte le regioni meridionali ad eccezione di alcuni areali. L'antracnosi scomparve completamente o rimase presente solo sporadicamente in alcuni areali quali Puglia, Sardegna e Sicilia, mentre rimase endemica in Calabria, nella Piana di Gioia Tauro e nel vicino territorio del Vibonese, con fluttuazioni annuali di intensità e gravità d'infezioni influenzate dalla distribuzione e dall'intensità delle precipitazioni autunnali (Graniti *et al.*, 1993; Cacciola *et al.*, 1996). In anni recenti la malattia sembra ricomparsa con una certa gravità in numerosi areali. Segnalazioni crescenti si stanno registrando in ambienti in precedenza indenni dalla malattia come la Piana di Lamezia Terme e il Crotonese (Cacciola *et al.*, 1996). Inoltre, negli ultimi due anni, la malattia è ricomparsa in forma epidemica in Puglia, soprattutto nelle provincie di Brindisi e Lecce, con notevoli ripercussioni economiche (<http://it.paperblog.com/i-funghi-parassiti-dell-olivo-298068/>). Segnalazioni di focolai occasionali di antracnosi sono stati registrati anche in regioni dell'Italia centrale (Umbria) probabilmente a seguito d'introduzione di materiale vivaistico infetto (Agosteo *et al.*, 2003). In Spagna, gli attacchi più importanti sono registrati nella regione dell'Andalusia, dove si concentra il 65% della produzione, nelle provincie di Cordoba, Malaga-Sevilla e Granada (Moral e Trapero, 2009), e nella regione del sud della Catalogna (Martin e Garcia-Figueres, 1999). Trapero Casas (2003) riporta che nel periodo compreso fra il 1970 e il 1995, in coincidenza di una minore pluviometria, non si registrarono gravi epidemie, mentre nel 1997, in corrispondenza di una stagione autunnale piovosa e calda, si verificò una grave epidemia che causò la perdita totale della produzione con comparsa, per la prima volta, di sintomi di forti disseccamenti e defogliazioni della vegetazione associati all'antracnosi sino ad allora non evidenziati (Martin *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2005). Altra importante area caratterizzata da episodi di gravi epidemie di antracnosi è rappresentata dal Portogallo, e in particolar modo l'Algarve, dove la più importante cultivar *Galega* risulta essere

particolarmente suscettibile. Nel periodo compreso tra il 2004 e il 2007 si sono registrate epidemie fluttuanti fino ad avere picchi del 100% di attacco di antracnosi (Talhinhas *et al.*, 2005, 2009). In California l'antracnosi dell'olivo fu registrata per la prima volta nel 1941 su frutti della cv *Mission* (Michailides *et al.*, 2011). In Australia l'antracnosi dell'olivo è presente soprattutto negli areali caratterizzati da precipitazioni abbondanti durante la stagione estiva. La prima segnalazione riferibile a *C. gloeosporioides* è stata registrata nel 1969 nelle regioni del Nuovo Galles del Sud, Vittoria, Sud Australia e nel Queensland dove anche *C. acutatum* è stato individuato solo qualche anno più tardi (1989). Recentemente (2007), l'antracnosi è stata osservata anche in Australia occidentale e in Nuova Zelanda. Nel 2007 sono stati osservati per la prima volta sintomi su foglie e fiori di olivo delle cvs *Barnea* e *Manzanillo* (Seergeva *et al.*, 2011). Recentemente, in Tunisia sono stati segnalati attacchi occasionali di antracnosi sulle cvs *Manzalillo* e *Picholine* (Rhouma *et al.*, 2010), ma studi più approfonditi sembrano essere necessari per confermare questa segnalazione (Cacciola *et al.*, 2011).

2.1 Sintomi

I sintomi tipici dell'antracnosi si manifestano sui frutti dove il patogeno provoca principalmente la comparsa di lesioni necrotiche circolari, inizialmente depresse, di colore ocre o bruno, presenti nella zona apicale ma spesso anche in quella peduncolare, che in seguito confluiscono tra loro con conseguente marciume parziale o dell'intero pericarpo (Trapero Casas, 2003). Su frutti maturi si può osservare la presenza di imbrunimenti della polpa prima della comparsa dei sintomi sulla superficie esterna dell'epicarpo (Cacciola *et al.*, 2011). I frutti colpiti possono subire un processo di disidratazione, con raggrinzimento dei tessuti, e mummificare. Sulle drupe, in condizioni di elevata umidità, il fungo differenzia le tipiche fruttificazioni agamiche (gli acervuli) in un'abbondante matrice gelatinosa da cui fuoriescono ammassi sporiali in principio di colore roseo-arancio, poi bruno, conferendo al frutto il tipico aspetto di "aceituna japonosa" (letteralmente oliva saponosa) che, a loro volta, trasportati dall'acqua o da altri vettori, diffondono l'epidemia con andamento policiclico. I frutti colpiti vanno incontro a cascola precoce a causa di necrosi estese nella zona

peduncolare e, in misura minore, mummificano rimanendo sulla chioma e svolgendo un importante ruolo nella conservazione dell'inoculo per le successive infezioni (Trapero, 2003; Graniti *et al.*, 1993; Martelli, 1960). La cascola può essere anche conseguenza diretta di infezioni al peduncolo (Oliveira *et al.*, 2005). È stato dimostrato che la suscettibilità all'attacco della lebbra incrementa linearmente con la maturità dei frutti (Moral *et al.*, 2008) e il processo infettivo interessa in maggiore misura le porzioni basali della chioma, dove si riscontra un più alto tasso di umidità e maggiore presenza di inoculo proveniente dalle aree sovrastanti (Cacciola *et al.*, 2011). Su drupe mature può essere osservato l'imbrunimento della polpa ancora prima della comparsa dei sintomi sulla superficie esterna (Agosteo *et al.*, 2005). Sui frutti immaturi le infezioni sono meno frequenti, e sono correlate alla suscettibilità varietale, piuttosto che alla virulenza della popolazione del patogeno, e alla presenza di meccanismi di resistenza quali la presenza di composti fenolici dovuti proprio alla fase fenologica e sintomi si manifestano sotto forma di aree bruno-marcescenti localizzate generalmente all'estremità distale dei frutti colpiti (Graniti, 1956; Martelli, 1960; Moral *et al.*, 2008). Tuttavia è stato evidenziato, però, che nei frutti verdi l'infezione rimane quiescente fino alla maturazione e il periodo di latenza è inversamente correlato al momento dell'inoculazione, rappresentando un'importante fonte d'inoculo per epidemie autunnali (Moral e Trapero, 2009).

In Paesi come Grecia, Italia, Portogallo e, recentemente, Australia, le infezioni a carico delle foglie, dei germogli e dei rami sono abbastanza frequenti, come anche gli isolamenti del patogeno da questi tessuti (Graniti *et al.*, 1993; Talhinhos *et al.*, 2005; Seergeva *et al.*, 2008; Cacciola *et al.*, 2011). In Spagna inizialmente i sintomi della malattia sono stati osservati solo sulle drupe ma, in recenti attacchi epidemici, la malattia ha causato anche defogliazioni e deperimento di germogli e rami (Moral *et al.*, 2009). Le infezioni sulle foglie si manifestano sotto forma di piccole aree clorotiche con contorni irregolari localizzate presso i margini fogliari o lungo la nervatura centrale che tendono ad evolversi in ampie aree necrotiche con una colorazione bronzea o rosso-marrone. Le foglie infette avvizziscono, cadono precocemente con conseguente generale defogliazione della chioma e disseccamento dei rami e dei ramoscelli (Graniti *et al.*, 1993; Cacciola *et al.*, 1996; Seergeva *et al.*, 2008). Conidiomata possono essere osservati sotto forma di punti neri (Graniti *et al.*, 1993) e in condizioni di elevata

umidità possono svilupparsi sulla superficie fogliare gli acervuli (Seergeva *et al.*, 2008b). L'intensità dei sintomi sulla vegetazione varia in funzione della suscettibilità varietale, dalla stagione, e in generale, sono più frequenti a fine inverno o inizio primavera, ed è strettamente correlata all'intensità dei sintomi sulle drupe. Moral e Trapero. (2009) hanno dimostrato che la presenza dei frutti è necessaria per lo sviluppo di sintomi di antracnosi sulla vegetazione e che gravi infezioni sulle drupe possono portare alla massiccia defogliazione della pianta. La defogliazione e il generale deperimento delle piante colpite, insieme al basso isolamento dei patogeni da foglie e rami infetti, sembrano, infatti, essere correlate alla produzione di fitotossine da parte del fungo sulle drupe infette. Dati sperimentali confermano l'azione fitotossica di estratti sterili di *C. acutatum* su foglie e rami (Moral e Trapero, 2009, Moral *et al.*, 2009). *C. gloeosporioides*, ad esempio, produce una fitotossina, identificata da Ballio nel 1969 come *aspergillo-marasmina B*, derivata dalla *Lycomarasmín* (primo metabolita microbico studiato come fitotossina) che inibisce *in vitro* la crescita di giovani piantine, contribuendo allo sviluppo dei tipici sintomi dell'antracnosi (Walker e Templeton, 1978; Bailey *et al.*, 1992) ma il cui ruolo nella patogenesi dell'olivo non è stata ancora approfonditamente studiato (Moral e Trapero, 2009, Moral *et al.*, 2009; Cacciola *et al.*, 2011). In Italia, Grecia e Portogallo i sintomi sulla vegetazione sono considerati la principale fonte d'inoculo per le infezioni sui frutti in autunno (Cacciola *et al.*, 1996; Talhinas *et al.*, 2005) mentre in Spagna (Moral *et al.*, 2009) sono considerati effetti secondari di infezioni sui frutti. Tuttavia, nonostante queste considerazioni, il ruolo delle fasi epifite o delle infezioni latenti di *Colletotrichum* spp. su foglie, germogli e rami non è ancora chiaro.

In particolari condizioni climatiche, com'è stato riportato in osservazioni in Sud Africa da Gorter (1956), anche se il patogeno identificato era riferibile a *G. fructigenum* f. sp. *chromogenum*, e recentemente in Australia su cv *Barnea* e *Manzanillo* (Seergeva *et al.*, 2008a, 2011), in presenza di un'alta incidenza di inoculo, l'antracnosi può provocare la perdita totale dei fiori e delle infiorescenze compromettendo completamente l'allegagione e, quindi, la produzione successiva (Moral *et al.*, 2009). Studi condotti da Moral e Trapero (2009) hanno evidenziato, inoltre, che la suscettibilità delle *cultivar* alle infezioni fiorali non è correlata alla suscettibilità del frutto e tutte le *cultivar* possono essere colpite. I sintomi si manifestano con l'avvizzimento e il

disseccamento dei fiori, con successiva colatura. Normalmente la percentuale delle infiorescenze colpite dall'antracnosi risulta essere bassa (circa il 3%); ma, indirettamente, le infezioni su tali organi possono avere un'importante effetto secondario. Le drupe sviluppatesi a seguito delle infezioni fiorali manifestano sintomi di antracnosi con il procedere dei processi di maturazione rappresentando un'importante fonte d'inoculo nelle infezioni primarie dei frutti e nello sviluppo di epidemie autunno-invernali. Infatti è stato evidenziato che in *cultivar* sensibili un solo frutto per albero può produrre inoculo sufficiente ad infettare l'intero albero. Nei frutti in fase di sviluppo la malattia rimane allo stato latente sino al momento della maturazione, periodo di maggiore suscettibilità (Moral *et al.*, 2009).

Gli effetti delle infezioni causate dall'antracnosi si ripercuotono anche sulla produzione e la qualità degli oli ottenuti da frutti colpiti. Gli oli prodotti subiscono alterazioni delle caratteristiche organolettiche, come cambiamento del colore e del sapore, e chimiche quali aumento dell'acidità organica, aumento del numero dei perossidi, riduzione della parte sterolica e polifenolica (da 155 ppm nell'olio estratto da olive sane a 32 ppm nelle drupe infette) e α -tocoferoli che svolgono un ruolo importante per la stabilità dell'olio nel tempo aumentandone la loro *shelf life* (Cacciola *et al.*, 2001; Mincione 2004).

2.2. Agente causale dell'antracnosi dell'olivo

L'agente causale dell'antracnosi dell'olivo è stato descritto per la prima volta da Almeida (1899) in Portogallo come *Gloeosporium olivarum* Alm. In seguito, *G. olivarum* fu considerato sinonimo di *G. fructigenum*, patogeno del marciume amaro delle mele. Entrambe le specie furono ricondotte, in seguito a revisione sistematica, alla specie *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. *et* Sacc., anamorfo di *G. cingulata* (Stoneman) Spaulding *et* v. Schrenk (Sutton, 1992). In seguito, sulla base delle caratteristiche morfologiche e colturali (morfologia del micelio, colorazione, presenza di setole, presenza del telomorfo, tasso di crescita a differenti temperature, resistenza al *benomyl*, compatibilità vegetativa, etc.) e all'impiego di tecniche molecolari per la diagnosi e lo studio della variabilità genetica del genere *Colletotrichum* è stato evidenziato che l'antracnosi dell'olivo può essere ricondotta a *C. acutatum* J.H. Simmonds *ex* J.H.

Simmonds, telomorfo di *G. acutata* Guerber e J.C. Correll, e a *C. gloeosporioides* (Cacciola *et al.*, 1996; Martin e Garcia-Figueres 1999; Agosteo *et al.*, 2000; Talhinas *et al.*, 2004). Il telomorfo di *G. acutata* Guerber e J.C. Correll è stato ottenuto *in vitro* la prima volta da Guerber e Correl (2001) ed è stato recentemente osservato in natura in Norvegia su frutti di mirtillo (Faedda *et al.*, 2011); tuttavia non è stato mai osservato su olivo (Cacciola *et al.*, 2011). *G. cingulata* è stata osservata su foglie di olivo inoculate artificialmente (Cacciola *et al.*, 1996). Studi condotti in Spagna sui caratteri morfologici, analisi RFLP e delle regioni ITS hanno confermato che l'antracnosi dell'olivo è riconducibile alle due distinte specie di *Colletotrichum*, dimostrando anche che *C. acutatum* è la specie maggiormente presente in Catalogna, mentre *C. gloeosporioides* rappresenta un debole patogeno con comportamento saprofitario che si sviluppa sui frutti maturi (Martin e Garcia-Figueres, 1999; Moral *et al.*, 2008; Moral e Trapero, 2009). Anche in Portogallo studi basati sulla caratterizzazione morfologica degli isolati e sull'analisi delle regioni ITS del DNA ribosomiale e del gene della β *tubulina* 2 hanno evidenziato una netta prevalenza di *C. acutatum* (97%), sebbene gli isolati di *C. gloeosporioides* abbiano mostrato una virulenza simile a quella degli isolati di *C. acutatum* (Talhinas *et al.*, 2005).

Studi condotti in Italia mediante caratterizzazione morfologica, analisi dei profili degli isoenzimi e RAPD-PCR hanno evidenziato l'esistenza di tre differenti *taxa* associati alla lebbra dell'olivo. Oltre a *C. acutatum sensu stricto* (*s. s.*), cui possono essere ricondotti gli isolati provenienti dal Portogallo e della Spagna, e a *C. gloeosporioides sensu stricto* (*s. s.*), cui appartengono alcuni isolati provenienti dalla Sicilia (Scarito *et al.*, 2003) e dalla Puglia, è stato, infatti, identificato un terzo gruppo, nettamente prevalente in Italia, con isolati aventi caratteristiche morfologiche più simili a *C. acutatum*, ma chiaramente distinguibili dagli isolati portoghesi e spagnoli (Agosteo *et al.*, 2000; Cacciola *et al.*, 2007). Tuttavia l'uso combinato di strumenti molecolari tra cui analisi filogenetiche basate sull'uso delle regioni ITS del DNA ribosomiale, del gene della β *tubulina*, dei geni GS, GPDH, profili RAPD e analisi RFLP del DNA mitocondriale (mtDNA), hanno evidenziato una notevole eterogeneità nell'ambito di *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* avviando un processo di profonda revisione nella classificazione di questi importanti agenti fitopatogeni (Lardner *et al.*, 1999; Sreenivasaprasad e Talhinas, 2005; Liu *et al.*, 2007; Hyde *et al.*, 2009). Questo

processo risulta particolarmente complesso a causa dei pochi e variabili caratteri morfologici distintivi, assunti come criteri tassonomici, dell'ampia gamma di ospiti e della frequente erronea nomenclatura nelle sequenze depositate in *GenBank* (Cai *et al.*, 2009, Hyde *et al.*, 2009).

C. gloeosporioides sensu von Arx o *C. gloeosporioides sensu lato*, rappresenta un complesso di specie geneticamente eterogeneo, con ampia gamma di ospiti, alla quale sono stati associati come sinonimi circa 600 specie e molti *taxa* (Sutton, 1992). In seguito alla revisione di von Arx, con la quale molte specie sinonime venivano separate, Sutton (1992) ha differenziato *C. gloeosporioides sensu stricto* dalle altre sette forme speciali indicate come *C. gloeosporioides sensu lato* (Moriwaki *et al.*, 2003)

Photita *et al.* (2005), sulla base di studi morfologici e molecolari, ha distinto *C. gloeosporioides s.l.* in cinque morfo-gruppi: *C. musae*, *C. truncatum*, e *C. gloeosporioides* gruppo 1, *C. gloeosporioides* gruppo 2, *C. gloeosporioides* gruppo 3. In seguito altre specie sono state formalmente descritte tra cui *C. asianum*, *C. siamense*, *C. fructicola* e *C. cordylinicola* (Prihastuti *et al.* 2009) oltre che *C. gloeosporioides s.s.*, *C. horii* e *C. musae* (Cai *et al.*, 2011). Alcuni *taxa*, tra cui *C. kahawae* e *C. fragariae*, sono stati recentemente indicati come sottogruppi del complesso *C. gloeosporioides s.l.* (Hyde *et al.*, 2009), ma questa collocazione non appare condivisa da tutti gli studiosi (Prihastuti *et al.* 2009). Il complesso *C. gloeosporioides s.l.* è attualmente oggetto di intensa ricerca filogenetica (Hyde *et al.*, 2009).

Come per *C. gloeosporioides*, studi condotti sinora evidenziano che la specie *C. acutatum s.l.*, distinzione introdotta da Johnston e Jones, costituisce un complesso di specie che mostrano elevata eterogeneità filogenetica e morfologica (Lardner *et al.*, 1999; Guerber *et al.*, 2003; Sreenivasaprasad e Talhinhas, 2005; Shivas e Tan, 2009; Hyde *et al.*, 2009). Attraverso l'analisi RAPD della compatibilità vegetativa e caratteri morfologici, Lardner *et al.* (1999) hanno distinto *C. acutatum u s.l.* in sette diversi *taxa* con cinque gruppi geneticamente e morfologicamente omogenei, indicati come gruppi A, B, C, D, E, e due specie distinte, indicate come *Glomerella miyabeana* (Fukushi) Arx e *C. acutatum* f.sp. *pineum* Dingley et J.W. Gilmour.

Recentemente, attraverso l'analisi delle regioni ITS del rDNA ribosomiale, gene *β -tubulina2*, gene GS, GDPH e RAPD-PCR, sono stati identificati nove differenti

gruppi (A1-A9) accomunati da caratteristiche morfologiche e genetiche oltre che da ospiti vegetali e distribuzione geografica (Sreenivasaprasad e Talhinhos, 2005; Whitelaw-Weckert *et al.*, 2007; Shivas and Tan, 2009). Due di questi gruppi (A2 e A3) sono stati successivamente elevati a specie indipendenti ed hanno ricevuto i nomi di *C. fioriniae* comb. et stat. nov e *C. simmondsii* sp. nov. (Shivas e Tan, 2009). Come riportato da questi Autori i gruppi A2, A3, A4, A5 e A6 e A9 sono stati tutti associati all'olivo.

I dati attualmente disponibili indicano che nelle diverse aree olivicole del mondo c'è normalmente una prevalenza di un gruppo rispetto agli altri. Ad esempio, in Portogallo, dove *C. acutatum s.l.* è la specie dominante (97% della popolazione esaminata), il gruppo genetico A2 è quello ampiamente prevalente (Talhinhos *et al.*, 2005) anche se è stata evidenziata una notevole eterogeneità nella distribuzione geografica e nella frequenza delle popolazioni di *Colletotrichum* spp. associate all'antracnosi dell'olivo. Tuttavia in Algarve otto differenti popolazioni di *Colletotrichum* spp. sono state isolate e nessuna di queste prevaleva sulle altre. Questi dati suggeriscono che l'Algarve può rappresentare un centro di diversità dei patogeni legati all'antracnosi dell'olivo. Complessivamente in Portogallo la popolazione patogena è rappresentata principalmente da *C. acutatum* gruppo genetico A2 (*C. simmondsii*), riscontrata con una frequenza dell' 80%, seguita dal gruppo A4 (12%) e gruppo A5 (*C. acutatum s.s.*) con *C. gloeosporioides*, con una frequenza del 3-4%; mentre i gruppi A3 (*C. fioriniae*) e A6 di *C. acutatum* sono stati isolati sporadicamente. I modelli previsionali sviluppati, inoltre, suggeriscono che le popolazioni di *C. acutatum s. l.* sono più stabili, mentre *C. gloeosporioides s.s.* sembra essere più influenzato dalle condizioni ambientali (Talhinhos *et al.*, 2009). In Spagna, nella regione della Catalogna, sembra prevalere la popolazione di *C. acutatum* del gruppo A2, mentre in Andalusia il gruppo A4 è quello più diffuso (Oliveira *et al.*, 2005; Moral *et al.*, 2007; Moral *et al.*, 2008; Moral *et al.*, 2009; Talhinhos *et al.*, 2009). In Australia il gruppo A9 è riscontrato su vite (Whitelaw-Weckert *et al.*, 2007) ma non sono disponibili dati accurati su olivo; mentre in Sudafrica è maggiormente presente il gruppo A5 (Talhinhos *et al.*, 2009).

In Italia gli studi indicano che differenti specie di *Colletotrichum* spp. sono associate all'antracnosi dell'olivo, e le popolazioni più frequentemente riscontrate

possono essere ricondotte alla specie di *C. acutatum* s.l. gruppo A4 che presenta, oltre all'olivo, un'ampia gamma di ospiti quali: *Rubus*, *Ceanothus*, *Hordeum*, *Lycopersicon*, *Fragaria*, *Vitis*, *Hepatica*, *Juglans*, *Primula*, *Camelia*, *Eriobotrya*, *Bergenia*, e *Sambucus*, mentre *C. gloeosporioides* risulta essere diffuso solo in Sicilia. Il gruppo A2 (*C. simmondsii*), pur rappresentando il comune agente causale dell'antracnosi della fragola in differenti regioni italiane, tra cui Puglia e Calabria, non è stato mai associato all'olivo. Allo stesso modo il gruppo A5 è stato identificato come agente causale dell'antracnosi di oleandro, ma non è stato riscontrato su olivo. Recentemente *C. acutatum* s. l. gruppo A4, associato all'antracnosi dell'olivo in areali differenti dall'Italia, ma anche in Grecia, Montenegro, Sud Africa, Australia Andalusia è stato identificato come specie a se stante, classificata *C. clavatum* sp. nov. G.E Agosteo, Faedda e S.O. Cacciola, sulla base dei caratteri morfologici e dei molteplici marcatori molecolari (Faedda *et al.*, 2011). Nel complesso questi studi indicano che differenti specie di *Colletotrichum* spp. sono associate all'antracnosi dell'olivo nel panorama mondiale e alcuni gruppi sembrano essere diffusi solo in determinate aree geografiche. Nuovi studi dovranno essere condotti per chiarire la biologia, l'ecologia e la distribuzione geografica delle popolazioni di *Colletotrichum* spp. responsabili dell'antracnosi.

2.3. Ciclo della malattia

L'antracnosi dell'olivo rappresenta una delle più importanti malattie di questa coltura in tutto il mondo. L'incidenza e la gravità dell'antracnosi variano in funzione delle condizioni ambientali, della suscettibilità varietale e della virulenza della popolazione del patogeno. In condizioni favorevoli, la malattia può portare a perdite elevate di produzione. In Spagna le perdite causate da *Colletotrichum* spp. superano annualmente i 93 milioni di dollari (Moral *et al.*, 2009, Moral e Traperò, 2009). Nonostante la sua importanza, il ciclo patogenetico dell'antracnosi dell'olivo non è ancora perfettamente conosciuto. Mateo-Sagasta (1968) indicò che il fungo poteva sopravvivere sulle drupe mummificate o cadute sulla superficie del suolo, costituendo la fonte d'inoculo principale per le infezioni autunnali. Graniti *et al.* (1993) considerarono, invece, che il fungo sopravviveva durante l'inverno esclusivamente sulle drupe

mummificate sull'albero, mentre quelle cadute sulla superficie del suolo essendo interrato durante le coltivazioni o distrutte da insetti invasori secondari, non costituiscono un'importante fonte di inoculo. Secondo questa ipotesi il fungo può rimanere in forma epifitica sulle foglie durante tutto l'anno fungendo da inoculo per le infezioni invernali o primaverili sui giovani frutti (Trapero Casas, 2003; Moral *et al.*, 2009). In Italia, Grecia e Portogallo frequenti isolamenti del patogeno dalla vegetazione suggeriscono che quest'ultima rappresenti la principale fonte di inoculo per le infezioni sui frutti in autunno (Cacciola *et al.*, 1996; Talhinas *et al.*, 2005). In disaccordo con questa ipotesi, la presenza dei frutti è considerata condizione indispensabile per lo sviluppo di attacchi sulla vegetazione in Spagna (Moral *et al.*, 2009). In condizioni sperimentali è stato evidenziato che l'infezione primaria si verifica sull'infiorescenza e sul primo stadio fenologico del frutto durante la primavera con lo sviluppo di infezioni latenti (Moral e Trapero., 2009). Infezioni asintomatiche fiorali sono state riportate anche in Australia (Sergeeva *et al.*, 2008a; Seergeva *et al.*, 2011). Talhinas *et al.* (2011) hanno riscontrato che foglie e rami dell'anno (rami di 1 anno) rappresentano importanti serbatoi di inoculo a breve termine, mentre la vegetazione di più anni funge da serbatoio di inoculo a lungo termine. Tuttavia, nonostante queste considerazioni, il ruolo delle fasi epifite o delle infezioni latenti di *Colletotrichum* spp. su drupe, foglie e fiori non è ancora chiaro.

Condizione essenziale per lo sviluppo dei sintomi dell'antracnosi è la presenza di elevati valori di umidità. Le infezioni sulle drupe sono favorite da temperature miti e precipitazioni abbondanti, condizioni che si verificano normalmente in autunno mentre le infezioni sugli altri organi vegetativi, quali foglie e fiori, sono favorite nelle stagioni primaverili caratterizzate da elevata umidità e/o piovosità accompagnata da clima mite (Trapero Casas, 2003).

I meccanismi biochimici e genetici che regolano le interazioni ospite-patogeno sono stati studiati in altri *Colletotrichum-pathosystems* (Bailey *et al.* 1992; Perfect *et al.*, 1999) mentre poco si conosce del processo d'infezione specifico dell'antracnosi dell'olivo (Gomes *et al.*, 2009). L'agente patogeno si conserva sotto forma di periteci, di micelio o di conidi nei frutti marciti, nei semi e in generale nei residui vegetali infettati nella precedente stagione vegetativa (Agrios, 2005). Nell'epidemiologia della malattia, i conidi rappresentano sicuramente la principale fonte d'inoculo, poiché il telomorfo *G.*

cingulata (Stoneman) Spauld. et Schrenk è stato solo saltuariamente osservato su foglie di olivo (Cacciola *et al.*, 1996) mentre *G. acutata* non è stata ancora mai osservata su questo ospite (Trapero Casas, 2003; Oliveira *et al.*, 2005; Faedda *et al.* 2011). I conidi sono prodotti dagli acervuli in una matrice mucillaginosa idrosolubile, composta di glicoproteine, alcune delle quali ricche di prolina (Perfect *et al.*, 1999) e mannoproteine, responsabili dell'idrofobicità sulla superficie cellulare e l'adesione sull'ospite (Rodríguez-López *et al.*, 2009). Questa matrice è costituita anche da enzimi che impediscono la germinazione prematura dei conidi (in *C. gloeosporioides* è stato identificata una sostanza proteica denominata "*gloeosporona*") proteggendoli dalla disidratazione e dall'azione tossica dei metaboliti prodotti dall'ospite e garantendo la distribuzione dell'inoculo (Bailey *et al.*, 1992; Perfect *et al.*, 1999). Un'altra importante funzione della matrice potrebbe essere collegata al processo di patogenesi, in quanto la presenza di enzimi quali *cutinasi* e *cellulasi* potrebbero favorire la penetrazione nell'ospite. Tuttavia, non vi è alcuna certezza che tali componenti siano identici nelle varie specie di *Colletotrichum* spp. (Bailey *et al.*, 1992). La sporulazione richiede la presenza di U.R. elevata, superiore al 90%, necessaria all'idrolisi della matrice e la dispersione degli stessi conidi nell'atmosfera attraverso l'azione diretta della pioggia e/o l'aerosol trasportato dal vento (Trapero Casas, 2003).

Gli stadi iniziali del processo infettivo richiedono: l'adesione dei conidi alla superficie della pianta, la germinazione, la formazione del tubo germinativo e la formazione dell'appressorio melanizzato (Bailey *et al.*, 1992). L'adesione dei conidi sulla superficie dell'ospite e il contatto con la cuticola rappresentano le condizioni essenziali nel processo d'interazione pianta-patogeno, ed sono modulate da specifici segnali esterni come la presenza di cere cuticolari, proteine idrofobiche e acqua, quest'ultima necessaria alla germinazione dei conidi sulla superficie dell'ospite (Perfect *et al.*, 1999) e il rilascio di etilene (Rodríguez-López *et al.*, 2009). Conidi possono germinare anche sulla superficie delle foglie ma, a causa della presenza di tricomi, non riescono a penetrare la cuticola (Talhinhas *et al.*, 2011). Studi condotti da Gomes *et al.* (2009), su tre *cultivar* di olivo hanno evidenziato che la germinazione dei conidi sulle drupe avviene dopo circa 48 ore. Alla germinazione i conidi emettono un tubo germinativo, di lunghezza variabile, che nella parte distale differenzia l'appressorio melanizzato, dal quale si sviluppa lo stiletto di penetrazione. L'appressorio è

fondamentale per la penetrazione nell'ospite poiché favorisce l'adesione alla superficie della drupa e fornisce la forza meccanica e gli enzimi necessari per la penetrazione iniziale. La bassa incidenza della malattia può essere collegata ad uno sviluppo inferiore di appressori. In condizioni ambientali favorevoli, la germinazione dei conidi e la formazione del tubo germinativo possono avvenire in poche ore, anche se sull'oliva, sembrano essere ritardati probabilmente a causa della composizione della cuticola che presenta un alto contenuto di lipidi che costituiscono una barriera per l'adesione iniziale dei conidi. Altro possibile fattore che può influenzare questa fase è la quantità di acqua presente sulla superficie del frutto (Gomes *et al.*, 2009). La penetrazione dell'ospite può, però, avvenire anche senza la formazione dell'appressorio, ma con meccanismi basati sulla forza meccanica, la secrezione di enzimi degradativi della cuticola o entrambe le strategie. La formazione dell'appressorio viene influenzata da diversi fattori come: gradienti di pH, variazioni di temperatura, disponibilità di acqua, presenza di nutrienti (Bailey *et al.*, 1992). Le variazioni del pH e del contenuto di azoto da parte dell'ospite rappresentano segnali di attivazione della secrezione di ammoniaca da parte del fungo. Il graduale aumento del pH (da 5 a 8) nella zona di infezione provoca la secrezione di *poligalatturonasi* (PG) e di *pectato liasi* (PL). L'attivazione della secrezione di PL da parte del gene *pelB* (*pectato liasi B*) stimola l'accumulo di ammoniaca da parte del fungo, comportando un aumento del valore del pH con conseguente incremento della virulenza di *C. gloeosporioides* e lo spostamento dalla fase emibiotrofa a quella necrotrofa (Prusky *et al.*, 2001; Rodríguez-López *et al.*, 2009). Il fungo, grazie alla produzione di una cutinasi extracellulare, può penetrare direttamente all'interno dei tessuti sani o attraverso aperture naturali (stomi, lenticelle) o soluzioni di continuità causate da ferite come quelle create dalle punture di ovideposizione di mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae* Gmelin). È stata infatti osservata una correlazione tra l'incidenza della malattia e gli attacchi della mosca, sia per l'azione diretta delle punture di ovideposizione nel pericarpo sia perché l'insetto funge da vettore d'inoculo (Trapero Casas, 2003; Seergeva e Spooner-Hart, 2010).

Due differenti strategie d'infezione possono essere messe in atto dalle specie di *Colletotrichum*: emibiotrofa e necrotrofa. Superata la cuticola, infatti, il fungo può rimanere a lungo latente (senza manifestare i sintomi) con lo sviluppo di un micelio sotto cuticolare all'interno delle pareti periclinali delle cellule epidermiche

(comportamento emibiotrofo) o penetrare direttamente la parete cellulare (necrotrofo). Generalmente, i due processi sono consequenziali. Nella fase emibiotrofa, fase asintomatica, il patogeno può penetrare la parete cellulare e crescere nel lume cellulare, fase definita “intracellulare”, o crescere al di sotto della cuticola e causare lo sfaldamento delle pareti cellulari, fase definita “intradermica-sotto-cuticolare”. Nella fase emibiotrofa intradermica sotto-cuticolare, il fungo cresce esclusivamente sotto la cuticola e fra le mura periclinali e anticlinali delle cellule epidermiche, non entrando nel lume delle cellule sottostanti (Bailey *et al.*, 1992). In questa fase il volume dell’ifa iniziale, ifa infradermica, aumenta fino a 200 volte e forma una vescicola che indica l’acquisizione delle sostanze nutritive dall’ospite (Rodríguez-López *et al.*, 2009). Nella fase intracellulare, le ife invadono il lume cellulare senza interrompere il plasmalemma o i protoplasti dell’ospite. Una volta che l’agente patogeno ha invaso le cellule ospiti, il mesocarpo è colonizzato completamente da ife secondarie, inter e intracellulari, che portano al collasso delle cellule causando la disidratazione dei tessuti con conseguente comparsa delle lesioni e delle necrosi (Gomes *et al.*, 2009). Spesso nella fase necrotrofa è possibile evidenziare che le cuticole dei tessuti colpiti rimangono intatte a seguito dell’inibizione delle cutinasi. In aggiunta ai vari enzimi, quali cutinasi, PG e PL, che possono agevolare la degradazione dei tessuti, nelle infezioni da *C. gloeosporioides* è stata isolata l’*aspergillo-marasmina* che sembra inibire la crescita di giovani piante e contribuire allo sviluppo dei sintomi tipici dell’antracnosi (Bailey *et al.*, 1992). Nessuna correlazione è stata individuata, tuttavia, tra la suscettibilità varietale e le strategie di infezione adottate dal patogeno (Gomes *et al.*, 2009). In condizioni ambientali favorevoli, il periodo di latenza del patogeno è di 4-5 giorni, permettendo così al patogeno di poter originare gravi epidemie con numerosi cicli d’infezione secondari. Infatti, con temperature comprese fra 10 e 30°C con U.R. superiore al 90%, il patogeno, dopo aver colonizzato i tessuti dell’ospite, inizia a produrre acervuli appena sotto la cuticola, provocandone la lesione, e favorendo la fuoriuscita dei conidi responsabili di successive infezioni (Trapero Casas, 2003). Le infezioni a carico di giovani tessuti, come frutti immaturi, rimangono generalmente latenti fino al raggiungimento di una determinata fase di sviluppo e di maturità del tessuto ospite, per poi svilupparsi velocemente con meccanismo necrotrofo. In generale, la suscettibilità delle drupe all’antracnosi aumenta con il procedere del processo di maturazione, anche se le

cultivar suscettibili possono manifestare sintomi sui frutti anche allo stadio fenologico verde (Moral *et al.*, 2007; Moral *et al.*, 2009, Moral e Trapero, 2009) o rimanere quiescenti (Moral *et al.*, 2008). L'incidenza e la gravità dell'antracnosi variano considerevolmente in funzione delle condizioni ambientali, la suscettibilità della *cultivar*, la virulenza della popolazione del patogeno. Sebbene, infatti, le infezioni possano aver luogo durante gran parte dell'anno, normalmente sono più frequenti in autunno-inizio inverno, quando le condizioni ambientali più favorevoli (elevate precipitazioni, temperatura compresa tra 10 e 15°C, elevato densità di inoculo) e gravi attacchi da parte della mosca dell'olivo determinano, attraverso un'abbondante sporulazione e una riduzione del periodo d'incubazione, un considerevole aumento della massa di inoculo del patogeno e possono portare a una perdita totale della produzione com'è avvenuto in alcuni areali della Spagna, del Portogallo e della Piana di Gioia Tauro (Cacciola *et al.*, 2011). Allo stato attuale non vi sono ulteriori studi dettagliati per la descrizione del processo di infezione di *Colletotrichum* spp. su olivo.

2.4. Lotta

Negli ambienti in cui i fattori climatici e la struttura degli oliveti determinano condizioni estremamente favorevoli allo sviluppo epidemico del patogeno, la lotta contro l'antracnosi risulta particolarmente difficile, ed in genere poco efficace, a causa della maggiore difficoltà nell'applicazione di metodi di lotta preventivi e curativi. La potatura è molto utile per ridurre la quantità di inoculo nella chioma poiché favorisce la ventilazione e permette l'allontanamento delle drupe mummificate nella vegetazione. Nelle zone in cui gli attacchi si manifestano sui rami è consigliata l'eliminazione dei rami colpiti. La scelta della varietà per l'allestimento di nuovi impianti, come quelli ad elevata densità, sembra rivestire notevole importanza nella lotta all'antracnosi dell'olivo. Non sono note, purtroppo, varietà completamente immuni all'antracnosi, tuttavia sono stati osservati comportamenti differenti fra le diverse varietà. In Spagna, sulla base delle osservazioni in campo e il confronto con dati sperimentali in laboratorio, 21 *cultivar* sono state esaminate e classificate in tre categorie: altamente suscettibili (*Cornicaba*, *Hojiblanca*, *Lechín de Sevilla*, *Manzanilla de Seviglia*, *Morona*, *Ocal*, *Picudo* e *Verdial de Huévar*), mediamente suscettibili (*Arbequina*, *Arbosana*,

Morrut, Pajarero e Villalonga) e resistenti (*Blanqueta, Empeltre, Frantoio, Koroneiki, Leccino, Morona-D, Picual e Razzola*) (Moral *et al.*, 2008). In Italia, sulla base di osservazioni in campo, sono state individuate *cultivar* altamente suscettibili (*Ottobratica*), suscettibili ad altamente suscettibili (*Corniola*), suscettibili (*Itrana, Sinopolese, Tondina, Carolea*), moderatamente suscettibili (*Cassanese e Leccino*) e resistenti (*Santomauro*) (Cacciola *et al.*, 2011). Per alcune di queste varietà, per le quali sono stati condotti studi sulla suscettibilità, sono emersi dati contrastanti rispetto ai risultati ottenuti in condizioni sperimentali. In Argentina, la *cultivar Frantoio* è stata segnalata come molto sensibile mentre in Spagna e Italia è considerata resistente (Moral *et al.*, 2008; Moral e Trapero, 2009, Moral *et al.*, 2009). In Andalusia, gravi epidemie sono state registrate nelle *cv Hojiblanca e Picudo* mentre nello studio di Moral e Trapero (2009) vengono considerate resistenti. Altri casi riguardano la *cv Picual*, la principale *cultivar* dell'Andalusia, che, pur essendo considerata resistente, è soggetta ad attacchi moderati quando viene coltivata in impianti misti a varietà sensibili. Questi risultati contrastanti possono essere dovuti in parte ad una non corretta identificazione della varietà, a differenze di virulenza nella popolazione patogena o a differenti condizioni ambientali rispetto a dove si sono realizzate le osservazioni sperimentali. Altro fattore importante che può influenzare la suscettibilità all'antracnosi è il tempo di maturazione delle *cultivar*. La maggiore incidenza di antracnosi in *cultivar* tardive può probabilmente derivare da una raccolta ritardata, con drupe sovra mature, mentre le *cultivar* precoci possono sfuggire all'attacco dell'antracnosi poiché vengono raccolte in autunno. In linea generale la raccolta va effettuata prima che i frutti siano completamente maturi, poiché con il procedere della maturazione, anche in *cultivar* resistenti, aumenta la suscettibilità all'antracnosi (Moral *et al.*, 2008; Moral e Trapero, 2009). Altro importante fattore per ridurre l'incidenza delle infezioni dell'antracnosi sulle drupe è l'attuazione di interventi di lotta contro la mosca dell'olivo, poiché gli attacchi predispongono alle infezioni da *Colletotricum* spp. L'applicazione di fungicidi per proteggere i frutti dalle infezioni rimane comunque la principale e più diffusa strategia di lotta. Vengono principalmente utilizzati prodotti cuprici da soli o in miscela con fungicidi organici, al fine di ridurre lo sviluppo delle infezioni evitando forti defogliazioni. Due o tre trattamenti cuprici preventivi, nel periodo compreso tra settembre e dicembre, riducono fortemente lo sviluppo della malattia sulle drupe.

Trattamenti primaverili riducono lo sviluppo di infezioni fiorali e quindi, indirettamente, riducono lo sviluppo di infezioni autunnali e quelle dalla favorite da infestazioni di *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugh. Ottimi risultati si sono registrati con trattamenti con prodotti a base di poltiglia bordolese o ossicloruro di rame. I fungicidi rameici rimangono i più utilizzati per la loro lunga persistenza e l'ampio spettro di attività contro funghi e batteri (Graniti *et al.*, 2003). Le recenti disposizioni comunitarie in materia ambientale hanno, però, ristretto l'uso dei prodotti rameici a causa della tossicità degli ioni Cu^{2+} e dei suoi effetti sul suolo e sulle acque, stimolando la ricerca di fungicidi alternativi a basso impatto ambientale. In Calabria sono state condotte prove in campo sulla *cultivar* *Cassanese* e *Ottobratica* con nuovi composti quali: *azoxystrobin*, *trifloxystrobin*, formulato terpenico di idrossido di rame, rame peptidate, bicarbonato di sodio e un ossidante del cloro elettrolitico. Tutti i prodotti, ad eccezione di *trifloxystrobin*, hanno ridotto significativamente lo sviluppo dell'antracnosi sulle drupe ma hanno evidenziato una diversa risposta varietale. L'efficacia dei composti a base di *azoxystrobin* è paragonabile a quello di composti di rame, mentre il bicarbonato di sodio e l'ossido di cloro elettrolitico, pur essendo meno efficaci, risultano meno tossici e hanno minori tempi di carenza, permettendo trattamenti anche in prossimità della raccolta delle drupe. Temporaneamente, con il decreto del 4 luglio 2001, il Ministero della Salute ha autorizzato l'uso del QoI *pyraclostrobin*. Tuttavia, in Calabria una singola applicazione è risultata poco efficace nel prevenire epidemie di antracnosi in condizioni ambientali favorevoli (Cacciola *et al.*, 2011). In Australia il governo ha temporaneamente autorizzato l'uso di prodotti a base di *azossistrobina* (prodotto commerciale *Amistar*, Zeneca) prima della fioritura e dell'allegagione, risultando particolarmente efficaci contro l'antracnosi (Seergeva *et al.*, 2011). Altri fungicidi utilizzati sono il *mancozeb* e il *chlorthalonil*. Inoltre, in condizioni sperimentali, sono risultati efficaci i prodotti a base di *ziram*, *miclobutanil*, *metiram* e *exaconazole*, ma il cui utilizzo sull'olivo non è consentito in Europa (Cacciola *et al.*, 2011). In generale l'efficacia della lotta chimica può risultare variabile per effetto delle differenti condizioni ambientali che si possono riscontrare nelle aree olivicole e dei differenti livelli di virulenza nelle popolazioni dei patogeni.

3. Metodi per l'identificazione di funghi appartenenti al genere *Colletotrichum* spp.

Il genere *Colletotrichum* Corda raggruppa numerose specie fungine di rilevante importanza economica responsabili di gravi malattie, note con il nome di antracnosi, in numerosissime specie vegetali distribuite nelle regioni tropicali, subtropicali e temperate (Freeman *et al.*, 1998; Peres *et al.*, 2005; Sreenivasaprasad e Talhinhos., 2005; Hyde *et al.*, 2009a). Il loro notevole impatto economico ha portato allo sviluppo di estesi studi sui diversi aspetti della biologia delle malattie da esse causate come: specificità d'ospite, interazioni ospite-fungo, diversità genetica delle popolazioni ed epidemiologia delle malattie (Wharton e Diéguez-Uribeondo, 2004). Tradizionalmente, l'identificazione e la caratterizzazione di specie di *Colletotrichum* spp. è stata basata sullo studio dei caratteri morfologici e colturali. Questi criteri, però, non sono sempre adeguati per l'identificazione delle specie a causa della frequente sovrapposizione dei caratteri e l'esistenza di variabilità fenotipica tra le specie in funzione delle diverse condizioni ambientali (Sutton *et al.*, 1992; Adaskaveg e Hartin, 1997; Freeman *et al.*, 1998; Than *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2009). Infatti, sebbene siano stati ampiamente utilizzati in passato come elementi distintivi, questi criteri non hanno, ad esempio, consentito la differenziazione delle specie nell'ambito di *C. acutatum* s.l. e *C. gloeosporioides* s.l., a causa della loro elevata variabilità fenotipica e della sovrapposizione dei caratteri morfologici e colturali oltre che degli ospiti (Guerber *et al.*, 2003). I metodi tradizionali di identificazione possono essere efficacemente integrati con l'uso crescente di metodi molecolari che, essendo basati sull'analisi del DNA, non sono soggetti a cambiamenti nel tempo e nello spazio e risultano molto più affidabili. L'utilizzo integrato di differenti approcci in anni recenti ha significativamente contribuito alla comprensione della complessità tassonomica nell'ambito del genere *Colletotrichum* sebbene molti aspetti restino da chiarire (Freeman *et al.*, 1998; Moriwaki *et al.*, 2002; Sreenivasaprasad et Talhinhos, 2005; Cai *et al.*, 2009, Photita *et al.*, 2005; Than *et al.*, 2008; Hyde *et al.*, 2009).

3.1 Metodi tradizionali

Tradizionalmente l'identificazione delle popolazioni appartenenti al genere *Colletotrichum* è stata realizzata con l'ausilio di differenti criteri morfologici e colturali, oltre che con lo studio della compatibilità

vegetativa (Sutton, 1992). Tra i criteri morfologici sono stati presi in considerazione, su differenti substrati colturali (naturali e artificiali), forma e dimensione di rami conidiofori, dei conidi, presenza/assenza delle setole, la forma e la dimensione degli appressori, oltre che le caratteristiche del teleomorfo, quando disponibile e/o noto. I criteri colturali maggiormente impiegati per la caratterizzazione di *Colletotrichum* spp. sono la velocità di crescita delle colonie a differenti temperature e su diversi substrati colturali, la compatibilità vegetativa e la sensibilità al fungicida *benomyl*.

3.1.1. Caratteri morfologici

Il micelio del *C. acutatum* s.l. su substrato colturale agar patata destrosio (PDA) generalmente forma delle colonie di colore variabile dal bianco al grigio e al grigio-salmone che si ricoprono di masse conidiche di colore rosa, rosa-salmone o arancio (Peres *et al.*, 2005). I conidi sono di forma fusiforme o ellittici, affusolati alla base e all'apice, con dimensioni di 8,5-16,5 x 2,5-4 micron e raramente presentano setole (Freeman *et al.*, 1998). Gli sclerozi sono assenti ma sono presenti appressori di forma obovata, ovata, clavata o leggermente irregolare, con margini interi o leggermente lobati di colore variabile dal marrone chiaro al marrone scuro e di dimensioni 8,5-10 x 4,5-6 micron (Sutton, 1992; Adaskaveg e Hartin, 1997). Il tasso di crescita è di circa 8-9 mm/g con una temperatura ottimale di 24°C (Adaskaveg e Hartin, 1997; Peres *et al.*, 2004; Talhinhos *et al.*, 2005). Il micelio di *C. gloeosporioides* s.l. su PDA assume colorazioni variabili dal bianco chiaro al grigio scuro, con tendenza ad inscurirsi per la formazione dei conidiomata. Le setole sono presenti mentre gli sclerozi sono assenti (Sutton *et al.*, 1992). I conidi sono di forma oblunga, con le estremità arrotondate e di dimensioni variabili da 4 a 7 micron (Freeman *et al.*, 1998). Il tasso di crescita è di circa 13-14 mm/g con una temperatura ottimale di crescita di $27 \pm 1^\circ\text{C}$ (Freeman *et al.*, 1995; Adaskaveg e Hartin, 1997; Peres *et al.*, 2004). Le caratteristiche della forma sessuata

(*Glomerella*) possono rappresentare un valido strumento nella differenziazione delle specie, ma il teleomorfo viene osservato solo raramente. Tuttavia, i soli criteri morfologici e colturali raramente consentono l'identificazione univoca dei *taxa* nell'ambito del genere *Colletotrichum*, poiché non sempre sono diretta espressione dell'evoluzione ed inoltre presentano una certa plasticità, in quanto possono cambiare in funzione delle condizioni ambientali, delle condizioni sperimentali, dei substrati e delle temperature utilizzate. Tutto questo contribuisce ad incrementare la variabilità in un genere di per sé estremamente eterogeneo rendendo la caratterizzazione su base morfologica estremamente difficile (Sutton 1992; Freeman *et al.*, 1998; Peres *et al.*, 2005). Tuttavia, i caratteri morfologici vengono ancora considerati indispensabili per lo studio delle specie di *Colletotrichum* spp. (Lardner *et al.*, 1999), sebbene l'adozione di criteri standardizzati per consentire la comparazione di dati ottenuti in diversi laboratori ed in diversi momenti sembra essere indispensabile (Cai *et al.*, 2009).

3.1.2. Caratteri colturali

3.1.2.1. Sensibilità al *benomyl*

La sensibilità *in vitro* a *benomyl* è un semplice test che negli anni è stato ampiamente utilizzato per differenziare isolati di *C. acutatum* s. l. da *C. gloeosporioides* s. l.. Il differente comportamento nei confronti del principio attivo è stato inizialmente evidenziato nel corso di prove sperimentali per valutare l'efficacia di differenti principi attivi contro l'antracnosi di frutti in post-raccolta. Il principio attivo *benomyl* appartiene alla famiglia dei *benzimidazoli* che sono specifici inibitori della formazione dei microtubuli all'interno della cellula impedendo la formazione delle loro sub-unità eterodimeriche, cioè le molecole di *tubulina* (Nakaune e Nakano, 2007). Lo sviluppo della resistenza a questo principio attivo è dovuto alla mutazione di un singolo aminoacido nel codone 198 del gene della *tub2*. *C. acutatum* s. l. risulta essere moderatamente sensibile al *benomyl*, con una diminuzione del 50% della crescita ad una concentrazione di p.a. pari ad 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Alla medesima dose, la crescita al *C. gloeosporioides* s. l. risulta essere completamente inibita (Peres *et al.*, 2004). Tuttavia, a causa dello sviluppo di fenomeni di resistenza anche nell'ambito del complesso di specie che costituiscono *C. gloeosporioides* s. l. l'uso di questo saggio non sempre

fornisce risultati attendibili (Adaskaveg e Hartin, 1997; Peres *et al.*, 2004; Valero *et al.*, 2010).

3.1.2.2. Compatibilità vegetativa

Lo studio della compatibilità vegetativa è ancora oggi uno strumento utile per la caratterizzazione di popolazioni fungine appartenenti al genere *Colletotrichum* (Freeman *et al.* 1998). Nei funghi filamentosi, le ife di individui geneticamente distinti possono fondersi e formare un *eterocarion*, per cui nuclei geneticamente differenti coesistono in un citoplasma comune. Quando l'*eterocarion* è stabile si parla di compatibilità vegetativa (VCG) e i due individui appartengono allo stesso gruppo di VCG (Glass *et al.*, 2000). Poiché l'anastomosi ifale è un requisito preliminare per lo scambio di materiale genetico, si presume che gli organismi che appartengono allo stesso gruppo VCG siano geneticamente più vicini costituendo perciò una popolazione geneticamente distinta (Freeman e Katan, 1997). La formazione dell'*eterocarion* ha potenziali benefici per lo scambio genetico fra individui, portando al mascheramento degli alleli recessivi e a maggiori capacità di adattamento alle diverse condizioni ambientali, ed inoltre sembra essere implicato nell'aumento della patogenesi (Begueret *et al.*, 1994; Glass *et al.*, 2000). La formazione degli *eterocarion* è stata studiata attraverso saggi di complementazione, su substrati minimi contenenti clorato di potassio utilizzando i mutanti della *nitrato reduttasi (nit)* (Puhalla, 1985; Klittich e Leslie; 1988; Correll *et al.*, 1989). Anche se la tecnica VCG è risultata utile per valutare la diversità genetica delle popolazioni di *Colletotrichum* spp., la specificità d'ospite, la ripartizione geografica, questo metodo non può essere usato per la classificazione tassonomica di specie di *Colletotrichum* (Freeman *et al.*, 1998; Correll *et al.*, 1989) in quanto questo fenomeno è limitato a popolazioni che presentano compatibilità vegetativa (Freeman *et al.*, 1988) e inoltre la formazione degli *eterocarion in vitro* può essere differente rispetto a quella che avviene in natura, poiché generalmente tale fenomeno può essere escluso a causa delle differenze portate ai loci *het (heterokaryon incompatibility)* anche chiamati *vic (vegetative incompatibility)* (Glass *et al.*, 2000).

3.1.2.3. Test di patogenicità

La descrizione di nuove specie dovrebbe essere opportunamente corredata da dati sulla patogenicità sugli ospiti e sullo stile di vita dei funghi fitopatogeni (Cai *et al.*, 2009). *Colletotrichum* spp. comprende funghi endofiti ed epifiti con stile di vita saprofitario e fitopatogeno (Sutton, 1992; Adaskaveg e Hartin, 1997; Photita *et al.*, 2004, Hyde *et al.*, 2009). Ai fini di una migliore comprensione dei processi di patogenicità e conseguente scelta e applicazione di strategie di lotta è importante poter stabilire se una specie di *Colletotrichum* sia ospite-specifico o se presenti una vasta gamma di ospiti. Le specie ospite-specifico, inoltre, possono avere una distribuzione geografica limitata, mentre se la specie presenta una vasta gamma di ospiti, vi è maggiore probabilità che la specie sia cosmopolita e presenti uno stile di vita di tipo opportunisto. I postulati di Koch sono stati ampiamente utilizzati per confermare la patogenicità delle specie di *Colletotrichum* spp. (Cai *et al.*, 2009).

3.2. Metodi molecolari

L'impiego di strumenti molecolari è stato applicato con successo per la discriminazione di specie, provenienti da differenti ospiti, appartenenti al genere *Colletotrichum* (Freeman *et al.*, 1998; Lardner *et al.*, 1999; Sreenivasaprasad e Thalhinias, 2005; Shivas e Than, 2008). Negli ultimi due decenni, grazie all'avvento della tecnica di PCR (*polymerase chain reaction*) e delle prime sequenze dei *primer*, l'applicazione nel campo della patologia vegetale dei marcatori molecolari ha permesso di rivoluzionare le conoscenze sui funghi fitopatogeni (Mullis, 1990; Benali *et al.*, 2011). Oltre a permettere la diagnosi e l'identificazione di funghi fitopatogeni, l'uso di marcatori molecolari ha permesso la valutazione della diversità inter e intraspecifica e la localizzazione geografica di differenti genotipi (Glass e Donaldsons, 1995). Numerose tecniche molecolari sono state utilizzate negli anni per la caratterizzazione di popolazioni di *Colletotrichum* spp.. Tra queste vi sono tecniche associate a sequenze genomiche sconosciute come RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990; Tingey *et al.*, 1993; Freeman *et al.*, 1998), RFLP (*restriction fragment length polymorphism PCR*) (Brown *et al.*, 1996, McDonald, 1997; Guerber *et al.* 2003) e AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) (Vos *et al.*, 1995) che risultano

particolarmente valide per lo studio della variabilità intraspecifica. Molto efficace in questo senso risulta essere anche lo studio dei microsatelliti o singole sequenze ripetute (SSR) (Freeman e Shabi, 1996; Talhinhos *et al.*, 2005)

Un secondo gruppo di tecniche impiegate si basa sullo studio delle relazioni filogenetiche mediante comparazione di sequenze geniche e serve soprattutto per la definizione di gruppi filogeneticamente correlati o di nuovi *taxa*, che, grazie a questi strumenti, in alcuni casi ha portato alla elevazione a nuove specie. Tra le regioni geniche analizzate le regioni ITS (*internal transcribed spacer*) del DNA ribosomiale (rDNA) sono di gran lunga le più utilizzate (White *et al.*, 1990; Moriwaki *et al.*, 2003; Photita *et al.*, 2005; Bellemain *et al.*, 2011). Altre regioni frequentemente utilizzate comprendono i geni della β -*tubulina2*, dell'*actina* (ACT) e della *calmodulina* (CAL) (Sreenivasaprasad e Talhinhos, 2005; Prihastuti *et al.*, 2009). Inoltre le sequenze degli introni dei geni GS (*glutammina sintetasi*) e GPDH (*gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi*), sono utilizzate in numerosi studi per risolvere le relazioni filogenetiche nell'ambito di *C. acutatum s.l.* e *C. gloeosporioides s.l.* (Stephenson *et al.*, 1997; Guerber *et al.*, 2003; Gonzales *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Damm *et al.*, 2009, Prihastuti *et al.*, 2009).

3.2.1. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

La tecnica RAPDs, sviluppata contemporaneamente da due differenti gruppi di ricercatori (William *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990), si basa sull'amplificazione di regioni casuali del DNA mediante l'uso di un solo *primer* arbitrario. Questo *primer* ha un elevato contenuto in GC (almeno il 50%), è corto (generalmente 10 nucleotidi) e pertanto riesce a legarsi a differenti parti del genoma che vengono amplificate causalmente mediante PCR in condizioni di bassa stringenza (Scott e Tingey, 1993; Benali *et al.*, 2011). La tecnica RAPD è diventata molto popolare poiché non richiede alcuna conoscenza preliminare del genoma dell'organismo bersaglio, è di semplice applicazione, è molto sensibile e risulta molto efficace nel differenziare anche individui filogeneticamente molto vicini grazie al gran numero di ampliconi che vengono ottenuti. La comparazione si basa sulla presenza assenza di frammenti delle medesime dimensioni assumendo che frammenti della stessa lunghezza

corrispondano ad un medesimo gene *target*. Il limite principale della tecnica RAPDs è la bassa riproducibilità dei risultati nel tempo e nello spazio a causa dell'elevata sensibilità della tecnica alle condizioni sperimentali (reagenti e termociclatori utilizzati), alla qualità del DNA e alla manualità degli operatori. Inoltre essendo i marcatori RAPD dominanti, non permettono di differenziare organismi omozigoti ed eterozigoti. Nonostante questi svantaggi, questa tecnica è stata applicata con successo per l'identificazione e la caratterizzazione inter e intraspecifica di *Colletotrichum* spp. (Freman *et al.*, 1998). Lardener *et al.* (1999), basandosi sullo studio combinato dei profili morfologici e RAPDs, identificò la presenza di 7 gruppi molecolari nell'ambito del *C. acutatum s.l.*. Successivamente, attraverso lo studio di numerosi geni e con analisi RAPDs, Sreenivasaprasad e Talhinhos (2005) individuarono 8 raggruppamenti (A1-A9) a cui è stato successivamente aggiunto il gruppo A9 (Whitelaw-Weckert *et al.*, 2007). Inoltre, la tecnica RAPD ha consentito di separare *C. gloeosporioides s.l.* in cinque morfo-gruppi (Photita *et al.*, 2005) e a differenziare le popolazioni *C. gloeosporioides s.l.* e *C. acutatum s.l.* responsabili dell'antracnosi dell'olivo in Spagna da quelle rinvenute su altre specie ospiti (Moral *et al.*, 2007). Più recentemente questa tecnica ha contribuito a definire una nuova specie (*C. clavatum* G.E. Agosteo, R. Faedda e S.O. Cacciola, sp. nov.) nell'ambito di *C. acutatum s.l.* (Faedda *et al.*, 2011).

3.2.2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

La tecnica dei marcatori RFLPs consiste nella digestione del DNA con endonucleasi di restrizione, che tagliano in specifiche posizioni definite palindromiche, di 4-6 basi, con successiva separazione dei frammenti di lunghezza differenti attraverso elettroforesi (Bruns *et al.*, 1991). Poiché è una tecnica di ibridazione, i frammenti, dopo la corsa, vengono trasferiti su membrane di nitrocellulosa, mediante tecnica *Southern blotting*, e ibridati con sonde specifiche (Benali *et al.*, 2011). L'applicazione di questa tecnica richiede elevate competenze rispetto alla tecnica RAPD ma i risultati sono maggiormente riproducibili. Inoltre gli RFLPs sono marcatori codominanti che consentono l'analisi potenziale di un numero di alleli illimitato per ciascun *locus* (McDonald, 1997). Tra i limiti dei RFLPs vi è la necessità di impiegare grandi quantitativi di DNA (5-50 ng) necessari per la digestione enzimatica, la complessità

della tecnica e i costi delle analisi che sono elevati a causa dell'utilizzo delle membrane per l'ibridazione. Guerber *et al.* (2003), usando la RPLF del mtDNA mitocondriale, hanno potuto distinguere 5 aplotipi nell'ambito di *C. acutatum*, 2 aplotipi di *C. gloeosporioides* e 4 aplotipi di *G. cingolata* ottenuti da mele. Liu *et al.* (2007), nello studio delle variabilità di *C. orbiculare*, hanno confermato che la tecnica RFLPs può rappresentare uno strumento utile ed affidabile per la differenziazione del genere *Colletotrichum*. Una variante più semplice della RFLP consiste nella PCR-RFLP in cui specifiche regioni geniche vengono amplificate mediante PCR e frazionate con enzimi di restrizione. In questo caso i frammenti possono essere visionati direttamente su gel di agarosio. Questa tecnica è risultata utile applicata a regioni introniche ed ha fornito informazioni utili in merito alla diversità genetica nell'ambito di *C. acutatum s.l.* (Guerber *et al.*, 2003; Talhinhos *et al.*, 2005).

3.2.3. Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

I marcatori AFLPs sono frammenti di DNA amplificati casualmente con l'uso di *primer* selettivi a partire da DNA genomico digerito con enzimi di restrizione che tagliano il DNA in siti specifici (MseI e EcoRI) e presentano le estremità coesive. Alle estremità dei frammenti ottenuti vengono legati opportuni adattatori che ne consentono l'amplificazione mediante PCR. Segue una prima PCR pre-selettiva in cui vengono utilizzati *primer* con sequenze complementari a quelle degli adattatori, con la presenza di una base selettiva. Successivamente avviene una seconda amplificazione, definita selettiva, con *primer* che presentano fino a tre basi selettive, complementari ai frammenti della fase pre-selettiva. La separazione dei frammenti può avvenire su gel di poliacrilammide o attraverso elettroforesi capillare (Vos *et al.*, 1995, Benali *et al.*, 2011). Questa tecnica presenta delle analogie con i metodi RAPDs in quanto la differenziazione degli individui avviene in funzione del numero dei frammenti e delle loro dimensioni. Il punto di forza della tecnica AFLPs è l'amplificazione di molti più frammenti che consentono l'analisi contemporanea di un numero molto elevato di *loci* polimorfici permettendo la differenziazione di individui filogeneticamente molto vicini. Analogamente alle tecniche RAPDs, le tecniche AFLPs non richiedono alcuna conoscenza preliminare del DNA bersaglio ed essendo marcatori dominanti non

consentono la distinzione tra individui omozigoti ed eterozigoti (McDonald, 1997; Benali *et al.*, 2011). Rispetto alle tecniche RAPDs presentano una maggiore riproducibilità dei risultati ma sono tecnicamente più impegnativi e molto più costosi. I marcatori AFLPs sono ampiamente utilizzati per la caratterizzazione di *taxa* strettamente connessi e nel caso specifico di *Colletotrichum* spp. sono stati impiegati per la caratterizzazione una popolazione di *C. lindemuthianum* in Messico (Gonzalez *et al.*, 1998) e per studiare la vicinanza tassonomica fra *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (Hyde *et al.*, 2009). Liu *et al.* (2007) mediante analisi AFLPs, e dei due introni GS e GPDH hanno proposto di considerare il complesso *C. orbiculare*, che include *C. trifolii*, *C. lindemuthianum* e *C. malvarum*, come singola specie.

3.2.4. Simple sequence repeat (SSR) o microsatelliti

Il termine microsatelliti fu coniato da Litt e Luty (1989) per indicare regioni genomiche composte da ripetizioni in *tandem* di pochi nucleotidi (generalmente 1-6) ed è noto anche come *simple sequence repeat* (SSRs), *short tandem repeats* (STRs), o *simple sequence length polymorphism* (SSLPs). Questi marcatori sono ampiamente presenti nelle regioni codificanti e non codificanti del genoma eucariotico, sono facilmente amplificabili mediante PCR e presentano alti livelli di polimorfismi determinati dall'elevato tasso di mutazione (dell'ordine di 10^{-2} a 10^{-4}) per ogni generazione (Benali *et al.*, 2011). La distribuzione dei microsatelliti nel genoma non è omogenea ed è *taxon* specifica. L'alto tasso di mutazione di queste regioni è stato attribuito principalmente a due meccanismi fondamentali: lo *slippage* (disappaiamento e appaiamento scorretto durante la fase di replicazione) e la ricombinazione diseguale per *crossing over* (Varshney *et al.*, 2005). I principali vantaggi di questi marcatori risiedono nel fatto che sono ampiamente distribuiti nel genoma, sono presenti in molteplici copie, per l'amplificazione richiedono piccole quantità di DNA e sono codominanti, cioè permettono di discriminare individui eterozigoti da quelli omozigoti. Tuttavia, l'amplificazione e la caratterizzazione degli SSR mediante PCR richiede la conoscenza preliminare delle regioni geniche fiancheggianti. Per questo motivo questa tecnica viene oggi utilizzata soprattutto per quelle specie fungine di cui è nota una parte cospicua o l'intero genoma. Esistono anche tecniche basate sulla costruzione di specifiche librerie

genetiche, ma i costi risultano particolarmente elevati. Un altro importante limite dell'analisi SSR è l'amplificazione di bande accessorie conosciute come bande *stutter* che sembrerebbero dovute alla comparsa di mutazioni nel sito di *annealing* del *primer* (Benali *et al.*, 2011). Mediante analisi SSR, Freeman e Shabi (1996) hanno riscontrato una correlazione tra la diversità genetica e la distribuzione geografica di isolati di *C. gloeosporioides* ottenuti da frutti di mandorlo e avocado, evidenziando che gli isolati israeliani presentavano *pattern* uniformi che differivano da quelli statunitensi. Talhinhos *et al.* (2005) mediante SSR, regioni ITS e β *tubulina*, hanno dimostrato l'esistenza di 5 gruppi molecolari nell'ambito di *C. acutatum s.l.* associati all'antracnosi dell'olivo.

3.3 Analisi di sequenze geniche

Negli ultimi 15-20 anni la comparazione delle sequenze geniche di numerosi geni ha fortemente migliorato le nostre conoscenze in merito alle relazioni filogenetiche nell'ambito di numerosissimi funghi fitopatogeni e nello specifico di *Colletotrichum* spp. rappresenta una fonte enorme di dati anche per lo sviluppo di metodi di identificazione e diagnosi molecolare. I geni comunemente utilizzati sono accomunati dall'essere facilmente amplificabili e sequenziabili con l'ausilio di *primer* universali e dalla presenza di un elevato livello di polimorfismo che consente la differenziazione di individui filogeneticamente vicini.

3.3.1. Regioni ITS dell'rDNA

Durante gli ultimi 15 anni e successivamente agli studi di White (1990) sul rDNA ribosomiale, le regioni ITS hanno rappresentato i *marker* molecolari di gran lunga più utilizzati nello studio e la diagnosi di funghi fitopatogeni e recentemente sono stati proposti come gene base per lo sviluppo di sistemi di *barcoding* per l'identificazione molecolare dei funghi. In particolare la regione ITS1-5.8S-ITS2 può essere facilmente amplificata con *primer* universali, e sufficientemente variabile per differenziare specie affini pur risultando generalmente conservata a livello di specie ed essendo presente in molteplici copie, può essere agevolmente amplificata e sequenziata partendo da pochissimo DNA *target* consentendo lo sviluppo di sistemi di diagnosi molto sensibili (Bellemain *et al.*, 2011). Le regioni ITS, costituite dalla regione ITS1 e

ITS2, sono porzioni non codificanti di DNA interposte a livello dei geni strutturali codificanti l'RNA ribosomiale. I patogeni fungini, essendo organismi eucarioti, presentano nell'unità policistronica strutturale le 4 sequenze geniche dell'rRNA ribosomiale che formano le unità ribosomiali 60S e 40S. Le sequenze geniche presenti in quest'unità strutturale ripetute diverse volte nel genoma sono: 18S (SSU, *small subunit*) - 5,8S - 5S - 28S (LSU, *large subunit*). Ogni unità strutturale è costituita da uno spaziatore trascritto esterno, ETS (*external transcribed spacer*), situato all'estremità 3' del gene 18S, due spaziatori trascritti interni, ITS (*internal transcribed spacer*), situati rispettivamente: l'ITS1 fra il gene 18S e il gene 5,8S, l'ITS2 tra il gene 5,8S e l'estremità 3' del gene 28S e in fine il gene 5S separato dal gene 28S da una sequenza spaziatrice non codificante. Queste unità strutturali, all'interno del cromosoma, sono separate da sequenze spaziatrici non codificanti, NTS (*nontranscribed spacer*) o IGS (*intergenic spacer*). Il gran numero di copie per cellula (fino a 250) e la presenza di introni, con nessuna funzione biologica apparente ed elevata variabilità, hanno reso queste regioni i frammenti più sequenziati nei funghi (Atkins e Clark, 2004). Queste regioni sono anche le più utilizzate per la caratterizzazione di specie appartenenti al genere *Colletotrichum* (Sherriff *et al.*, 1994; Freeman *et al.*, 1998; Lubbe *et al.*, 2004, Sreenivasaprasad e Talhinas, 2005). L'uso combinato delle regioni ITS e frammenti del gene della β -tubulina hanno permesso di differenziare la specie *C. acutatum* in 8 gruppi molecolari (Sreenivasaprasad e Talhinas, 2005) permettendo di distinguere differenti popolazioni di *Colletotrichum* spp. associate all'antracnosi dell'olivo nelle varie aree geografiche del mondo (Oliveira *et al.*, 2005; Sreenivasaprasad e Talhinas, 2005; Talhinas *et al.*, 2005; Moral *et al.*, 2007, 2008, 2009; Moral e Traperò, 2009; Faedda *et al.*, 2011).

3.3.2. β -tubulina

La *tubulina* è una proteina globulare che costituisce, insieme alle *kinesine* e *dynesine*, uno dei principali componenti dei microtubuli nelle cellule eucariotiche. I microtubuli sono coinvolti in tutti i movimenti nel citoplasma delle cellule, svolgendo un ruolo chiave durante la mitosi, in quanto sono a capo della divisione cellulare, la segregazione dei cromosomi, la generazione e il mantenimento della forma cellulare,

del movimento del materiale cellulare e della determinazione della crescita cellulare. La famiglia della proteina *tubulina* è costituita da sette unità rappresentate dalla α (alfa), β (beta), γ (gamma), δ (delta), ε (epsilon), ζ (zeta) e η (eta) tubulina. I geni della *tubulina* ed in particolare la β -*tubulina*, che insieme alla α sono le proteine più abbondanti nelle cellule eucariote, sono ampiamente utilizzati nelle analisi filogenetiche a livello di genere e specie (Glass e Donaldson, 1995, Nakaune *et al.*, 2007).

Il gene della β -*tubulina* è solitamente espresso ad alti livelli durante la crescita delle cellule, ed essendo altamente conservato a livello degli esoni può essere agevolmente amplificato con *primer* universali. Al contrario, le regioni introniche sono molto variabili e si prestano per la valutazione delle relazioni filogenetiche tra specie affini o anche per lo studio della diversità intraspecifica. Ad esempio, la variabilità presente a livello dell'introne 3 è stata ampiamente utilizzata anche per specie del genere *Colletotrichum*. Insieme alle regioni ITS, il gene della β -*tubulina* è quello che maggiormente sta contribuendo a stabilire le relazioni filogenetiche nell'ambito del genere *Colletotrichum* (Freeman *et al.*, 1998; Sreenivasaprasad e Talhinhas, 2005; Than *et al.*, 2008).

3.3.3. Gene GS (*glutammina sintetasi*)

La *glutammina sintetasi* (GS) è un enzima presente in tutti gli organismi e svolge un ruolo chiave nel metabolismo degli aminoacidi. Catalizza la formazione dell'amminoacido glutammina, a partire dallo ione glutammato, ammoniaca ed ATP. Questa reazione è essenziale per la sintesi di glutammina e ammoniaca, e in generale, come fonte di azoto nella formazione di molti metaboliti. Il gene GS sembra svolgere un ruolo importante nei processi di patogenesi grazie alla modulazione del rilascio dell'ammoniaca (Stephenson *et al.*, 1997). Il gene GS presenta degli introni che possono fornire un elevato livello di risoluzione a livello inter- e intraspecifico (Russell, 2004) come dimostrato per *C. acutatum s.l.* (Guerber *et al.*, 2003) e *C. orbiculare* (Liu *et al.*, 2007).

3.3.4. Gene GPDH (*gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi*)

Il gene della *gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi* presente principalmente nel citoplasma e in altri compartimenti cellulari, oltre a catalizzare l'ossidazione reversibile e la fosforilazione del *D-gliceraldeide-3-fosfato*, coinvolti nei processi della glicolisi, è responsabile di molteplici funzioni cellulari quali: riparazione del DNA, trasporto del tRNA, organizzazione del citoscheletro. Negli organismi procarioti ed eucarioti questo gene mostra un elevato livello di conservazione che ne consente l'impiego per studi di filogenesi (Templeton *et al.*, 1992). L'analisi della variabilità dell'introne del gene GPDH, insieme allo studio di altre 6 regioni geniche quali frammenti della *β -tubulina*, *actina*, *calmodulina* ha permesso la caratterizzazione delle specie di *Colletotrichum* spp. associate all'antracnosi del caffè, consentendo la differenziazione di tre nuove specie: *C. asianum* sp. nov., *C. fructicola* sp. nov. e *C. siamense* sp. nov. (Prihastuti *et al.*, 2009). Medesimo approccio è stato impiegato per comprendere le relazioni filogenetiche all'interno del complesso *C. orbiculare* (Liu *et al.*, 2007) e della variabilità di *Colletotrichum* spp degli agenti responsabili dell'antracnosi della mela (González *et al.*, 2006)

3.3.5. DNA mitocondriale

In aggiunta all'analisi del DNA nucleare anche il DNA mitocondriale (mtDNA) è stato ampiamente utilizzato per lo studio delle relazioni filogenetiche nell'ambito dei funghi (Bruns *et al.*, 1991; Glass e Donaldson, 1995). Il DNA mitocondriale è essenziale per la sintesi di proteine implicate nella respirazione cellulare e diversi aspetti hanno contribuito ad aumentare la sua popolarità come marcatore molecolare. Infatti i marcatori mitocondriali sono ereditati indipendentemente dal genoma nucleare ed esclusivamente in linea materna. L'assenza di ricombinazioni permette di utilizzare questi marcatori per determinare le linee di discendenza o percorsi di flusso genico (McDonald, 1997). Il mtDNA è di piccole dimensioni se comparato con quello nucleare e pertanto è stato interamente sequenziato da numerose specie fungine. Le sue dimensioni, tuttavia, consentono la comparazione di diversi caratteri, ed essendo presente in molteplici copie all'interno di ciascuna cellula permette lo sviluppo di diagnostici molecolari molto sensibili. Nelle cellule è presente come singolo

cromosoma a struttura circolare ed è sede di diversi geni tra i quali quelli che partecipano alla fosforilazione ossidativa (in particolare la *citocromo ossidasi* COI I e II). Ai fini evolutivisti, la sub unità I della COI è risultata particolarmente utile per la caratterizzazione intraspecifica di agenti fitopatogeni poiché presenta sia regioni conservate che variabili ed è stata proposta come gene di riferimento per lo sviluppo di un sistema di “*barcoding*” per i funghi (Robideau *et al.*, 2011). In generale, il mtDNA è caratterizzato da elevati tassi di mutazione rispetto al DNA nucleare, che determinano elevati livelli di polimorfismo (Brown *et al.*, 1979). L’analisi della sub unità mtSSU ha contribuito all’identificazione di specie di *Colletotrichum* associate all’antracnosi del caffè in Vietnam (Nguyen *et al.*, 2010)

3.3.6. Fungal barcode

La corretta identificazione dei funghi fitopatogeni e nello specifico delle specie appartenenti al complesso genere *Colletotrichum*, oltre che per studi evolutivisti, risulta essere indispensabile ai fini dell’implementazione di adeguate strategie di lotta contro le malattie da esse causate. L’identificazione basata su caratteri fenologici oltre ad essere estremamente lunga, difficile e costosa, spesso fornisce risultati inadeguati. L’avvento degli strumenti molecolari può potenzialmente consentire l’identificazione rapida ed affidabile di qualsiasi specie fungina tra cui anche specie del genere *Colletotrichum*. In particolare in anni recenti si è diffusa la pratica di comparare le sequenze di alcuni geni di riferimento (ITS *in primis*) con quelle disponibili nelle banche dati genetiche (GenBank, EMBI, DDJB) principalmente mediante l’analisi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Tuttavia, come riscontrato da diversi autori, sempre più spesso si è in presenza di errori dovuti principalmente al mancato controllo della qualità delle sequenze depositate e all’erronea identificazione delle specie fungine analizzate (Nilsson *et al.*, 2006). Questo limite sarà progressivamente risolto attraverso lo sviluppo di sistemi di *barcoding* in cui la comparazione delle sequenze con *databases* accuratamente controllati e certificati permetterà l’identificazione di un organismo. Lo sviluppo di sistemi di *barcoding* è in fase avanzata per tutti gli organismi viventi (<http://www.barcodeoflife.org/>) tra cui anche i funghi (<http://www.fungalbarcoding.org/>) (Cai *et al.*, 2009, Hyde *et al.*, 2009). Quest’ultimo permetterà l’identificazione delle specie fungine attraverso un approccio polifasico basato sulla comparazione di uno o più geni ed uno o più caratteri

morfologici. Recentemente è stata anche sviluppata una banca dati specifica per l'identificazione di specie appartenenti al genere *Colletotrichum* (<http://www.q-bank.eu/fungi/>). Il sistema si basa sulla comparazione di differenti geni (regioni ITS, gene della β tubulina, gene dell'*actina* (ACT), gene dell'istone 3 (HIS3), gene della *chitina sintetasi*, gene della *calmodulina* (CAL), gene della *glutammina sintetasi* (GS) e gene della *gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi* GPDH) oltre che di caratteri morfologici e colturali. Più geni e caratteri morfologici e colturali vengono comparati, più attendibile sarà l'identificazione. Al momento le banche dati genetiche morfologiche e colturali disponibili nell'ambito dei sistemi di *barcoding* per i funghi, e nella fattispecie per *Colletotrichum* spp., sono ancora largamente incomplete poiché riguardano un numero limitato di specie. Tuttavia, nel giro di qualche anno le banche dati dovrebbero essere completate permettendo l'identificazione accurata e semplice di qualsiasi specie fungina già nota alla comunità scientifica, contribuendo alla comprensione della complessità biologica esistente nel Regno dei funghi e più specificamente in *Colletotrichum* spp.

4. Scopo della tesi

L'antracnosi dell'olivo, causata dal *C. acutatum s.l.* e *C. gloeosporioides s.l.*, rappresenta una delle più gravi patologie fungine dell'olivo a causa delle ingenti perdite di produzione e delle ripercussioni negative sulla qualità degli oli ottenuti da olive infette (Talhinhas *et al.*, 2005; Moral e Trapero, 2009). In anni recenti numerosi studi basati sia su osservazioni morfologiche che su analisi di natura molecolare hanno evidenziato una notevole eterogeneità nell'ambito di *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* tanto che attualmente si preferisce parlare di complessi di specie. Tutto ciò ha portato necessariamente all'avvio di un processo di profonda revisione nella classificazione di questi importanti agenti fitopatogeni (Lardner *et al.*, 1999, Sreenivasaprasad e Talhinhas, 2005, Liu *et al.*, 2007, Hyde *et al.*, 2009). Questo processo risulta particolarmente complesso a causa dei pochi e caratteri morfologici distintivi (Freeman *et al.*, 1998), che possono essere assunti come criteri tassonomici, del vasto "range" di ospiti, delle limitate differenze genetiche tra specie affini e della frequente erronea nomenclatura nelle sequenze depositate nelle banche dati genetiche (Cai *et al.*, 2009, Hyde *et al.*, 2009).

Scopo della ricerca è stato lo studio di un'ampia collezione di isolati di *Colletotrichum* spp. responsabili di antracnosi dell'olivo al fine di meglio stabilire le relazioni biologiche e filogenetiche tra i gruppi maggiormente diffusi in Italia, con particolare riferimento al gruppo A4 di *C. acutatum s. l.* (Sreenivasaprasad e Talhinhas, 2005). In particolare, è stata indagata l'ipotesi già formulata in passato (Cacciola *et al.*, 2007) che il gruppo A4 costituisca una specie a se stante nell'ambito di *C. acutatum s.l.*. Analogo approccio è stato impiegato per lo studio di un'ampia popolazione di isolati genericamente riconducibili a *C. gloeosporioides s.l.*, notoriamente riportati in letteratura come patogeni secondari che interessano solo olive in fase avanzata di maturazione (Martin e García-Figueroles, 1999; Talhinhas *et al.*, 2005; Moral *et al.*, 2008; Moral e Trapero, 2009; Talhinhas *et al.*, 2009). Obiettivo principale delle ricerche condotte nel corso della tesi è stato di migliorare la definizione e la collocazione filogenetica di isolati molto differenti tra di loro, ma tutti associati all'antracnosi dell'olivo fornendo, contestualmente, informazioni sulla loro virulenza in comparazione con quella dei principali gruppi di *C. acutatum s.l.*, maggiormente diffusi e studiati. Nel complesso, le ricerche condotte rappresentano un passo in avanti nella comprensione

dell'eziologia dell'antracnosi dell'olivo e nella definizione del ruolo di differenti specie/gruppi filogenetici nelle diverse condizioni ambientali e aree geografiche.

Bibliografia

Adaskaveg, J.E., Hartin, R.J., 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* **87**, 979–987.

Agrios, G. N., 2005. Plant Pathology , 5th ed. . Elsevier Academic Press, ISBN 0-12-044565-4

Atkins, S. e Clark, I., 2004. Fungal Molecular Diagnostics: A mini review. *Journal of applied genetics*. **45**(1), pp 3-15.

Beguere J, Turcq B, Clavé C., 1994. Vegetative incompatibility in filamentous fungi het genes begin to talk. *Trends Genet.* **10**:441–46

Bellemain, E., Carlsen, T, Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kauserud, H., 2010. Research article ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10:189

Bridge, P.D., Cannon, P.F., Buddie, A.G., Baker, M., Borman, A.M., 2008. Domain II hairpin structure in ITS1 sequences as an aid in differentiating recently evolved animal and plant pathogenic fungi. *Mycopathologia* **166**: 1-16.

Brown, A. E., Sreenivasaprasad, S., Timmer, L.W., 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* **86**:523-527.

Brown, W., George, M. & Wilson, A., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**(4), 1967-1971.

Bruns, T.D., White, T.R., Taylor, J.W., 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review Ecol. Syst.* **22**:525-564

Bryson, R.J, Caten, C.e., Hollomon, D.W., Bailey, J.A. , 1992. In: Bailey J.A, Jeger M.J. (eds). *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control, pp. 1-26. CAB International, Wallingford, UK.

Cacciola S.O., Agosteo G.E., Faedda R., Frisullo S., Magnano di San Lio G., 2007, Characterization of *Colletotrichum* species causing olive anthracnose in Italy. *IOBC/WPRS Bulletin* **30**: 229.

Cacciola S.O., Agosteo G.E., Pane A., Magnano di San Lio G., 1996. Osservazioni sull'epidemiologia dell'antracnosi dell'olivo in Calabria. *Informatore Fitopatologico* **46 (6)**: 27-32.

Cacciola, S.O., Faedda, R., Agosteo G.E., 2011. Anthracnose. Olive Diseases and Disorders, ISBN: 978-81-7895-539-1

Cai, L., Giraud T., Zhang, N., Begerow, D., Cai, G., Shivas, R.G., 2011. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. *Fungal Diversity, Review*, 011-0127-8

Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B., Waller J, Abang, M.M., Zhang, J.Z., Yang, Y.L., Phoulivong, S., Liu, Z.Y., Prihastuti, H., Shivas, R.G., McKenzie, E.H.C., Johnston, P.R., 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers* 39:183–204

Ciccarone A., 1950. Considerazioni biologiche e sistematiche sull'agente della "lebbra" delle olive, recentemente osservata nel Leccese. *Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale di Roma*, S. III, **5**: 143-165.

Classificazione Tassonomica: 10th edition of the Dictionary of the Fungi . <http://www.indexfungorum.org/Names/fundic.asp>.

Correll, J.C., Klittich, C.J.R., Leslie, J.F., 1989. Heterokaryon self-incompatibility in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Mycol. Res.* **93** , pp. 21-27

Damm, U., Woudenberg, J.H.C., Cannon, P.F. and Crous, P.W. (2009). *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* **39**: 45-87.

Duarte H.S.S., Cabral P.G.C., Pereira O.L., Zambolim L, Gonçalves E.D., Vieira Neto J., Zambolim E.M., Sergeeva V., 2010. First report of anthracnose and fruit mummification of olive fruit (*Olea europaea*) caused by *Colletotrichum acutatum* in Brazil. *New Disease Reports* **20**: 37.

Einax, E., Voigt, K., 2003. Oligonucleotide primers for the universal amplification of *βtubulin* genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum *Fungi*. *Org. Divers. Evol.* 3, 185–194 Features and applications. *Elsevier, trends in biotechnology* Vol.23 No.1

Faedda R., Agosteo G.E., Schena L., Mosca S., Frisullo S., Magnano di San Lio G., Cacciola S.O., 2011. *Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the causal agent of olive anthracnose in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* **50**: 283-302.

Freeman S., Katan T., Shabi E., 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* **82**:596-605.

Freeman S., Shalev Z., Katan J., 2002. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. *Plant Disease* **86**: 965-970.

Freeman, S., Katan, T. (1997). Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* **87**(5), 516-521.

García-Figueres F., Pedret Tena E., Marco Sanz V., Duatis Monllaó J.J., 1997. Sensibilidad de diversas variedades de olivo al hongo "*Colletotrichum gloeosporioides*". *Fruticultura Profesional* **88**: 60-63.

Glass, L.N., Jacobson, D.J., Shiu, P.K.T., 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annu. Rev. Genet.* **34**:165

Glass, N.L., 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**:1323-1330.

Gomes, S., Pietro, P., Martins-Lopes, P., Carvalho, T., Martin, A., Guedes-Pinto, E., 2009. Development of *Colletotrichum acutatum* on Tolerant and Susceptible *Olea europaea* L. cultivars: A Microscopic Analysis. *Mycopathologia* **168**:203–211

González, E., Sutton, T.B. Correll, J.C., 2006. Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. *Phytopathology* **96**: 982-

992.

González, M., Rodríguez R., Zavala, M.E., Jacobo, J. L. Hernández, F., Acosta, J., Martínez, O., Simpson, J., 1998. Characterization of mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *The American Phytopathological Society*, Vol. 88, No. 4

Graniti A., Frisullo S., Pennisi A.M., Magnano di San Lio G., 1993. Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **23**: 457-465.

Guerber J.C., Correll J.C., 2001. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia* **93**: 216-229.

Guerber J.C., Liu B., Correll J.C., Johnston P.R., 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* **95**:872-895.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://it.paperblog.com/i-funghi-parassiti-dell-olivo-298068>

<http://www.barcodeoflife.org/>

<http://www.fungalbarcoding.org/>

<http://www.q-bank.eu/fungi/>

Hyde K.D., Cai L., Cannon P.F., Crouch J.A., Crous P.W., Damm U., Goodwin P.H., Chen H., Johnston P.R., Jones E.B.G., Liu Z.Y., McKenzie E.H.C., Moriwaki J., Noireung P., Pennycook S.R., Pfenning L.H., Prihastuti H., Sato T., Shivas R.G., Taylor P.W.J., Tan Y.P., Weir B.S., Yang Y.L., Zhang J.Z. 2009. *Colletotrichum* names in current use. *Fungal Diversity* **39**: 147-183.

Hyde K.D., Cai L., McKenzie E.H.C., Yang Y.L., Zhang J.Z., Prihastuti H. 2009. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* **39**: 1-17.

Johnston, P. R., and Jones, D. 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* **89**:420-430.

Kumar, N. , Jhang, T., Satyavir, S., 2010. Molecular and pathological characterization of *Colletotrichum falcatum* infecting subtropical indian sugarcane. *Journal Phytopathology*. **14** 39-0434

L. 2004, La Rivista delle Sostanze Grasse, 81, 7.

Lardner R., Johnston P.R., Plummer K.M., Pearson M.N., 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum sensu lato*. *Mycological Research* **103**: 275-285.

Li, K. N., Rouse, D. I., German, T. L. 1994. PCR primers that allow intergeneric differentiation of *ascomycetes* and their application to *Verticillium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 4324–4331.

Liu, B., Wasilwa, L.A., Morelock, T.E., O'Neill, N.R. and Correll, J.C. 2007. Comparison of *Colletotrichum orbiculare* and several allied *Colletotrichum* spp. for mtDNA RFLPs, intron RFLP and sequence variation, vegetative compatibility and host specificity. *Phytopathology*, **97**: 1305-1314.

Lubbe, C.M, Denman, S., Cannon, P.F., Groenewald, J.Z., Lamprecht, S.C., Crous, P. W., 2004. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of *Proteaceae*. *Mycologia*, **96**(6), pp. 1268–1279

Martelli G.P., 1960. Primo contributo alla conoscenza della biologia di *Gloeosporium olivarum* Alm. *Phytopathologia Mediterranea* **1**: 31–43.

Martín M.P., García-Figueres F., 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 733-741.

Martín, M.P., García-Figueres F., Trapero A. 2002. Iniciadores específicos para detectar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de los olivos. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **28**: 43-50.

Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D., Freeman, S., 2006. Identification and Characterization of Benomyl-Resistant and Sensitive Populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from Statice (*Limonium* spp.) *The American Phytopathological Society*. 10.1094 / PHYTO-96-0542

McDonald BA, 1997. The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques. *Phytopathology* **87**: 448-453.

- Michailides, T.J., Vossen, P.V., McKenrl, M.V., 2011. Diseases of olive in California. *Olive Diseases and Disorders*, Cap. 18, pp. 1-23 ISBN: 978-81-7895-539-1
- Mincione, A., Valenzise, M., Runcio, A., Poiana, m., Agosteo, G.E., Taccone, P.
- Moral J, Trapero A., 2009. Assessing the susceptibility of olive cultivars to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* **93**: 1028-1036.
- Moral J., Bouhmidi K., Trapero A., 2008. Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* **92**: 1421-1426.
- Moral J., de Oliveira R., Trapero A., 2009. Elucidation of disease cycle of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* **99**: 548-556.
- Moral, J., Ávila, A., López-Doncel, L.M., Alsalimiya, M., Oliveira, R., Gutiérrez, F., Navarro, N., Bouhmidi, K., Benali, A., Roca, L.F., Trapero, A. 2005. Resistencia a los repilos de distintas variedades de olivo. *Vida Rural* **208**: 34-40.
- Moral, J., Oliveira, R., Tello, J.C., Trapero, A., 2007 Caracterización fisiológica y. patogénica de cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. Causantes de la antracnosis del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*
- Moriwaki, J., Sato, T., Tsukiboshi, T., 2003. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience*. **44**:47–53.
- Mullis, K.B., 1990. “The unusual origin of the *polymerase chain reaction*”. *Scientific American*, 262, pp. 56–61.
- Nakaune, R., Nakano, M., 2007. Benomyl resistance of *Colletotrichum acutatum* is caused by enhanced expression of b-tubulin 1 gene regulated by putative leucine zipper protein CaBEN1. *Fungal Genetics and Biology* **44** 1324–1335
- Nguyen, T. H. P., Vinnere Petterson, O., Olsson, P., Liljeroth, E., 2010. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. *European J Plant Pathol* **127**:73–87

Oliveira R., Moral J., Bouhmidi K., Trapero A., 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **31**: 531-548.

Peres N.A., Timmer L.W., Adaskaveg J.E., Correll J.C., 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* **89**: 784-796.

Peres, N.A.R., Souza, N.L., Peever, T.L., Timmer, L.W., 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Dis.* **88**: 125–130.

Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J., and Green, J. R. 1999. *Colletotrichum*: A model for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genet. Biol.* **27**:186-198.

Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., Hyde, K.D., 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. *Fungal Divers* **39**:89–109

Prusky D., McEvoy J.L., Leverentz B., Conway W.S. 2001. Host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Molecular Plant Microbe Interactions* **14**: 1105-1113.

Puhalla, J. E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* **63**:179-183.

Puhalla, J. E., Spiet, P. T., 1985. A comparison of heterokaryosis and vegetative incompatibility among varieties of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Exp. Mycol.* **9**:39–47

Rhouma A., Triki M.A., Msallem M., 2010. First report of olive anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea* **49**: 95-98.

Robideau, G.P., De Cock, A. W.A. M. Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, H, Chitty,D.W., Desaulniers, N., Eggertson, Q.A., Gachon, C.M.M, Hui Hu, C., Kupper, F.C., Rintoul, T.L., Sarhan, E., Verstappen, E.C.P., Zhang, Y., Bonants, P.J.M., Ristaino, J.B., Andre' Le' Vesque, C., 2011. DNA barcoding of oomycetes with

cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*. 03 041

Rodríguez-López, J., González-Prieto, M., Mayek-Pérez, N., 2009. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos *Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA* Volumen 27, Número 1

Scarito, G., Pane, A., Raudino, F., Frisullo, S., Cacciola, S.O. 2003, *Colletotrichum gloeosporioides* causal agent of olive rot in Sicily, *J. Plant Pathol.*, **84**, 310.

Sergeeva, V., 2011 b. Biological pest control. *The Olive Press*, iss.2, vol.16, pp.32-33.

Sergeeva, V., Hall, B., Tesoriero, L., Spooner-Hart, R-. Olive diseases and disorders in Australia and New Zealand. *Olive Diseases and Disorders*, 2011: 000-000 ISBN: 978-81-7895-539-1

Sergeeva V., Schena L., Mosca S., Mammella M.A., Faedda R., Cacciola S.O., 2010. *Colletotrichum acutatum* as causal agent of olive anthracnose in Australia. *Petria* **20**: 251.

Sergeeva V., Spooner-Hart R., Nair N.G., 2008 a. Evidence of early flower infection in olives (*Olea europaea*) by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing anthracnose disease. *Australasian Plant Pathology* **3**, 81-82

Sergeeva V., Spooner-Hart R., Nair N.G., 2008 b. First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing leaf spots of olives (*Olea europaea*) in Australia. *Australasian Plant Pathology* **3**: 143-144.

Sherriff, C., Whelan, M.J., Arnold, G.M., Lafay, J.F., Brygoo, Y. and Bailey, J.A. 1994. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology* **18**: 121-138.

Shivas R.G., Tan Y.P., 2009. A taxonomic re-assessment of *C. acutatum* introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. *Fungal Diversity* **39**: 111-122.

Sreenivasaprasad S., Talhinhos P., 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular Plant Pathology* **6**: 361-378.

Stephenson, S.A, Green, J.R., Manners, J.M., Maclean, D.J., 1997. Cloning and characterisation of glutamine synthetase from *Colletotrichum gloeosporioides* and demonstration of elevated expression during pathogenesis on *Stylosanthes guianensis*, *Curr Genet* (1997) **31**: 447 – 454

Sutton B.C., 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey J.A, Jeger M.J. (eds). *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control, pp. 1-26. CAB International, Wallingford, UK.

Talhinhos P., Mota-Capitão, Martins S., Ramos A.P., Neves-Martins J., Guerra-Guimarães L., Várzea V., Silva M.C., Sreenivasaprasad S., Oliveira H., 2010. Epidemiology, histopathology, and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathology* **60**: 483-495.

Talhinhos P., Neves-Martins J., Oliveira H., Sreenivasaprasad S. 2009. The distinctive population structure of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose in the Algarve region of Portugal reflects a host-pathogen diversity hot spot. *FEMS Microbiology Letters* **296**: 31-38.

Talhinhos P., Sreenivasaprasad S., Neves-Martin J., Oliveira H., 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal the association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2987-2998.

Templeton, M.D., Rikkerink, E.H., Solon, S.L, Crowhurst, R.N., 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* **122**:225–230

Than, P.P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P.W.J., Hyde, K.D. 2008. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University: Science B* **9**: 764-778.

Tingey, S.V., de1 Tufo, J.P, 1993. Genetic Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Plant Physiol.* **101**: 349-352

Trapero Casas A., 2003. La Antracnosis o Aceituna jabonosa en el cultivo del olivo. *Vida Rural* **168**: 46-50.

Valero, M., García-Martínez, S.M., Giner, M.J., Alonso, A., Ruiz, J.J., 2010. Benomyl sensitivity assays and species-specific PCR reactions highlight association of two *Colletotrichum gloeosporioides* types and *C. acutatum* with rumple disease on *Primofiori lemons*. *Eur J Plant Pathol* 127:399–405

Varshney¹, Rajeev K. Andreas Graner¹ and Mark E. Sorrells, 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications: Review, *Elsevier. Trends in Biotechnology.* Vol.23 No.1

Vinnere, O., Fatehi, J., Wright, S.A.I, Gerhardson, B. 2002. The causal agent of anthracnose of Rhododendron in Sweden and Latvia. *Mycological Research* 106(1), 60-69.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee Tvd, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.

Walker, H.L., Templeton, G.E., 1978. In vitro production of a phytotoxic metabolite by *Colletotrichum gloeosporioides* f. Sp. *Aeschynomene*. *Plant Science Letters*, **13**, 91-96 91

Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 24 7213

Wharton, P.S., Diéguez-Uribeondo, J., 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61: 3-22.

White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: PCR Protocols. A guide to methods and applications". (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, eds.), Academic Press, San Diego, USA: 315-320.

Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J. Tingey, S. 1990. DNA

polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18** (22), 6531.

CAPITOLO II

2. Caratterizzazione biologico-molecolare di isolati di *Colletotrichum acutatum* *sensu lato*, agenti dell'antracnosi dell'olivo

2.1. Introduzione

Colletotrichum acutatum sensu lato (*s.l.*), distinzione introdotta da Johnston e Jones (1997), rappresenta un complesso di specie caratterizzate da elevata eterogeneità filogenetica e morfologica (Johnston e Jones, 1997; Lardner *et al.*, 1999; Guerber *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005; Sreenivasaprasad e Talhinhos, 2005; Hyde *et al.*, 2009 a; Shivas e Tan, 2009). *C. acutatum s.l.* include importanti funghi fitopatogeni con ampia distribuzione mondiale, responsabili di malattie, note con il termine di antracnosi, in grado di causare ingenti perdite economiche su un' ampia gamma di ospiti, appartenenti a più di 40 famiglie differenti, incluse piante erbacee, arboree, coltivate e spontanee, ornamentali, foraggere, ortive e perenni diffuse nelle regioni tropicali, subtropicali e temperate (Freeman *et al.*, 1998; Lardner *et al.*, 1999; Sreenivasaprasad e Talhinhos, 2005; Hyde *et al.*, 2009 a; Shivas e Tan, 2009). *C. acutatum* J.H. Simmonds ex J.H. Simmonds fu descritto per la prima volta da Simmonds (1965) come specie separata e agente causale dell'antracnosi della papaya in Australia (Peres *et al.*, 2005; Shivas e Tan, 2009) e successivamente identificato su diversi altri ospiti (Adaskaveg e Hartin, 1997; Freeman *et al.*, 1998; Martin e Garcia-Figueres, 1999; Peres *et al.*, 2005; Sreenivasaprasad e Talhinhos, 2005; Whitelaw-Weckert *et al.*, 2007; Shivas e Tan, 2009). Prima di questa data *C. acutatum* era stato considerato una delle numerose varianti morfologiche di *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz e Sacc. in Penz., o appartenente alla specie *Gloeosporium* (Von Arx), (Guerber *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005). Il teleomorfo di *C. acutatum* è riferibile a *Glomerella acutata* J.C. Guerber & J.C. Correll, ed è stato ottenuto *in vitro* la prima volta da Guerber e Correll (2001). Recentemente è stato osservato anche in natura in Norvegia su frutti di mirtillo, ma non è stato mai osservato su olivo (Cacciola *et al.*, 2011). Quando Simmonds nel 1965 descrisse per la prima volta la specie *C. acutatum* omise però di designare il campione di riferimento. Successivamente, nel 1968, indicò un olotipo (IMI 117617) e sei paratipi (IMI 117618-117623) con corrispondente isotipo e 6 isoparatipi raggruppati nell'erbario BRIU (2431-2437) ora nell'erbario BRI (Queensland herbarium indooroopilly), provenienti da ospiti differenti: un olotipo e 4 paratipi da papaya

(*Carica papaya*), un paratipo da *Capsicum frutescens* e un paratipo da *Delphinium ajacis*. Il concetto così “ampio” introdotto da Simmonds, ha creato inevitabilmente incertezza nel riconoscimento della specie, a causa dalla presenza di elevata variabilità morfologica e molecolare negli isolati di riferimento (Than *et al.*, 2008 a; Hyde *et al.*, 2009; Shivas e Tan, 2009), che potrebbero rappresentare delle specie distinte. Ulteriore confusione è stata generata quando uno degli ex-paratipi (IMI 117620) individuati da Simmonds è stato depositato in Nuova Zelanda come ICMP 1783 e successivamente depositato negli Stati Uniti come ATCC 56816 e nei Paesi Bassi come CBS 294,671. Attraverso la comparazione delle sequenze ITS del DNA ribosomiale (rDNA) dell’olotipo (IMI 117617) e di un paratipo (IMI 117619), Vinnere *et al.* (2002) hanno rivelato che i due isolati differivano per una coppia di basi. Al fine di fare chiarezza nel concetto di specie, Than *et al.* (2008) hanno recentemente designato un isolato di *C. acutatum* da *Carica papaya* proveniente da Yandina nel sud-est del Queensland (Australia, come nuova specie epifita (BRIP 28519) di *C. acutatum*.

Le colonie di *C. acutatum s. l.* si caratterizzano per un micelio di colorazione chiara, inizialmente bianco che tende a ricoprirsi di masse, rappresentate da conidi, di colorazione roseo-arancio. In particolare, gli isolati appartenenti a *C. acutatum sensu stricto* (s.s.) sono altamente cromogenici, espellendo pigmenti rossi e rosati, su substrato culturale (Jonhston e Jones, 1997). I conidi sono generalmente ellissoidali e fusiformi almeno ad una delle due estremità. Tuttavia, *C. acutatum senso lato* è caratterizzato da elevata variabilità fenotipica e genotipica, rendendo difficoltosa la discriminazione dalle altre specie, e in particolar modo da *C. gloeosporioides* con il quale esibisce la sovrapposizione di alcuni tratti morfologici e ospiti (Freeman *et al.*, 1998, Guerber *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005; Sreenivasaprasad e Thalhinis, 2005). Nel corso degli anni, grazie all’ausilio di strumenti molecolari diversi autori hanno identificato distinti gruppi genetici all’interno della specie *C. acutatum* (Brown *et al.*, 1996; Lardner *et al.*, 1999; Sreenivasaprasad e Thalhinis, 2005; Shivas e Tan, 2008). Johnston *et al.* (1997), per primi introdussero il concetto di *C. acutatum senso lato* per distinguere sulla base di caratteri morfologici e molecolari 3 raggruppamenti (A-B-C) di *C. acutatum* senso Simmonds, includendo la specie *Glomerella miyabeana* e *C. acutatum* f.sp. *pineum*. Successivamente, Lardner *et al.* (1999) hanno distinto *C. acutatum senso lato* in sette diversi *taxa*, con cinque gruppi geneticamente e morfologicamente omogenei, indicati

come gruppi A, B, C, D, E e due specie distinte, indicate come *Glomerella miyabeana* (Fukushi) Arx e *C. acutatum* f.sp. *pineum* Dingley et J.W. Gilmour. Il gruppo A comprendeva isolati di *C. acutatum sensu* Simmonds, i gruppi B e C comprendenti isolati agenti di antracnosi dei frutti e i gruppi C e D cui appartenevano agenti responsabili di antracnosi in specie di *Lupinus*.

Recentemente, attraverso l'analisi delle regioni ITS del rDNA ribosomiale, di frammenti del gene β -*tubulina2*, dei geni GS e GDPH e mediate analisi RAPD-PCR sono stati identificati nove differenti gruppi (A1-A9) nell'ambito di *C. acutatum* s.l., accomunati da caratteristiche morfologiche e genetiche oltre che da ospiti vegetali e distribuzione geografica (Sreenivasaprasad e Talhinhos, 2005; Whitelaw-Weckert *et al.*, 2007; Shivas and Tan, 2009). Due di questi gruppi (A2 e A3) sono stati successivamente elevati a specie indipendenti ed hanno ricevuto i nomi di *C. fioriniae* comb. et stat. nov e *C. simmondsii* sp. nov. (Shivas and Tan, 2009). Come riportato da questi Autori i gruppi A2, A3, A4, A5 e A6 e A9 sono stati tutti associati all'olivo e il gruppo A5 è stato identificato come *C. acutatum sensu stricto* (s. s.).

Colletotrichum acutatum gruppo B (Lardner *et al.*, 1999) identificato anche come gruppo A4 (Sreenivasaprasad e Talhinhos, 2005) è un patogeno cosmopolita su un'ampia gamma di ospiti tra cui *Olea europaea*, *Fragaria* × *Ananassa*, *Lycopersicon esculentum*, *Malus domestica*, *Ficus carica*, *Eriobotrya japonica*, *Feijoa sellowiana*, *Hepatica acutiloba*, *Sambucus nigra*, *Prunus dulcis*, *Rhododendron* spp. *Rubus* sp., *Ceanothus* sp., *Vitis* sp., *Juglans* sp., *Primula* sp., *Camellia* sp. e *Bergenian* sp. Questo gruppo è stato dimostrato essere il principale agente responsabile di epidemie di antracnosi dell'olivo (*O. europaea*) in Grecia, Italia, Andalusia (sud della Spagna) e il Montenegro, mentre in altre aree geografiche quali Portogallo, Sud Africa e Australia predominano altri gruppi genetici di *C. acutatum* s. l. (Cacciola *et al.*, 2007; Talhinhos *et al.*, 2009, Talhinhos *et al.* 2011; Sergeeva *et al.*, 2010; Faedda *et al.*, 2011).

L'antracnosi dell'olivo rappresenta una delle più importanti malattie fungine per questa coltura ed è diffusa in tutte le aree di coltivazione, in particolar modo nei Paesi del Bacino Mediterraneo e la sua presenza è stata segnalata anche in America, Australia, India, Cina, Giappone, Brasile (Duarte *et al.*, 2010, Sergeeva *et al.*, 2008) e Tunisia (Rhouma *et al.*, 2010) con ingenti perdite economiche dovute alla perdita di produzione oltre che alla compromissione delle caratteristiche organolettiche degli oli prodotti da

olive infette (Graniti *et al.*, 1993; Martín *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2005; Moral *et al.*, 2008; Moral *et al.*, 2009; Moral e Trapero, 2009). In studi precedenti è stato ipotizzato che questo gruppo, come è successo per i gruppi A2 e A3 nell'ambito di *C. acutatum s. l.*, possa rappresentare un specie distinta di *Colletotrichum*, ipotesi supportata anche dalla maggiore distanza filogenetica del gruppo A4, rispetto al gruppo A5 (*C. acutatum s. s.*) che risulta essere più vicino ai gruppi A2 e A3 (Talhinhas *et al.*, 2010), recentemente elevati a specie distinte (Shivas and Tan, 2009).

Nel corso del presente lavoro è stata analizzata una collezione di isolati appartenente principalmente al gruppo A4 di *C. acutatum*, ma rappresentativa anche degli altri gruppi di *C. acutatum s.l.* cui appartengono agenti dell'antracnosi dell'olivo al fine di confermare l'ipotesi che il gruppo A4 costituisca una specie a se stante. Le indagini sono state condotte principalmente con strumenti molecolari, ma anche mediante caratterizzazione morfologica e biologica volta a stabilire la virulenza dei diversi agenti di antracnosi su olive artificialmente inoculate.

2.2. Materiali e metodi

2.2.1. Isolati fungini

Lo studio ha riguardato soprattutto isolati di *C. acutatum s. l.* appartenenti soprattutto al gruppo al gruppo A4 ed in minor misura al gruppo A5, a *C. fioriniae* e a *C. simmondsii* (Tab. 1). Alcuni isolati di *C. gloeosporioides s.l.* sono stati utilizzati come elementi di comparazione (Tab. 1). Gli isolati analizzati sono stati ottenuti principalmente da olive provenienti da alcune dall'Italia centrale, meridionale e insulare oltre che da Portogallo e l'Australia. Tutti gli isolati fanno parte della collezione micologica del Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari e Forestali, dell'Università "Mediterranea" di Reggio Calabria e del Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari e Ambientali dell'Università di Catania.

Tabella 1. Isolati di *Colletotrichum* spp. esaminati in questo studio

Codice identificativo degli isolati	Ospite di provenienza	Origine geografica	Data di isolamento	Codici di accesso alle sequenze depositate in "GenBank"*				
				ITS-rDNA	β -tubulin 2 regione 1	β -tubulin 2 regione 2	GPDH	DNA Mitochondriale (Mt5F-5R)
<i>C. clavatum</i> (precedentemente <i>C. acutatum</i> gruppo B ^a o A4 ^b)								
CBS 193.32 ^c	<i>Olea europaea</i>	Grecia	1932 ^c	AJ749688	AJ748612	n.d.	n..s	n.d.
C7	<i>Olea europaea</i>	Calabria	19992	n.d.	n.d.	n.s.	n..s	n.s.
64	<i>O. europaea</i>	Matino (LE), Puglia, Italia	2010	JN121168	JN121255	n.d.	n.d.	n.d.
AZJ	<i>Azalea japonica</i>	Biella, Piedimonte, Italia	2005 ^d	JN121181	JN121268	n.d.	n.d.	n.d.
CAMP30	<i>O. europaea</i>	Montesano Salentino (LE), Puglia, Italia	2005	JN121149	JN121236	n.s	n.d.	n.d.
CAMP36	<i>O. europaea</i>	S. Giorgio Morgeto (RC), Calabria, Italia	2005	JN121142	JN121229	n.s	n.d.	n.s.
CGMUL	<i>O. europaea</i>	Montenegro	1994	JN121179	JN121266	n.s	n.d.	n.d.
CIRRI	<i>O. europaea</i>	Ruffano (LE), Puglia, Italia	1998	JN121164	JN121251	n.s	n.s	n.d.
FV168	<i>O. europaea</i>	Gioia Tauro, Calabria, Italia	2010	n.d.	n.d.	n.s	n..s	n.s.
IMI 398855 (OL20)	<i>O. europaea</i>	Ruffano (LE), Puglia, Italia	1992	JN121147	JN121234	n.d.	n.d.	n.d.
ITRANA	<i>O. europaea</i>	Calabria, Italia	1998	JN121132	JN121219	n.s	n.d.	n.d.
MELA	<i>Malus domestica</i>	Sicilia, Italia	2000	JN121180	JN121267	n.s	n.s	n.d.
OL10	<i>O. europaea</i>	Rizziconi (RC), Calabria, Italia	1992	JN121126	JN121213	n.s	n.d.	n.d.
OL11	<i>O. europaea</i>	Rizziconi (RC), Calabria, Italia	1992	JN121130	JN121217	n.d.	n.s	n.d.
OL17	<i>O. europaea</i>	Ruffano (LE), Puglia, Italia	1992	JN121155	JN121242	n.s	n.d.	n.d.
OL21	<i>O. europaea</i>	Ruffano (LE), Puglia, Italia	1992	JN121156	JN121243	n.s	n.d.	n.d.
OL5	<i>O. europaea</i>	Gioia Tauro (RC), Calabria, Italia	1992	JN121128	JN121215	n.s	n.d.	n.d.
OLF21	<i>O. europaea</i>	Ruffano (LE), Puglia, Italia	1992	JN121159	JN121246	n.s	n.d.	n.d.

Codice identificativo degli isolati	Ospite di provenienza	Origine geografica	Data di isolamento	Codici di accesso alle sequenze depositate in "GenBank"*				
				ITS-rDNA	β -tubulin 2 regione 1	β -tubulin 2 regione 2	GPDH	DNA Mitochondriale (Mt5F-5R)
OLF22	<i>O. europaea</i>	Ruffano (LE), Puglia, Italia	1992	JN121160	JN121247	n.s	n.d.	n.d.
OLF40	<i>O. europaea</i>	Puglia, Italia	1992	JN121161	JN121248	n.s	n.d.	n.d.
OLF48	<i>O. europaea</i>	Puglia, Italia	1992	JN121162	JN121249	n.s	n.d.	n.d.
OLF97E	<i>O. europaea</i>	Ruffano (LE), Puglia, Italia	1992	JN121163	JN121250	n.s	n.d.	n.d.
OLP10	<i>O. europaea</i>	Rizziconi (RC), Calabria, Italia	1999	JN121135	JN121222	n.s	n.s	n.d.
OLP11	<i>O. europaea</i>	Rizziconi (RC), Calabria, Italia	1999	JN121136	JN121223	n.s	n.s	n.d.
OLP12	<i>O. europaea</i>	Rizziconi (RC), Calabria, Italia	1999	JN121137	JN121224	n.s	n.s	n.d.
OLP13	<i>O. europaea</i>	Rizziconi (RC), Calabria, Italia	1999	JN121138	JN121225	n.s	n..s	n.d.
OLP14	<i>O. europaea</i>	Rizziconi (RC), Calabria, Italia	1999	JN121139	JN121226	n.s	n.d.	n.d.
OLP16	<i>O. europaea</i>	Rizziconi (RC), Calabria, Italia	1999	JN121140	JN121227	n.s	n.s	n.d.
OLP2	<i>O. europaea</i>	Taurianova (RC), Calabria, Italia	1998	JN121133	JN121220	n.s	n.s	n.d.
OLP8	<i>O. europaea</i>	Taurianova (RC), Calabria, Italia	1998	JN121134	JN121221	n.s	n.d.	n.d.
ORA1	<i>O. europaea</i>	Sardegna, Italia	1995	JN121174	JN121261	n.s	n.s	n.d.
ORA2	<i>O. europaea</i>	Sardegna, Italia	1995	JN121175	JN121262	n.s	n.d.	n.s.
UMB1	<i>O.europaea</i>	Umbria, Italia	2003	JN121176	JN121263	n.d.	n.s	n.d.
<i>C. acutatum</i> A5								
67	<i>P. dulcis</i>	NSW, Australia	2001 ^d	JN121188	JN121275	n.d	n..s	n.d.
OLE	<i>Nerium oleander</i>	Milazzo (ME), Sicilia, Italia	2001	JN121189	JN121276	n.d	n.d.	n.d.
UWS103	<i>O. europaea</i>	Hunter Valley Pokolbin, NSW, Australia	2008	JN 121184	JN121271	n.s	n.d.	n.d.
UWS14	<i>O. europaea</i>	Menangle, NSW, Australia	2007	JN 121183	JN121270	n.s	n.d.	n.d.
UWS147	<i>O.europaea</i>	Hopelands, Australia	2008	JN121185	JN121272	n.d	n.s	n.d.

Codice identificativo degli isolati	Ospite di provenienza	Origine geografica	Data di isolamento	Codici di accesso alle sequenze depositate in "GenBank"*				
				ITS-rDNA	β -tubulin 2 regione 1	β -tubulin 2 regione 2	GPDH	DNA Mitochondriale (Mt5F-5R)
UWS149	<i>O. europaea</i>	Agonis Ridge WA Australia	2008	JN121186	JN121273	n.d.	n.s	n.d.
UWS161	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.	n.s.	n.d.	n.d.
UWS165	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.	n.s.	n.s	n.d.
UWS166	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	JN121187	JN121274	n.s.	n..s	n.d.
UWS167	<i>O.europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.	n.s	n..d.	n.d.
<i>C. fioriniae</i>								
ACUVA	<i>Vitis vinifera</i>	Conversano (BA), Puglia, Italia	1998	JN121191	JN121278	n.s.	n.s	n.d.
OLPUGLIA	<i>O. oleaster</i>	Smirne, Turchia	1998	JN121190	JN121277	n.s.	n.d.	n.d.
1409	<i>Carica papaya</i>	Hawaii	1999 [^]	JN121192	JN121279	n.s.	n.s	n.d.
1491	<i>Vaccinium myrtilus</i>	Lazio, Italia	2002	JN121193	JN121280	n.s.	n.s..	n.d.
<i>C. simmondsii</i>								
1036	<i>Cyclamen</i>	Lazio, Italia	2002	JN121208	JN121295	n.s.	n.s.	n.s..
1566	<i>O. europaea</i>	Tavira, Algarve, Portogallo	2006	JN121202	JN121289	n.s.	n..s	n.s..
1567	<i>O. europaea</i>	Tavira, Algarve, Portogallo	2006	JN121203	JN121290	n.d.	n.s	n.d.
1568	<i>O. europaea</i>	Evora, Alto Alentejo, Portogallo	2006	JN121204	JN121291	n.d.	n.s	n.d.
1568B	<i>O. europaea</i>	Evora, Alto Alentejo, Portogallo	2006	JN121205	JN121292	n.d.	n.d.	n.d.
1570	<i>O. europaea</i>	Santarem, Ribatejo, Portogallo	2006	JN121207	JN121294	n.d.	n.s	n.s.
1572	<i>O. europaea</i>	Estremoz, Alto Alentejo, Portogallo	2006	JN121206	JN121293	n.d.	n.s	n.s.
725	<i>Fragaria x ananassa</i>	Yolo, CA Stati Uniti	1999	JN121194	JN121281	n.d.	n.s	n.d.
CAF	<i>Fragaria x ananassa</i>	Lamezia Terme (CZ), Calabria, Italia	1998	JN121196	JN121283	n.d.	n.d.	n.d.
CBS 231.49 ^f	<i>O. europaea</i>	Portogallo	1949	JN121201	JN121288	n.d.	n.d.	n.d.
SPL100	<i>Fragaria x ananassa</i>	Yolo, CA Stati Uniti	1998	JN121195	JN121282	n.d.	n.d.	n.s.

Codice identificativo degli isolati	Ospite di provenienza	Origine geografica	Data di isolamento	Codici di accesso alle sequenze depositate in "GenBank"*				
				ITS-rDNA	β -tubulin 2 regione 1	β -tubulin 2 regione 2	GPDH	DNA Mitochondriale (Mt5F-5R)
UWS68	<i>O. europaea</i>	Hunter Valley Laguna, NSW, Australia	2007	JN12199	JN 121286	n.d.	n.d.	n.s..
UWS137	<i>O. europaea</i>	Springbrook, QL, Australia	2008	JN121200	JN 121287	n.d.	n.s	n.s.
UWS159	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.	n.s.	n.s	n.s.
UWS160	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.	n.s.	n.s	n.s.
UWS162	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.	n.s.	n.d	n.s..
UWS163	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.	n.s.	n.d	n.s.
UWS164	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.	n.s.	n..s	n.s.
UWS178	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.	n.s.	n..s	n.s.
<i>C. gloesporioides</i>								
8	<i>Citrus sinensis</i>	Yolo, CA Stati Uniti	1999 ^{d,e}	n.d.	n.d.	n.d.	n.s	n.d.
1765	<i>Citrus sp.</i>	Stati Uniti	1999 ^d	n.d	n.d.	n.s.	n.s.	n.s
C2	<i>C. limon</i>	Lamezia Terme (CZ), Calabria, Italia	1992	n.d	n.d.	n.s.	n.s.	n.s

*N.D. = sequenze non ancora depositate in "GenBank";

**N.S. = regioni geniche non sequenziate

^a Gruppo descritto da Lardner *et al.* (1999)

^b Gruppo definito da Sreenivasaprasad e Talhinas (2005)

^c Isolati depositato da Petri nel 1932 fornito come *C. gloesporioides* presso Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). Paesi Bassi

^d Anno di ricevimento degli isolati

^e Isolati citati in Forster e Adaskaveg, 1999

^f Isolati depositati da G.J.M.A. Gorter nel 1949 fornito come *C. gloesporioides* in CBS

2.3. Caratterizzazione molecolare

2.3.1. Estrazione di DNA da micelio

Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato micelio in attiva crescita prelevato da colture fungine allevate su substrato PDA al buio a 24°C. Per l'estrazione del DNA è utilizzata la procedura descritta da Schena e Cooke (2006) basata sull'uso di solventi organici (fenolo, cloroformio e alcool isoamilico). In una microprovetta Eppendorf da 2 ml sono stati posti 100 mg di micelio e 100 µl di soluzione tampone (2% Triton x100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, e da EDTA 1 mM pH8) (Hoffman e Winston, 1987), 1 g di sfere di vetro ("glass beads acid-washed") con diametro di 425-600 µm (Sigma aldrich), 2 sfere d'acciaio (Ø 3 mm) e una soluzione di Fenolo-Cloroformio-Alcool isoamilico (25:24:1). La sospensione è stata omogeneizzata con l'ausilio di un Vibromulino (Retsch Italia) mediante agitazione per 3 minuti alla velocità massima. I campioni sono stati centrifugati per 10 minuti alla velocità di 13.200 rpm a 4°C. Il sovrantante è stato recuperato e trasferito in una nuova microprovetta da 1.5 ml cui è stata aggiunta una soluzione di Fenolo-Cloroformio-Alcool isoamilico (25:24:1). Dopo una breve agitazione con Vibromulino alla massima velocità i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 13.200 rpm a 4°C. Il sovrantante è stato recuperato e posto in una nuova microprovetta Eppendorf da 1.5 ml, addizionato con una soluzione di Cloroformio-Alcool isoamilico (24:1), agitato nel Vibromulino alla massima velocità e centrifugato a 13.200 rpm a 4°C. Il sovrantante è stato posto in una nuova microprovetta e gli acidi nucleici in esso contenuti sono stati precipitati con 2 volumi di isopropanolo e 1/10 di volume di sodio acetato (CH₃COONa) 3M. La sospensione ottenuta è stata invertita più volte e mantenuta alla temperatura di -20°C per circa un'ora. I campioni sono stati centrifugati per 20 minuti a 13200 rpm a 4°C, e il precipitato formatosi alla base della microprovetta è stato lavato due volte con 1 volume di Etanolo al 70% freddo (-20 °C), disidratato a temperatura ambiente e risospeso in 50 µl di acqua ultrapura priva di nucleasi ("nuclease-free water").

2.3.2. Amplificazione dei geni nucleari di interesse

La lista completa dei *primer* utilizzati per l'amplificazione dei geni nucleari di interesse è riportata in Tab 2. Per l'amplificazione della regione ITS1-5.8S-ITS2 dell'rDNA sono stati utilizzati i *primer* universali ITS5-ITS4 (White *et al.*, 1990). Nel caso della β -tubulina 2 sono stati amplificati e sequenziati due differenti frammenti di circa 750 bp (regione 1) e 1000 bp (regione 2). La regione 1 è costituita prevalentemente da introni, si estende tra l'esone 1 e 6 (Glass e Donaldson, 1995), è stata amplificata utilizzando i *primer* T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997) e β t/2b (Glass e Donaldson, 1995) presenti in letteratura. La regione 2 della β -tubulina 2, che si estende tra l'esone 5 e 7 ed è prevalentemente costituita da esoni, è stata amplificata e sequenziata utilizzando due *primer* (Btub2/1f-Btub/3R) specificamente disegnati nel corso della ricerca mediante allineamento e comparazione di oltre 1000 sequenze di specie fungine, ed in particolare di tutte le sequenze di *Colletotrichum* spp. disponibili nelle banche dati genetiche (GenBank). Altre due coppie di *primer* disegnate per amplificare la medesima regione sono state scartate nelle fasi preliminari della ricerca.

La coppia di *primer* GDF1-GDFR1 (Templeton *et al.*, 1992) è stata impiegata per amplificare la regione intronica di circa 200 bp del gene nucleare della gliceraldeide-3 fosfato deidrogenasi (GPDH).

Tab.2 *Primer* utilizzati nel presente lavoro per amplificare i geni di interesse

Regione genica	<i>Primer</i>	Sequenza	Riferimento bibliografico
ITS-5.8S-ITS2	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS4	CCTCCGCTTATTGATATGC	
β -tubulina 2 (regione 1)	T1	CTTACAATCTCACGCATGTT	O'Donnell e Cigelnik, 1997
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Glass e Donaldson, 1995
β -tubulina 2 (regione 2)	Btub2/1f	TGAARYGTCTAVTTCAACGAA	Presente lavoro
	Btub/3R	TTGTTVGGRATYCTYTCRAC	
GPDH	GDF1	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	Templeton <i>et al.</i> , 1992; Guerber <i>et al.</i> , 2003)
	GDR1	GGGTGGAGTCGTACTIONGAGCATGT	

Tutte le reazioni di PCR sono state realizzate con un termociclatore (Mastercycler, Eppendorf) secondo le seguenti condizioni di amplificazione: una denaturazione iniziale a 94°C per 3 min, seguita da 40 cicli di 30 s a 94°C, 30 s a 55°C e 45 s a 72°C, con una

estensione finale a 72°C per 10 min. Per l'amplificazione dei geni della β -tubulina 2 e del GPDH è stato necessario abbassare la temperatura di "annealing" a 52°C. Le reazioni sono state condotte in un volume finale di 30 μ l contenenti 1 μ l di DNA genomico (100 mM), 1X Buffer (Invitrogen), 50 mM di MgCl₂, 2,5 mM di ogni dNTP, 10 μ M di ciascun *primer* e 1U Taq polimerasi (Invitrogen).

I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% in tampone TBE (Tris-borato, EDTA) e visualizzati mediante colorazione con SYBR SAFE DNA gel stain (Invitrogen). Per la stima delle dimensioni degli ampliconi è stato utilizzato un 100 bp marker (Invitrogen). Tutte le immagini dei gel elettroforetici sono state acquisite mediante Gel Doc (Biorad).

2.3.3. Amplificazione mtDNA mitocondriale

Per l'amplificazione ed il sequenziamento di frammenti del DNA mitocondriale sono state disegnate 10 coppie di *primer* degenerati mediante comparazione dell'intero genoma mitocondriale di 24 differenti specie fungine rappresentative dell'intero *phylum* Ascomycota (Schoch *et al.*, 2009) (Tab. 3). Le differenti sequenze geniche sono state allineate al fine di individuare regioni sufficientemente conservate fiancheggiando regioni variabili su cui disegnare *primer* potenzialmente universali. Tutti i *primer* sono stati disegnati con il programma Primer 3 (Rozen e Skaletsky, 2000) e modificati manualmente al fine di inserire degenerazioni quando necessario. I diversi set di *primer* sono stati saggiati utilizzando DNA estratto da 19 diverse specie fungine rappresentative dei maggiori gruppi nell'ambito del *phylum* Ascomycota (Schoch *et al.*, 2009). Cinque coppie di *primer* hanno permesso l'amplificazione di un frammento delle dimensioni attese da tutti gli isolati, ma solo una di esse (MtC5F-MtC6R) ha in seguito prodotto sequenze di elevata qualità, mentre le altre coppie hanno solo amplificato da uno o pochi isolati e pertanto sono state escluse dalle analisi.

Tab. 3. *Primer* utilizzati nel presente lavoro per amplificare frammenti del mtDNA

<i>Primer</i>	Sequenza
MtC1F	AAAGGGAAACAGCCCAGAAC
MtC2R	TAAACAGkCGTACAACAyTATTTyATG
MtC3F	CTyATTAGCTCAATGGyAGAGCAdAATA
MtC4R	ACTwsCATATTCAGCTArrAArAArAA
MtC5F	TTTGrTGATGGCTCTGAyTG
MtC6R	CGTmTTrCCGCGACTGCTG
MtC6F	CAGCAGTCGCGGyAAkACG
MtC7R	AACATACTTCACTACTGGTkTCAr
MtC7F	TyTGAmACCAGTAGTGAAGTATGTT
MtC8F	GTGTAAAGTCGAAATAhGGTTTCG
MtC8R	CGAACCdTATTTTCGACTTAACAC
MtC9R	ATTAACAGTATyhyGCTCTACCrTTG
MtC10F	CwGGwGTwACwTTAGCwATGCAY
MtC11R	AbhTTCwACrTGTTTwGCwCCT
MtC12F	TGGTWTAyGCyATGATGTCTAThGG
MtC13R	TTGTAAwCCTAAGAAATGTTGwGGr

Le reazioni di PCR sono state condotta in un volume totale di 30 μ l contenenti 1 μ l di DNA genomico (100 mM), 1X Buffer (Invitrogen), 50 mM di $MgCl_2$, 2,5 mM di ogni dNTP, 10 μ M di ciascun *primer* e 1U di Taq polimerasi (Invitrogen). Le condizioni di amplificazione sono state uguali a quelle descritte per i geni nucleari, ma la temperatura di “annealing” è stata ridotta a 40°C.

2.3.4. Sequenziamento delle regioni geniche di interesse

I prodotti dell’amplificazione di tutti i geni selezionati sono stati purificati, per eliminare *primer* in eccesso e dimeri degli stessi *primer*, con l’uso di colonnine di purificazione PCRExtract Mini Kit (5 Prime GmbH). Per la purificazione è stata seguita la procedura indicata dalla casa produttrice. I prodotti dell’amplificazione sono stati analizzati nuovamente mediante elettroforesi come descritto in precedenza.

I frammenti purificati sono stati sequenziati in entrambe le direzioni mediante servizio di sequenziamento esterno eseguito dalla ditta MacroGen presso la sua filiale in Europa (Amsterdam, Olanda). Gli elettroferogrammi ottenuti sono analizzati con il

programma ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>) per verificare la qualità e l'affidabilità delle sequenze e per generare la sequenza consenso dalle due sequenze ("forward" e "reverse") ottenute per ciascun campione. Tutte le sequenze ottenute sono state comparate con quelle disponibili nelle banche dati internazionali mediante analisi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (Tab. 4). Inoltre, le sequenze ottenute nel presente lavoro di tesi insieme ad altre selezionate tra quelle disponibili in GenBank sono state allineate utilizzando ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) e introdotte nel programma TOPALi (www.topali.org/) per la costruzione di alberi filogenetici con i metodi PhyML e MrBayes (Milne *et al.*, 2008).

Tabella 4. Sequenze ITS 5.8S-ITS2 del rDNA ottenute da isolati di riferimento ed utilizzate nelle analisi molecolari

Codice isolato	Ospite	Origine geografica	Codici di accesso (GenBank)	Articolo di riferimento
<i>C. clavatum</i>				
JG05	<i>Ceanothus sp.</i>	Francia	AJ300557	Talhinhas <i>et al.</i> , 2002
CBS 193.32	<i>Olea europaea</i>	Grecia	AJ749688	Talhinhas <i>et al.</i> , 2005
PT169	<i>O. europaea</i>	Portogallo	AJ749685	Talhinhas <i>et al.</i> , 2005
<i>C. acutatum</i> A5				
IMI 117620 (ex-paratipo)	<i>Carica papaya</i>	Australia	FJ788417	Shivas and Tan, 2009
<i>C. simmondsii</i>				
BRIP 28519	<i>C. papaya</i>	Australia	GU183331	Shivas and Tan, 2009
STE-U 4452	<i>Protea magnifica</i>	Sud Africa	AY376503	Lubbe <i>et al.</i> , 2004
PT135	<i>O. europaea</i>	Portogallo	AJ749683	Talhinhas <i>et al.</i> , 2005
<i>C. fioriniae</i>				
EHS58 (ex-olotipo)	<i>Fiorinia externa</i>	Stati Uniti	EF464594	Marcelino <i>et al.</i> , 2008
STE-U 5287	<i>Malus sp</i>	Stati Uniti	AY376509	Lubbe <i>et al.</i> , 2004
<i>C. acutatum</i> A1				
IMI 350308	<i>Lupinus sp</i>	Sconosciuta	AJ300561	Talhinhas <i>et al.</i> , 2002
CA546	<i>Lupinus sp</i>	Sconosciuta	AJ749674	Talhinhas <i>et al.</i> , 2005
<i>C. acutatum</i> A6				
PT250	<i>O. europaea</i>	Portogallo	AJ749700	Talhinhas <i>et al.</i> , 2005
S2	<i>Rhododendron x orbiculare</i>	Svezia	AF411719	Vinnere <i>et al.</i> , 2002
<i>C. acutatum</i> A7				
IMI345581	<i>Fragaria x ananassa</i>	Nuova Zelanda	AJ536212	Martínez-Culebras <i>et al.</i> , 2003
BBA 65797	<i>Syringa vulgaris</i>	Germania	AJ301925	Nirenberg <i>et al.</i> , 2002
<i>C. acutatum</i> A8				
TOM-9	<i>Cyphomandra betacea</i>	Colombia	AF521205	Afanador-Kafuri <i>et al.</i> , 2003
TOM-21	<i>C. betacea</i>	Colombia	AF21196	Afanador-Kafuri <i>et al.</i> , 2003
<i>C. gloeosporioides</i>				
IMI 356878 (ex- epitipo)	<i>Citrus sinsensis</i>	Italia	EU371022	Cannon <i>et al.</i> , 2008
STE-U 4295	<i>Citrus sp.</i>	Italia	AY376532	Lubbe <i>et al.</i> , 2004
<i>C. musae</i>				
CBS 116870 (ex- epitipo)	<i>Musa sp.</i>	Nord America	HQ596292	Su <i>et al.</i> , 2011
B15	<i>Musa sp.</i>	Tailandia	DQ453986	Shenopy <i>et al.</i> , 2007

2.4. Caratterizzazione biologica.

2.4.1. Saggi di patogenicità su drupe di olivo

I saggi di patogenicità sono state eseguiti su due cultivar di olivo con l'obiettivo di comparare la virulenza di differenti isolati di *Colletotrichum acutatum s.l.* e valutare la suscettibilità delle cultivar all'attacco dell'antracnosi in differenti stadi fenologici. Sono stati saggiati 12 isolati di *C. acutatum s.l.*, identificati mediante le analisi filogenetiche poiché rappresentativi dei gruppi *C. acutatum* gruppo A4-A5, *C. simmondsii* e *C. fioriniae*. Come elemento di paragone sono stati utilizzati alcuni isolati appartenenti a *C. gloeosporioides s.l.* (Tab. 5). Le cultivar impiegate nei saggi biologici sono state la *Carolea*, estesamente coltivata in Calabria e in misura minore in altre regioni italiane, e la *Nocellara Etna*, ampiamente coltivata in Sicilia e caratterizzata da maturazione tardiva. Le prove sono state ripetute in tre fasi fenologiche differenti identificate attraverso valutazione visiva in:

- ✓ stadio verde = frutti in fase di pre-invaiatura di colore verde;
- ✓ stadio intermedio = parziale frutto in fase di invaiatura (parzialmente nero);
- ✓ stadio maturo = frutto con pericarpo uniforme nero;

Le prove sono state condotte con frutti sani privi di alterazioni esterne e di infezioni da mosca delle olive. I frutti sono stati lavati con acqua corrente, sterilizzati superficialmente mediante immersione in soluzione di ipoclorito di sodio ($\text{NaClO} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) all'1% per 2 min, sciacquati ripetutamente con abbondante acqua sterile fino alla completa eliminazione dell'agente disinfettante e fatte asciugare all'aria su carta assorbente.

Le olive sono state sistemate in file parallele su supporti rigidi in appositi contenitori di plastica che consentono il mantenimento di elevati livelli di umidità relativa. Su ogni drupa, mantenuta in posizione mediante nastro biadesivo, è stata praticata una ferita con ago sterile ed è stato posto un tassello di micelio (\varnothing 6 mm) prelevato dal margine di colonie al 7° giorno di accrescimento su PDA. I frutti inoculati sono stati mantenuti in camera umida a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ per favorire lo sviluppo della malattia. In tutte le prove, ogni isolato fungino è stato inoculato su 30 olive suddivise in tre ripetizioni posizionate tre differenti contenitori differenti di plastica. Come testimoni

negativi è stato utilizzato un ugual numero di olive inoculate con un tassello di PDA privo di micelio.

Le osservazioni sintomatologiche sono state eseguite con regolarità ogni 3 giorni a partire da 7 giorni dopo l'inoculazione. Le alterazioni superficiali sono state utilizzate per valutare la percentuale di frutti infetti e la gravità della malattia espressa in termini di % di superficie dei frutti infetti interessata da marciume. Per questa rilevazione è stata utilizzata una scala di gravità della malattia con 6 classi di infezione come di seguito riportato (Tab. 6)

Tabella 6. Scala empirica utilizzata per la valutazione della gravità delle infezioni su olive artificialmente inoculate

C	Sintomi rilevati
lasse di	
infezione	
0	Assenza di sintomi
1	1-25% della superficie interessata da marciume
2	26-50% della superficie interessata da marciume
3	51-75% della superficie interessata da marciume
4	76-100% della superficie interessata da marciume
5	100% di superficie con marciume e presenza di sporificazione

In ogni rilievo è stata valutata l'incidenza della malattia (% di frutti infetti) e, utilizzando la precedente scala empirica, la gravità della malattia su ciascuna drupa. I dati rilevati sono stati inoltre combinati in un indice di malattia noto anche come indice di McKinney (McKinney, 1923) che tiene conto sia dell'incidenza della malattia che della sua gravità su ciascuna drupa.

L'indice di McKinney utilizzando la seguente formula:

$$G = \frac{\sum_{i=1}^n (ni \cdot vi)}{N \cdot V} \cdot 100$$

Dove: G = indice di McKinney

ni = numero drupe in ogni classe

vi = classe d'infezione

N = totale delle drupe esaminate

V = valore massimo per la scala, rappresentante la classe d'infezione più alta

n = numero delle classi

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il programma di statistica Spss che ha consentito l'analisi della varianza (ANOVA). Le medie ottenute sono state comparate con l'ausilio del test di "Duncan" (Duncan's multiple range test).

Tabella 5. Isolati impiegati nei saggi di patogenicità.

Codice isolato	Ospite	Origine	Specie
OLPUGLIA	Olivo	Turchia	<i>C. fioriniae</i>
UWS14	Olivo	Australia	<i>C. acutatum</i> A5
UWS147	Olivo	Australia	<i>C. acutatum</i> A5
CBS 193.32	Olivo	Grecia	<i>C. clavatum</i>
Fv168	Olivo	Calabria	<i>C. clavatum</i>
OL10	Olivo	Calabria	<i>C. clavatum</i>
OL20	Olivo	Puglia	<i>C. clavatum</i>
OLF21	Olivo	Puglia	<i>C. clavatum</i>
UM1B	Olivo	Umbria	<i>C. clavatum</i>
1568	Olivo	Evora, Portogallo	<i>C. simmondsii</i>
1567	Olivo	Tavira, Algarve Portogallo	<i>C. simmondsii</i>
UWS 68	Olivo	Australia	<i>C. simmondsii</i>
S1/S2	Olivo	Sicilia	<i>C. gloeosporioides</i> s.s.
UWS 66	Olivo	Australia	<i>C. gloeosporioides</i> s.l.

2.5. Caratterizzazione morfologica

2.5.1. Rilievo morfologico dei conidi

La morfologia dei conidi è stata valutata mediante osservazioni al microscopio ottico Zeiss Axioskop di tutti gli isolati impiegati nei saggi di patogenicità (Tab. 5). La morfologia dei conidi è stata determinata sia nel caso di conidi prelevati colture allevate su substrato artificiale (14 giorni di incubazione su PDA), sia da drupe di olive inoculate artificialmente con ciascun isolato.

Per favorire la sporificazione, gli isolati allevati su PDA sono stati incubati dal 7° al 14° giorno in presenza di alternanza di luce UV e di luce bianca con un fotoperiodo di 12 ore. I conidi sono stati montati su comuni vetrini per microscopia utilizzando Blu di Lattofenolo come colorante di contrasto. Per ciascun isolato sono state eseguite 50 letture con rilievo della lunghezza, della larghezza e della forma delle due estremità dei conidi mediante un oculare ad ingrandimento 100X. La lettura a tale ingrandimento è stata resa possibile previa immersione dell'oculare in olio per microscopia. I dati ottenuti sono stati valutati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) e il test Post hoc di Duncan.

2.6. Caratterizzazione fisiologica

2.6.1. Saggi di sensibilità al *benomyl*

Sono state eseguite prove di crescita su PDA contenente *benomyl* (formulato commerciale BENLATE, p.a. 50%) a differenti concentrazioni al fine di valutare la sensibilità degli isolati al fungicida, in quanto carattere tradizionalmente utilizzato per differenziare *C. acutatum s. l.* da *C. gloeosporioides s. l.*

In tutte le prove è stato utilizzato PDA trattato con concentrazioni crescenti del fungicida in modo da avere concentrazioni finali nel substrato di crescita di 0.1, 1, 10, 10², 10³ µg/ml. Per ogni isolato utilizzato nella prova (Tab.5) è stato prelevato un tassello di micelio (Ø 6 mm) in attiva crescita su substrato PDA ed è stato posizionato al centro di capsule piastre Petri (Ø 90 mm) contenenti substrato ammendato con il fungicida. Per ciascun isolato e per ciascuna concentrazione sono state eseguite tre repliche. Le piastre sono state incubate a 24±2°C al buio ed il diametro delle colonie è stato misurato dopo 6 giorni di incubazione. L'analisi statistica dei dati relativi alla resistenza al *benomyl* è stata condotta utilizzando i software IBM SPSS e Microsoft Excel. Dai dati dei diametri radiali è stato calcolato il valore del diametro medio. Questo valore, per ogni concentrazione, è stato confrontato con il diametro medio della colonia cresciuta su PDA, in assenza di *benomyl*, tramite la formula di **Abbott** (1925):

$$corrected \% = \left(1 - \frac{diametro\ in\ T}{diametro\ in\ C} \right) \cdot 100$$

Dove

T= campione trattato;

C= controllo (crescita su PDA).

I valori dell'elaborazione con la formula di Abbott di ogni isolato sono stati messi in relazione con la concentrazione del *benomyl* ed elaborati tramite ANOVA e test Post-hoc di Duncan. Utilizzando i valori ottenuti con la formula di Abbott e i valori della varie concentrazioni è stata effettuata un'analisi dei Probit, regressione volta ad individuare la concentrazione di principio attivo alla quale si verifica il 50% di riduzione del diametro dello sviluppo della colonia rispetto a quello di riferimento (EC_{50}).

2.7. Risultati e discussioni

2.7.1. Analisi filogenetiche

Nel presente lavoro un elevato numero di isolati di *C. acutatum* s.l. prevalentemente ottenuti da olive sono stati caratterizzati mediante amplificazione e sequenziamento di differenti regioni geniche nucleari e di una regione mitocondriale. Le analisi condotte con i differenti geni hanno fornito risultati concordanti evidenziando gli stessi raggruppamenti filogenetici, sebbene non tutti gli isolati siano stati analizzati con tutti i geni (Tab.1, Fig. 1- 4) Inoltre, i risultati ottenuti sono stati supportati da due differenti metodi di analisi (Maximum likelihood e Bayesian) e da valori di bootstrap generalmente elevati.

L'analisi condotta con la regione ITS1-5.8S-ITS2 ha consentito l'identificazione di otto differenti gruppi filogeneticamente distinti nell'ambito di *C. acutatum* s.l., comprendenti sia isolati responsabili dell'antracnosi dell'olivo sia isolati ottenuti da altri ospiti. I gruppi identificati sono in linea con quelli identificati da Sreenivasaprasad e Talhinhos (2005) e Shivas e Tan (2009). L'analisi delle regioni ITS, infatti, oltre a fornire informazioni utili sulle relazioni filogenetiche tra gli isolati utilizzati nel presente studio, è stata particolarmente importante per confrontare i risultati delle nostre analisi con quanto disponibile in letteratura, in considerazione del fatto che questa regione è largamente la più utilizzata per la caratterizzazione filogenetica dei funghi fitopatogeni, ivi compreso il complesso *C. acutatum* s.l. Quanto detto è stato possibile utilizzando una serie di sequenze di riferimento provenienti da isolati "tipo" (Tab. 4) che sono state analizzate insieme a quelle ottenute nel corso della nostra sperimentazione. Come mostrato in figura 1, la quasi totalità degli isolati ottenuti da olivo sono confluiti

nel gruppo di *C. acutatum sensu stricto* (gruppo A5), in *C. simmondsii* e in *C. acutatum* gruppo A4. Un solo isolato ottenuto da oleastro in Turchia (OLPUGLIA) è risultato appartenere a *C. fioriniae*. In *C. acutatum* s. s. sono confluiti esclusivamente isolati provenienti dall'Australia, mentre *C. simmondsii* comprendeva isolati da olivo provenienti sia dall'Australia che dal Portogallo. Quest'ultima specie è apparsa filogeneticamente meno uniforme in tutte le analisi condotte, con due sottogruppi nettamente distinti comprendenti isolati australiani e portoghesi il primo, solo isolati australiani il secondo. Tutti gli isolati italiani sono invece confluiti nel gruppo *C. acutatum* A4 precedentemente definito da Sreenivasaprasad e Talhinhos (2005). Questo gruppo è risultato estremamente omogeneo, essendo gli isolati accomunati da una sequenza ITS-5.8S-ITS2 identica. Il gruppo, oltre a isolati da olivo ottenuti in diverse regioni italiane, comprendeva anche due isolati da olivo ottenuti in Grecia (CBS193.32) e in Montenegro (CGMUL) e due isolati italiani da azalea (AZJ) e uno da mela (MELA).

Risultati perfettamente concordanti con quelli basati sull'analisi delle regioni ITS sono stati ottenuti mediante analisi della regione 1 (esone1-6) della β -*tubulina* 2 (Fig 2). Infatti, sebbene in questo caso non siano stati inclusi nelle analisi sequenze provenienti da isolati di riferimento, la comparazione degli alberi filogenetici evidenziano una sostanziale uniformità nei gruppi identificati. La scelta di non inserire sequenze di riferimento nelle analisi è stata suggerita dalla non uniformità nelle regioni della β -*tubulina* 2 disponibili per gli isolati di riferimento. In particolare, alcune sequenze comprendevano una porzione del gene più limitata rispetto a quella analizzata nel presente lavoro rendendo l'analisi filogenetica complicata. Sebbene i dati basati su ITS e β -*tubulina* 2 siano concordanti, questo secondo gene ha consentito una più dettagliata differenziazione nell'ambito di ciascun gruppo poiché caratterizzato da un più elevato livello di polimorfismo, soprattutto a livello degli introni. Si ricorda che la regione genica caratterizzata è particolarmente ricca di introni (Glass e Donaldson, 1995). Un aspetto che appare di rilevante importanza è la possibilità di differenziare il gruppo A4 di *C. acutatum*, cui afferiscono tutti gli isolati Italiani in due sottogruppi (Fig. 2). Uno di questi sottogruppi comprende la maggior parte degli isolati Calabresi, ma anche isolati da Umbria, Sardegna, Montenegro e Grecia oltre ad un isolato da azalea (AZJ), ottenuto in Piemonte ed uno da mela (MELA), ottenuto in Sicilia. Il

secondo gruppo è costituito quasi esclusivamente da isolati Pugliesi (13 isolati) e da due soli isolati Calabresi. Appare interessante evidenziare che nessun isolato Pugliese è rientrato nel primo gruppo. Questi risultati suggeriscono una più elevata uniformità nell'ambito della popolazione pugliese e pertanto è ipotizzabile che il patogeno sia stato introdotto in questa regione in epoche più recenti rispetto alla Calabria. Sebbene i limitati dati suggeriscano prudenza, appare interessante evidenziare che, anche con la regione 2 (esone 5-7) della β -*tubulina 2* analizzata, l'unico isolato Pugliese esaminato (OL20) si è differenziato con significativi livelli di bootstrap dagli altri 4 isolati del gruppo A4 di *C. acutatum* di differente provenienza (Fig. 3 B).

I raggruppamenti filogenetici evidenziati con questa seconda regione della β -*tubulina 2* confermano i dati ottenuti con gli altri geni, sebbene il numero degli isolati analizzati sia stato molto limitato e non comprendeva nessun *C. fioriniae*. È da evidenziare che in questo caso la regione analizzata comprendeva quasi esclusivamente regioni esoniche (circa 750 bp) e due piccoli introni di lunghezza totale di circa 150 bp. Uno di questi introni, compreso tra esone 6 e 7, è apparso particolarmente variabile ed è stato utilizzato nel corso della sperimentazione per disegnare una sonda TaqMan con annessi *primer* per lo sviluppo di un metodo di diagnosi molecolare specifico del gruppo A4 di *C. acutatum*. Le analisi sin ora condotte, sebbene siano ancora in una fase preliminare, sembrano confermare elevati livelli di sensibilità e perfetta specificità del metodo.

Risultati concordanti con quanto descritto in precedenza, sono stati anche ottenuti mediante la caratterizzazione di una regione intronica di circa 200 bp del gene della *gliceraldeide-3 fosfato deidrogenasi* (Fig 3 A). Questa regione è considerata particolarmente variabile ed ha dimostrato un elevato livello di risoluzione a livello inter- e intraspecifico in numerose specie appartenenti al genere *Colletotrichum* (Guerber *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Nel presente lavoro è stato possibile differenziare l'isolato AZJ, ottenuto da azalea, dagli altri isolati ottenuti quasi esclusivamente da olivo dello stesso gruppo (*C. acutatum* A4).

Nel presente lavoro, oltre al DNA nucleare, si è deciso di indagare il DNA mitocondriale poiché è noto che questo acido nucleico è caratterizzato da elevati tassi di mutazione che determinano elevati livelli di polimorfismo, soprattutto a livello delle regioni intergeniche, utili per la caratterizzazione intraspecifica di agenti fitopatogeni

(Mammella et al., 2011). Inoltre, essendo il mtDNA ereditato uniparentalmente può potenzialmente rilevare correlazioni filogenetiche differenti rispetto al genoma nucleare (Russell, 2004). Per l'analisi del mtDNA sono state disegnate 10 coppie di *primer* degenerati, ma solo cinque di esse hanno permesso l'amplificazione di un frammento delle dimensioni attese utilizzando DNA estratto da 19 diverse specie fungine, rappresentative dei maggiori gruppi nell'ambito del *phylum* Ascomycota (Schoch et al., 2009). Solo la coppia di *primer* MtC5F-MtC6R ha prodotto sequenze di elevata qualità. È stato ipotizzato che le altre regioni geniche siano polimorfiche nell'ambito di uno stesso isolato, impedendo l'ottenimento di sequenze univoche. Il clonaggio di alcune di queste regioni ed il sequenziamento di un numero rappresentativo di cloni potrebbe confermare questa ipotesi.

I risultati delle analisi filogenetiche basati su una porzione del gene *rns* del DNA mitocondriale, amplificata con i *primer* Mt C5F-Mt6R, sono stati differenti ma non in contrasto con quelli delle analisi nucleari. Purtroppo, la porzione di gene caratterizzata non conteneva nessuna regione intergenica ed è risultata molto conservata nell'ambito di *C. acutatum sensu lato*. La sequenza è, infatti, identica in tutti gli isolati dei gruppi A5 (*C. acutatum s.s.*), A4, A2 (*C. fiorinae*) e in una parte degli isolati del gruppo A3 (*C. simondsii*), che si sono differenziati da pochi altri isolati per poche basi azotate (Fig. 4). Questa regione mitocondriale appare, pertanto, non idonea per la caratterizzazione di individui filogeneticamente molto vicini, ma poiché può essere agevolmente amplificata e sequenziata da tutti gli *Ascomycota*, potrebbe essere utilizzata per lo studio di gruppi di organismi lontani fra loro.

Nel complesso, tutte le analisi filogenetiche condotte hanno supportato il gruppo A4 di *C. acutatum* come entità nettamente differente da tutti gli altri *C. acutatum s.l.*, confermando l'ipotesi già formulata da altri studiosi Italiani che esso costituisca una nuova specie nell'ambito del complesso *C. acutatum s.l.* (Agosteo et al, 2002; Cacciola et al., 2007). Questi studiosi, infatti, avevano più volte evidenziato che le popolazioni di *Colletotrichum* responsabili dell' antracnosi in Italia avevano caratteristiche morfologiche più simili a *C. acutatum*, ma erano chiaramente distinguibili dagli isolati portoghesi e spagnoli. Nel presente studio è stato inoltre evidenziato che con tutti i geni nucleari analizzati, la distanza genetica tra il gruppo A4 e gli altri gruppi del complesso *C. acutatum s.l.* risulta essere maggiore e quasi sempre supportata da elevati livelli di

bootstrap con due differenti metodi di analisi (*Maximum likelihood* e *Bayesian*). Ad esempio, appare evidente che la distanza genetica tra le due nuove specie, *C. fiorinae* e *C. simmondsii*, recentemente classificate (ex gruppi A2-A3 di *C. acutatum s.l.*) e tra esse e gli altri gruppi di *C. acutatum s.l.* è inferiore rispetto a quella di *C. acutatum* A4.

Questi risultati, supportati dalle analisi morfologiche e biologiche, di cui si parlerà a breve e con l'integrazione di altri studi condotti presso l'Università di Catania, hanno permesso di elevare il gruppo A4 a nuova specie nell'ambito di *C. acutatum sensu lato*, identificata come *C. clavatum* G.E. Agosteo, R. Faedda & S.O. Cacciola, sp. nov. (Faedda *et al.*, 2011). Questa specie è cosmopolita, interessa un ampio spettro di ospiti ed è l'agente causale della antracnosi largamente prevalente in Italia anche se, come riportato in precedenza, è stata probabilmente introdotta in nelle nostre regioni in due differenti fasi. Inoltre, questa specie è stata associata all'antracnosi dell'olivo in Grecia, Andalusia, e Montenegro (Cacciola *et al.*, 2012).

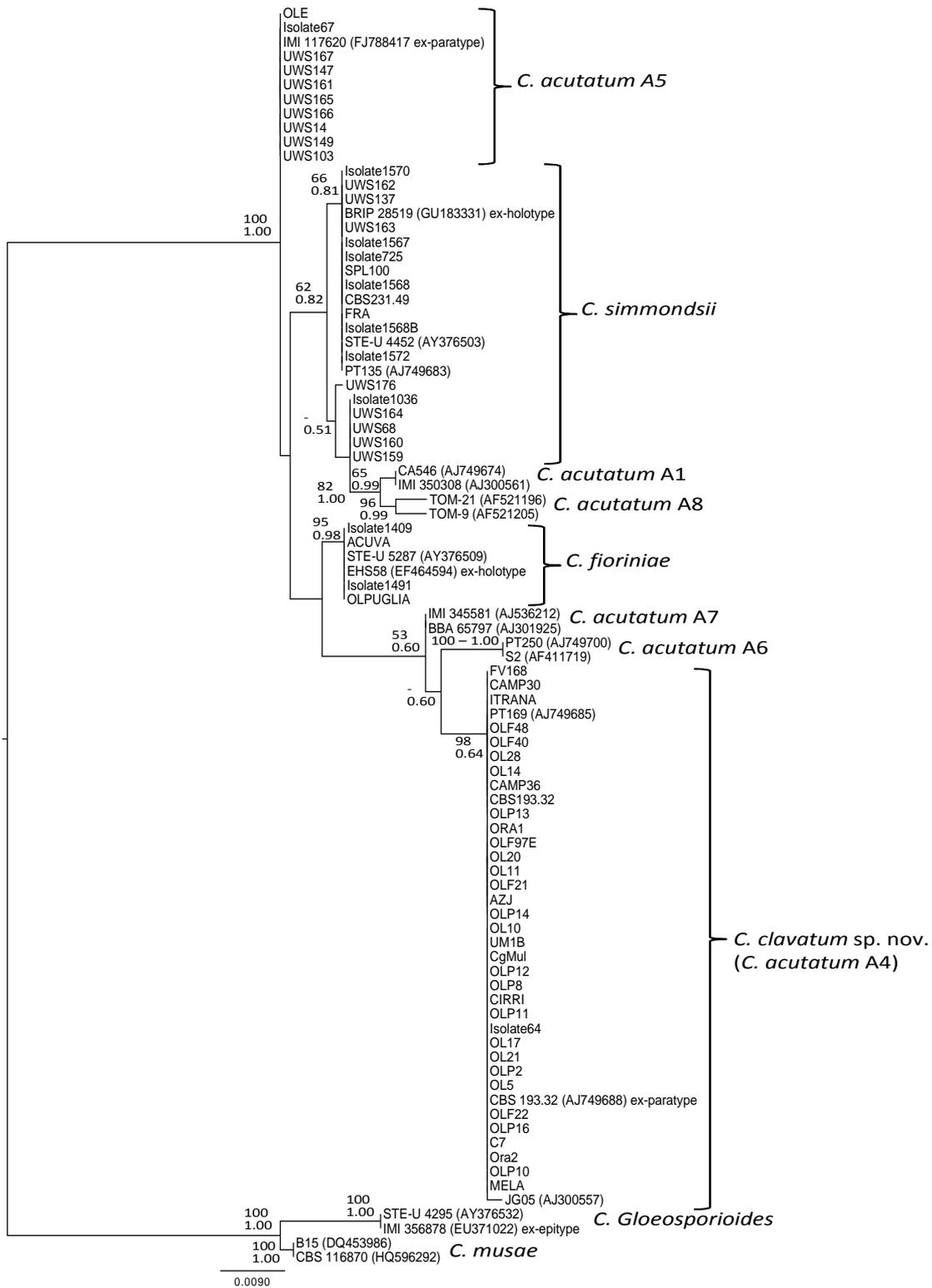


Fig 1. Albero filogenetico costruito utilizzando la regione ITS1-5.8S-ITS2 del DNA ribosomiale di isolati rappresentativi di *Colletotrichum acutatum* s.l. L'albero comprende anche sequenze di isolati di riferimento disponibili in letteratura. Due isolati di *C. gloeosporioides* e due di *C. musae* sono stati utilizzati come "outgroups". L'albero mostrato in figura è stato costruito con il metodo *Maximum likelihood* (PhyML) e i numeri a livello dei nodi rappresentano i valori di "bootstrap" con questo metodo (numero superiore) e con il metodo "*Bayesian*" (MrByes) (numero inferiore).

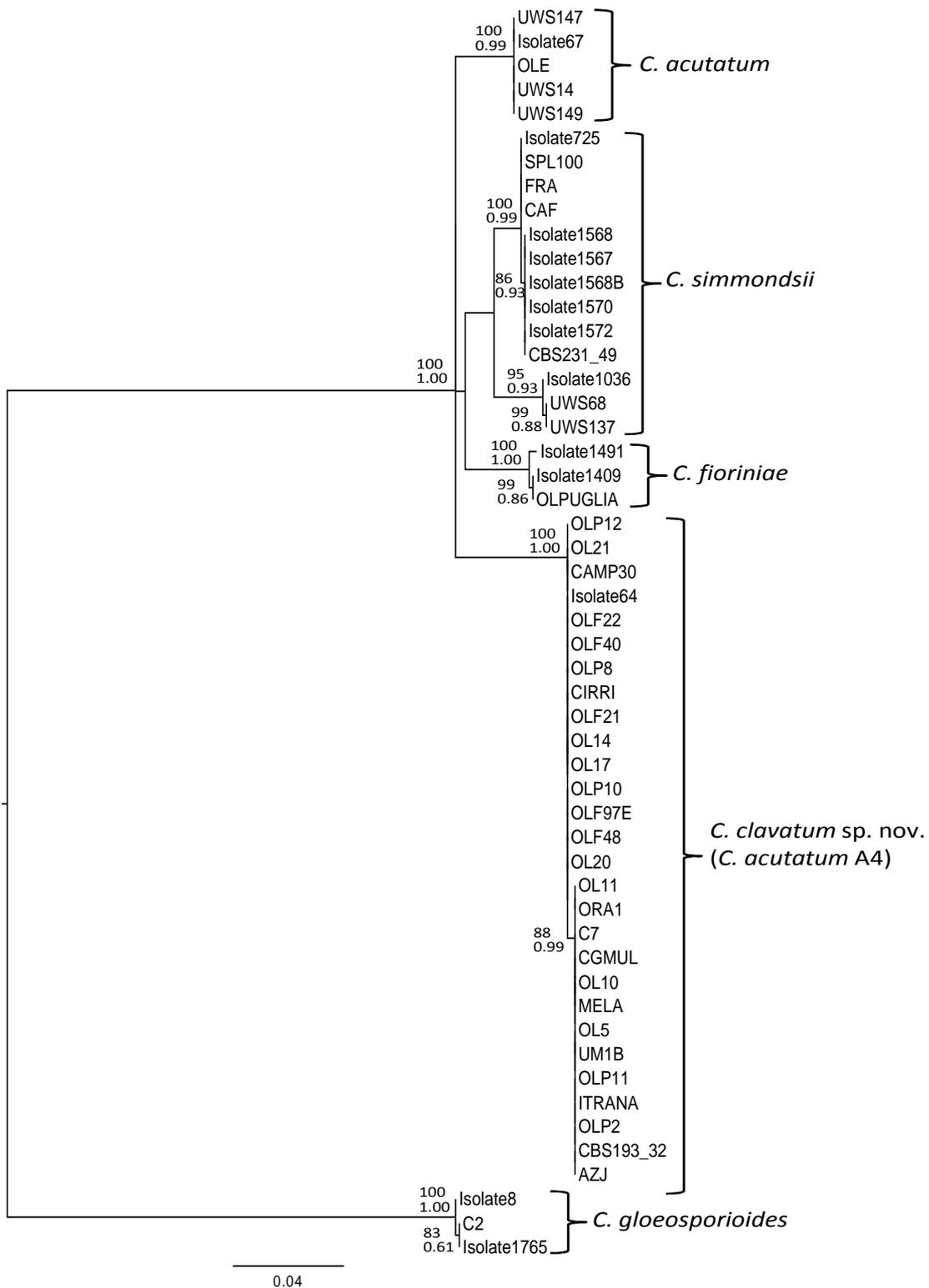


Fig. 2. Albero filogenetico costruito utilizzando una porzione del gene della β -tubulina2 compresa tra esone 1 e 6, denominata regione 1 nel presente lavoro, di isolati rappresentativi di *Colletotrichum acutatum* s.l. Tre isolati di *C. gloeosporioides* sono stati utilizzati come "outgroups". L'albero mostrato in figura è stato costruito con il metodo *Maximum likelihood* (PhyML) e i numeri a livello dei nodi rappresentano i valori di "bootstrap" con questo metodo (numero superiore) e con il metodo "*Bayesian*" (MrByes) (numero inferiore).

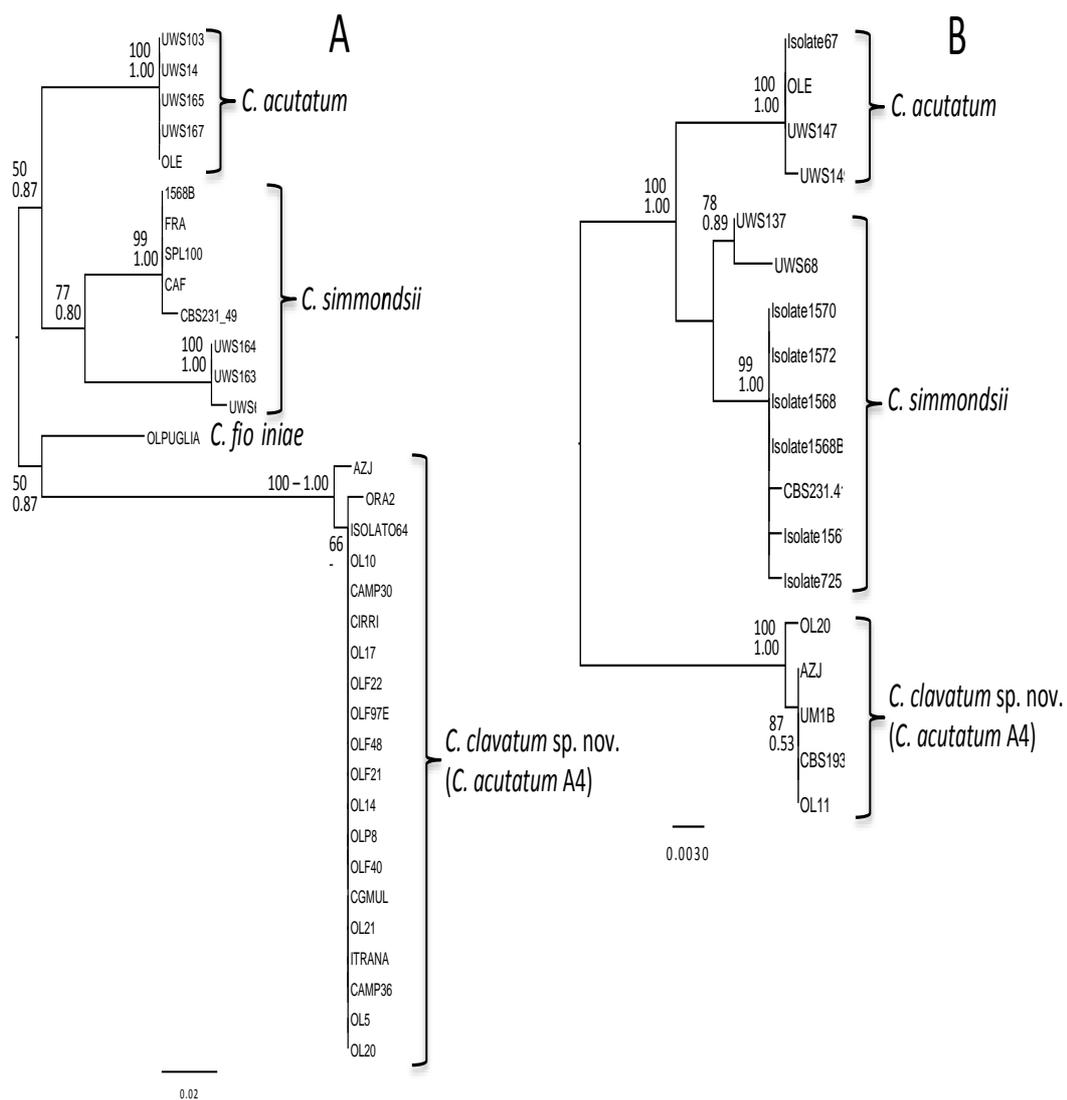


Fig. 3 A-B. Alberi filogenetici costruiti utilizzando una regione intronica di circa 200 bp del gene della gliceraldeide-3 fosfato deidrogenasi (A) e una porzione del gene della β -tubulina2 compresa tra esone 5 e 7, denominata regione 2 nel presente lavoro (B). Entrambi gli alberi mostrati in figura sono stati costruiti con il metodo *Maximum likelihood* (PhyML) e i numeri a livello dei nodi rappresentano i valori di “bootstrap” con questo metodo (numero superiore) e con il metodo “*Bayesian*” (MrByes) (numero inferiore).

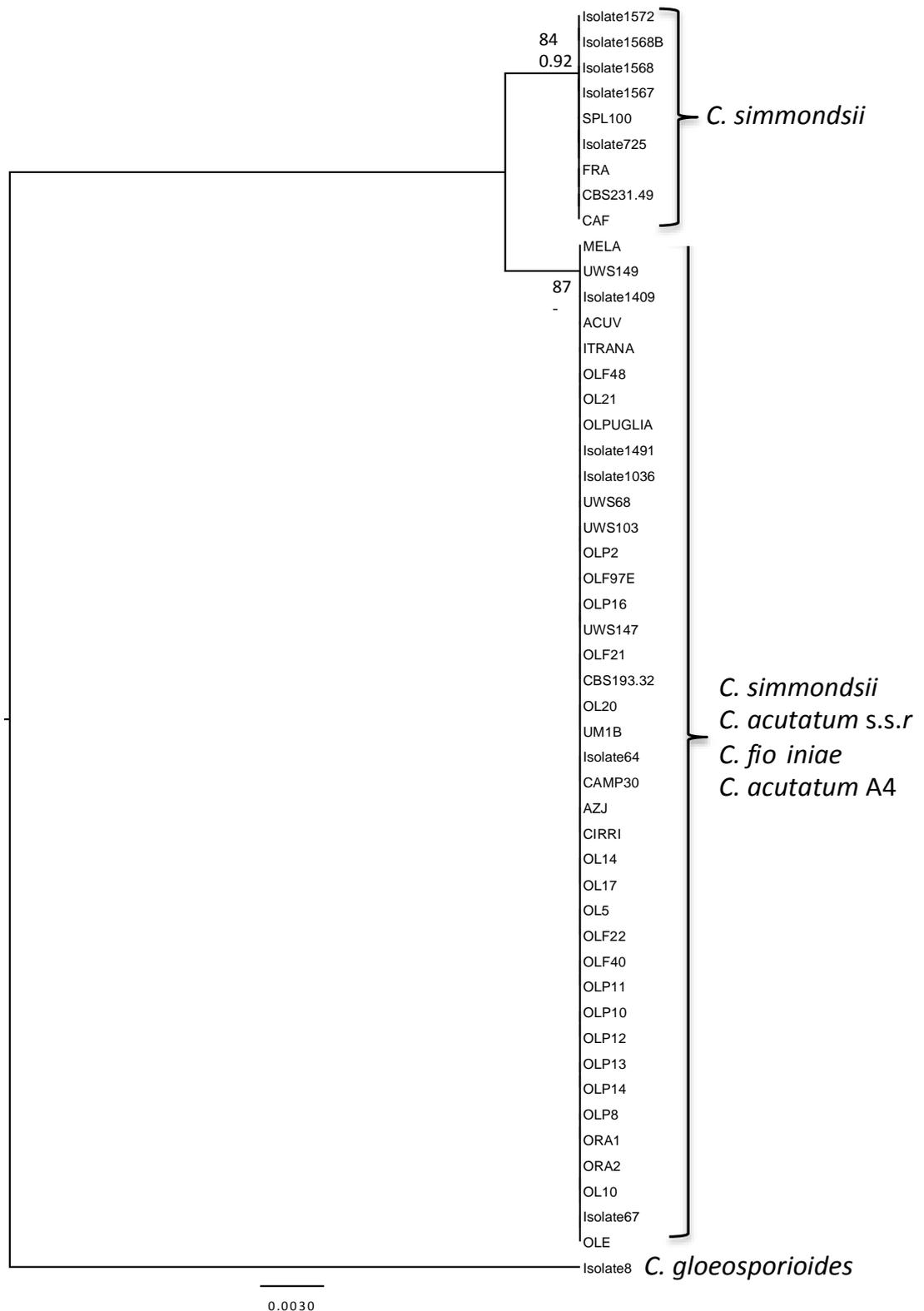


Fig. 4. Albero filogenetico costruito utilizzando una porzione del gene *rns* del DNA mitocondriale di isolati di *Colletotrichum acutatum* s.l. Un isolato di *C. gloeosporioides* (8) è stato utilizzato come “outgroups”. L’albero mostrato in figura è stato costruito con il metodo *Maximum likelihood* (PhyML) e i numeri a livello dei nodi rappresentano i valori di “bootstrap” con questo metodo (numero superiore) e con il metodo “*Bayesian*” (MrByes) (numero inferiore).

2.7.2. Caratterizzazione biologica

2.7.2.1. Saggio di patogenicità su drupe

Nell'olive della cv *Carolea* allo stadio verde gli isolati appartenenti a *C. acutatum* A5 sono risultati più virulenti rispetto agli altri già a partire dal terzo rilievo (R3), seguiti da *C. simmondsii*, tranne l'isolato 1568, e dagli isolati di *C. gloeosporioides s. s.* (S1/S2) e *C. gloeosporioides s. l.* (UWS66). Gli isolati appartenenti a *C. clavatum* sono apparsi meno virulenti su olive verdi, sebbene uno di essi (FV168), di recente isolamento, è risultato tra i più virulenti in assoluto. Molto meno virulento è invece risultato l'unico isolato di *C. fioriniae* (OLPUGLIA) analizzato (Fig. 5).

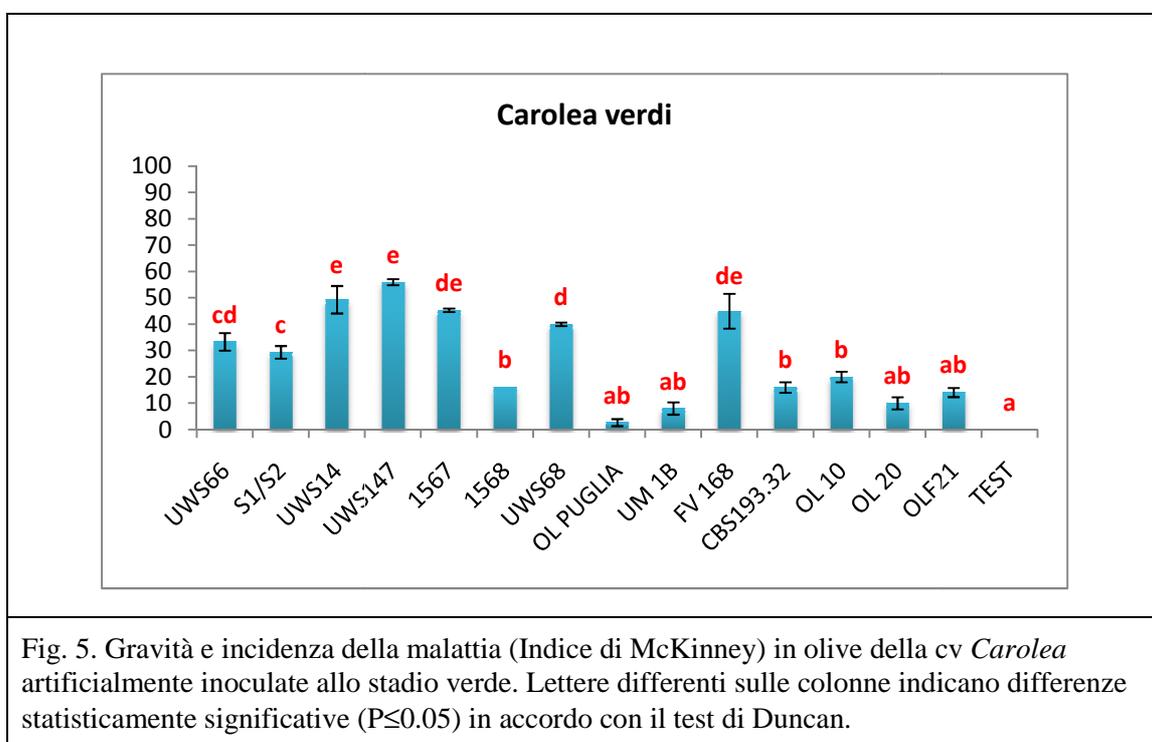


Fig. 5. Gravità e incidenza della malattia (Indice di McKinney) in olive della cv *Carolea* artificialmente inoculate allo stadio verde. Lettere differenti sulle colonne indicano differenze statisticamente significative ($P \leq 0.05$) in accordo con il test di Duncan.

Allo stadio di parziale pigmentazione del pericarpo è stato osservato un incremento generalizzato della manifestazione dei sintomi rispetto allo stadio verde, dovuta alla maggiore suscettibilità delle olive in questo stadio fenologico (Fig. 6). La maggiore suscettibilità delle olive alla malattia ha generalmente attenuato le differenze tra i diversi isolati, sebbene gli isolati OL10 ed in particolare OL20 di *C. clavatum* siano risultati meno virulenti di tutti gli altri.

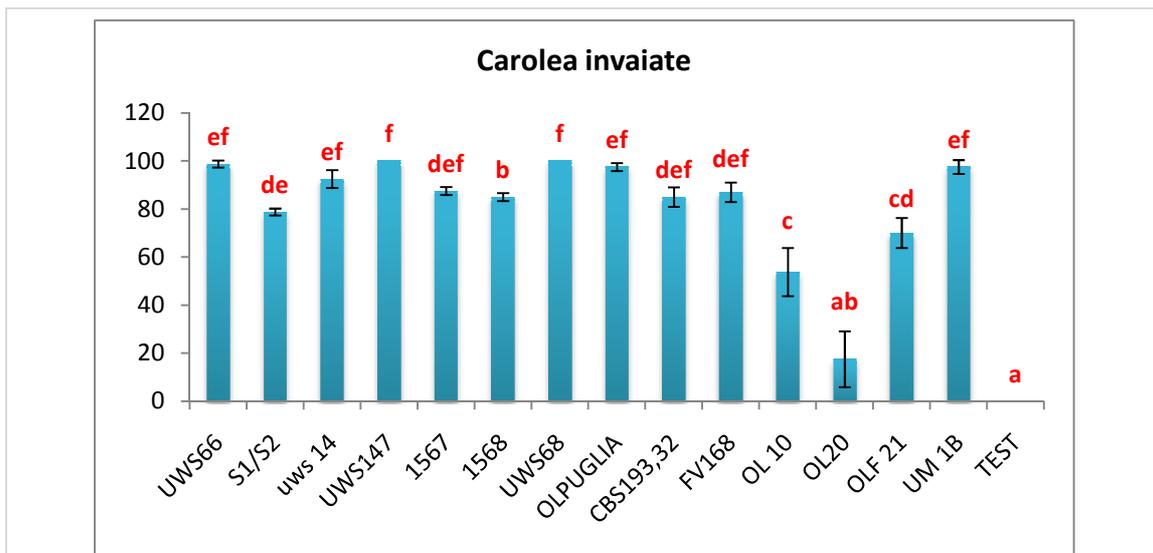


Fig. 6. Gravità e incidenza della malattia (Indice di McKinney) in olive della cv *Carolea* artificialmente inoculate allo stadio invaiato. Lettere differenti sulle colonne indicano differenze statisticamente significative ($P \leq 0.05$) in accordo con il test di Duncan.

Allo stadio di maturazione completa delle drupe della cultivar *Carolea* l'isolato UM1B di *C. clavatum* è risultato il più virulento, seguito dall'isolato UWS68 di *C. simmondsii* (Fig. 7). Gli altri isolati hanno avuto un comportamento simile ad eccezione dell'isolato di *C. fioriniae* (OLPUGLIA) che è stato meno virulento.

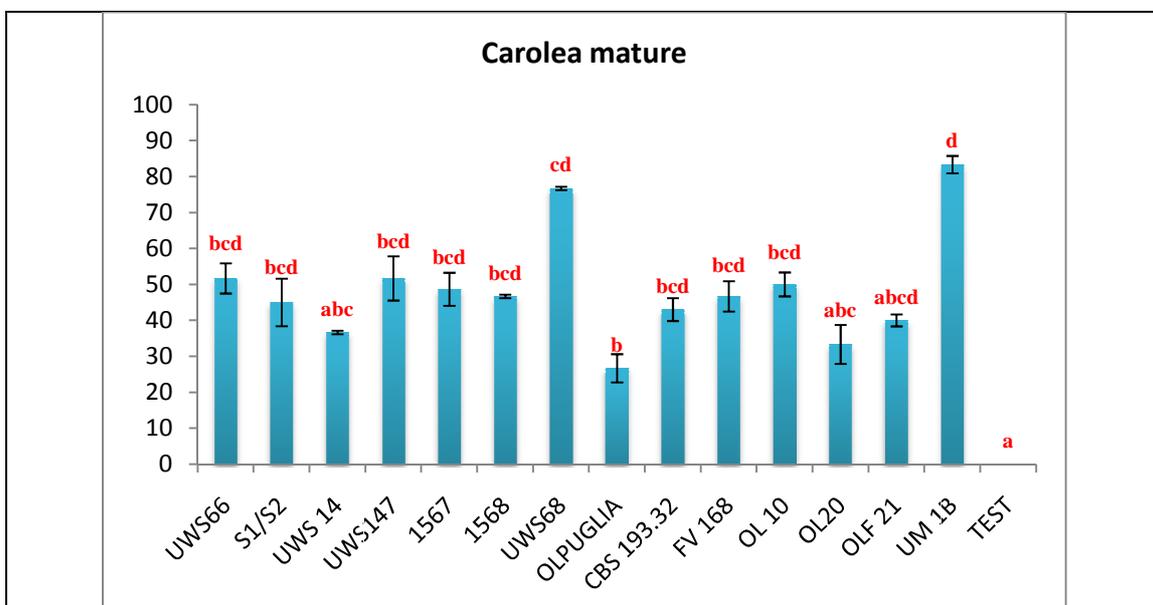
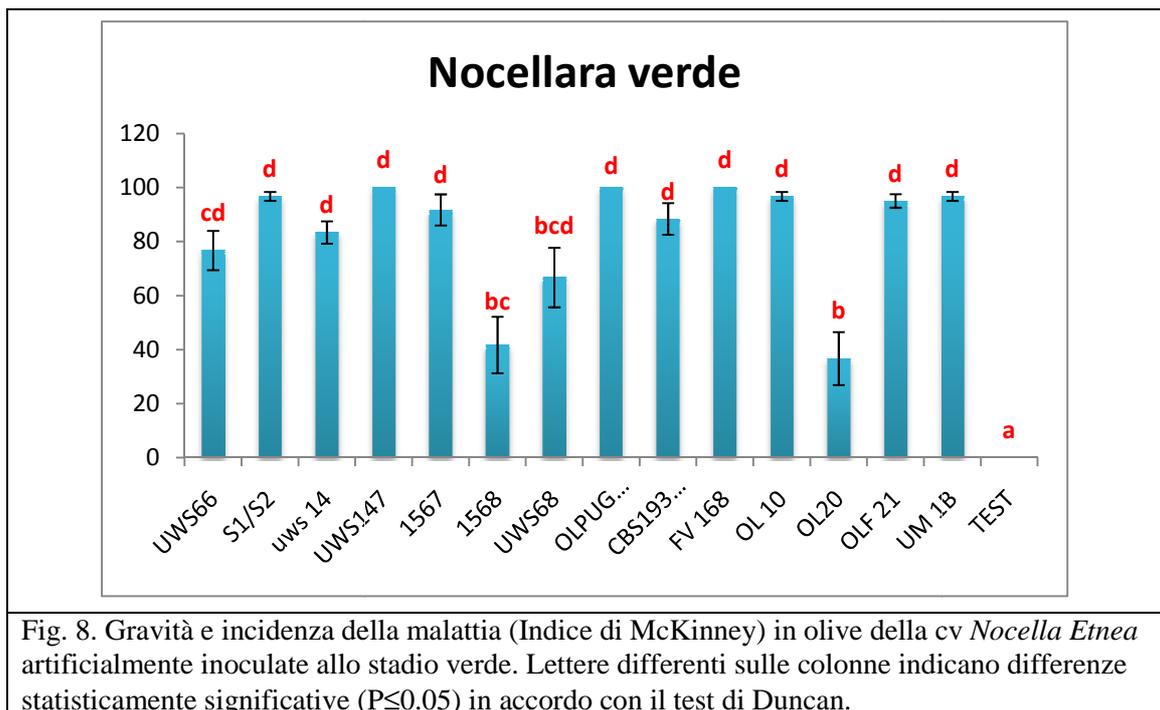


Fig. 7. Gravità e incidenza della malattia (Indice di McKinney) in olive della cv *Carolea* artificialmente inoculate allo stadio maturo. Lettere differenti sulle colonne indicano differenze statisticamente significative ($P \leq 0.05$) in accordo con il test di Duncan.

I saggi di patogenicità condotti con olive della cv *Nocellara Etnea* hanno complessivamente evidenziato una maggiore suscettibilità di questa cv rispetto alla cv *Carolea* in uno stadio uguale di maturazione. Su *Nocellara Etnea*, tutti gli isolati hanno infatti manifestato elevati livelli di patogenicità già a partire dallo stadio di drupe verdi. Solo due isolati (OL20 di *C. clavatum* e 1568 di *C. simmondsii*) sono risultati significativamente meno virulenti (Fig. 8).



Nello stadio di maturazione intermedia della cultivar *Nocellara Etnea* lo sviluppo della malattia è stato molto rapido e l'elevata suscettibilità dei frutti ha determinato un generale appiattimento non evidenziando alcuna differenza significativa tra gli isolati con un indice di McKinney pari a 100 o poco meno praticamente per tutti isolati (dati non mostrati).

Allo stadio fenologico di maturazione completa della cultivar *Nocellara Etnea*, come in precedenza per la cv *Carolea*, è stata registrata una lieve diminuzione del livello di virulenza degli isolati, espresso come indice di McKinney, a parità di giorni di incubazione. Anche in questo caso, tuttavia, la gravità e l'incidenza della malattia sono

apparse molto elevate per quasi tutti gli isolati ad eccezione dell'isolato OLPUGLIA di *C. fioriniae*, risultato il meno virulento (Fig. 9).

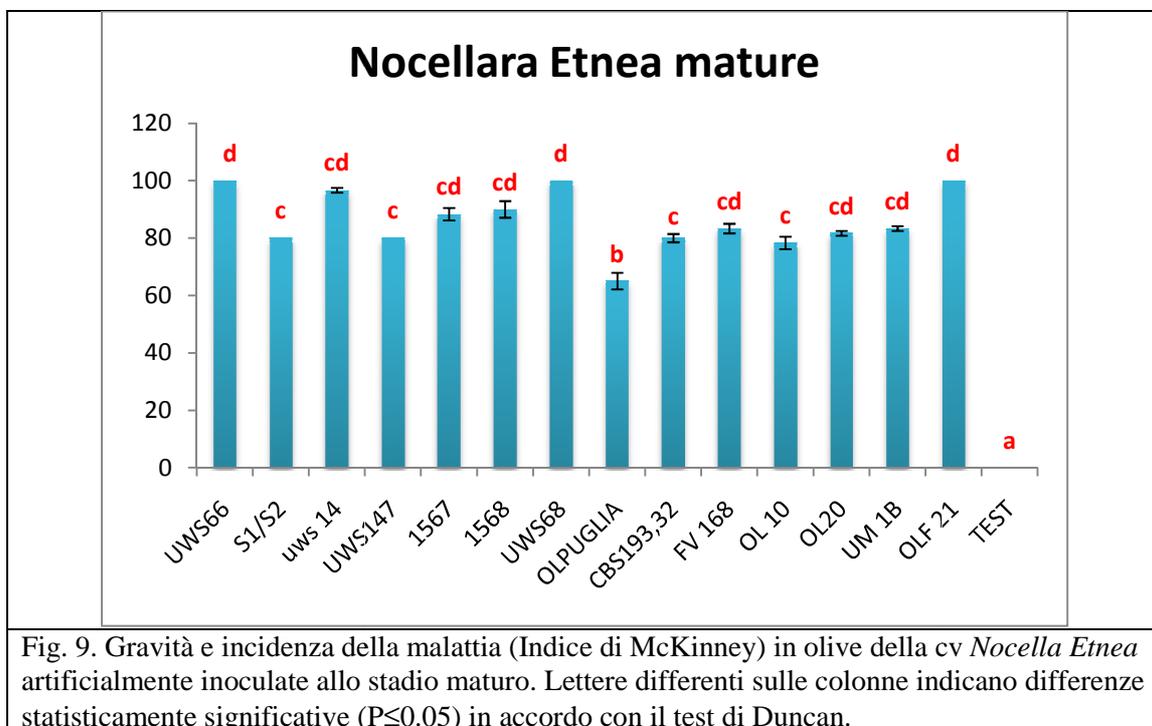


Fig. 9. Gravità e incidenza della malattia (Indice di McKinney) in olive della cv *Nocella Etnea* artificialmente inoculate allo stadio maturo. Lettere differenti sulle colonne indicano differenze statisticamente significative ($P \leq 0.05$) in accordo con il test di Duncan.

Nel complesso, i risultati ottenuti nelle prove di patogenicità su olive della cv *Carolea* e *Nocellara Etnea* indicano che tutti gli isolati saggati sono in grado di determinare lo sviluppo della malattia, determinando i tipici sintomi dell'antracnosi, sebbene la sintomatologia vari leggermente in funzione degli isolati. Ad eccezione di *C. fioriniae*, risultato quasi sempre significativamente meno virulento degli altri, i dati ottenuti non sembrano indicare una prevalente virulenza fra i vari gruppi filogenetici di *C. acutatum* s.l.. Sembrerebbe piuttosto che, nell'ambito di ciascun gruppo, ci sia una certa variabilità biologica con singoli isolati/ceppi dotati di differenti livelli di virulenza. In questo, un ruolo non trascurabile potrebbe avere avuto il prolungato mantenimento in coltura di alcuni isolati, che, com'è noto, può determinare un fenomeno di attenuazione della patogenicità. Questo potrebbe essere il caso di *C. clavatum* in cui l'isolato FV168, di recente ottenimento, è costantemente risultato più virulento degli altri isolati mantenuti in coltura da almeno un ventennio.

È noto come la comparazione del livello di suscettibilità all'antracnosi in diverse cultivar non sia semplice, in quanto la variabile livello di maturazione può fortemente

influenzare i risultati (Cacciola et al., 2012). Questo ha spesso determinato confusione come ad es. nel caso della cv *Frantoio* considerata resistente in Italia, ma risultata molto suscettibile in Argentina (Moral et al., 2008). Ciò nonostante, le differenze di sensibilità all'antracnosi riscontrate nelle due cv saggiate nel presente lavoro, sono apparse molto evidenti, in quanto di notevole entità, nelle tre diverse fasi fenologiche di maturazione e dopo un uguale numero di giorni di incubazione (21.gg). Sulla base di osservazioni in campo la cv *Carolea* è stata in passato considerata mediamente suscettibile, mentre non sembrano essere disponibili informazioni in merito alla cv *Nocellara Etnea* (Martelli, 1959; Pennisi et al., 1993; Agosteo, 2010).

Indipendentemente dalla sensibilità varietale, entrambe le cv saggiate sono risultate molto più sensibili passando dalla fase di oliva verde a quella di oliva invaiata. Questo risultato era largamente atteso poiché è ampiamente riportato in letteratura che la suscettibilità delle drupe all'antracnosi aumenta con il procedere del processo di maturazione, anche se le cultivar suscettibili possono manifestare sintomi sui frutti anche allo stadio fenologico verde (Moral et al., 2007; Moral et al., 2009, Moral e Trapero, 2009). In generale, la maggiore sensibilità dei frutti maturi potrebbe essere correlata con la perdita di uno o più fattori di resistenza presenti nei frutti giovani (Jeffries et al., 1990; Roca et al., 2007). Sebbene questi meccanismi di resistenza non siano stati studiati nell'antracnosi dell'olivo, è stato suggerito che il livello più elevato di composti fenolici nelle olive immature potrebbe essere il principale fattore che determina una loro maggiore resistenza nei confronti di numerose avversità (Ryan et al., 1998; Moral et al. 2008; Moral et al., 2009). Meno attesa è stata invece la lieve riduzione di suscettibilità riscontrata nelle olive di entrambe le cv in fase di maturazione completa rispetto allo stadio invaiato. Non è semplice spiegare questo risultato, tuttavia si potrebbe ipotizzare che la presenza di un maggiore quantitativo di lipidi in olive molto mature possa costituire una barriera per l'adesione iniziale dei conidi, fase indispensabile per l'avvio del processo infettivo (Gomes et al., 2009). Vale la pena ricordare, tuttavia, che nel presente lavoro le olive sono state inoculate mediante tassello di agar su olive ferite e che il metodo di inoculazione può fortemente influenzare i risultati dell'infezione (Moral et al., 2008). Sarebbe pertanto opportuno valutare il comportamento delle olive molto mature, ferite e non ferite, all'inoculazione mediata da conidi. La valutazione della sensibilità nelle varie fasi fenologiche è un aspetto di non

secondaria importanza considerato che in alcune delle più importanti aree olivicole italiane caratterizzate da piante secolari di grosse dimensioni le olive vengono prevalentemente raccolte in una fase di maturazione molto avanzata poiché si aspetta che le stesse cadano naturalmente dalle piante.

2.7.3 . Caratterizzazione morfologica

2.7.3.1. Rilievo morfologico dei conidi

L'analisi della varianza (ANOVA) e il test di Duncan hanno evidenziato differenze statisticamente significative nella morfologia dei conidi degli isolati valutati (Tab. 5). Questo risultato è stato confermato nel caso della lunghezza ($F=61.544$; g.d.l.=4; $p<0.05$) e della larghezza ($F= 52.65$; g.d.l.=4; $p<0.05$) dei conidi prodotti su PDA, ma anche per lunghezza ($F=6,684$; g.d.l.=5; $p<0.05$) e larghezza ($F=3,710$; g.d.l.=5; $p<0.05$) dei conidi prodotti sulle drupe (Fig.10-15). L'analisi di entrambe le variabili, lunghezza e larghezza conidica, ha assunto particolare rilievo per i conidi ottenuti su substrato PDA, poiché è stato possibile differenziare significativamente fra loro l'isolato UWS66 di *C. gloeosporioides s. l.*, *C. clavatum*, *C. acutatum s.s.* e *C. simmondsii* (Fig. 10, 11) In queste misurazioni non sono state inclusi gli isolati OLPUGLIA (*C. fioriniae*) e S1/S2 (*C. gloeosporioides s.s.*) poiché è stato difficile ottenere conidi in coltura artificiale. Sulla base della larghezza, *C. clavatum* e *C. simmondsii* hanno assunto gli stessi valori, mentre *C. acutatum* A5 e *Colletotrichum sp.* sono risultati statisticamente differenti (Fig. 11). I conidi di *C. clavatum* sono risultati di $12,2\pm 2,8$ μm (lunghezza) per $3,2\pm 0,7$ μm (larghezza) con un rapporto tra le due misure di $3,9\pm 1,3$ (Tab. 7) La forma prevalente assunta dalle estremità dei conidi è risultata clavata (C) in accordo con quanto riportato recentemente da Faedda *et al.* (2011) (Fig. 12).

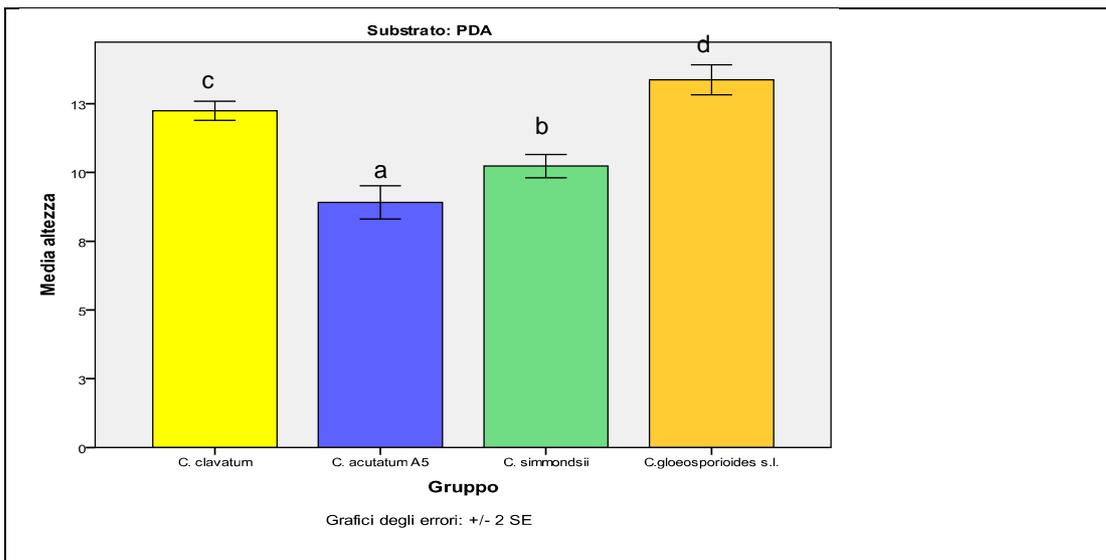


Fig 10 Lunghezza dei conidi su substrato PDA

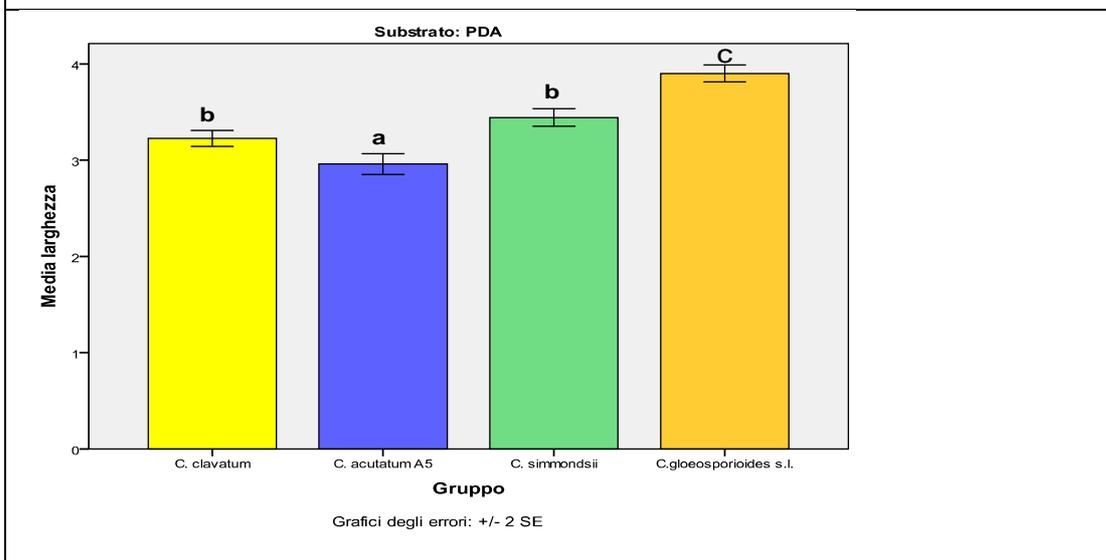


Fig.11. Larghezza dei conidi su substrato PDA

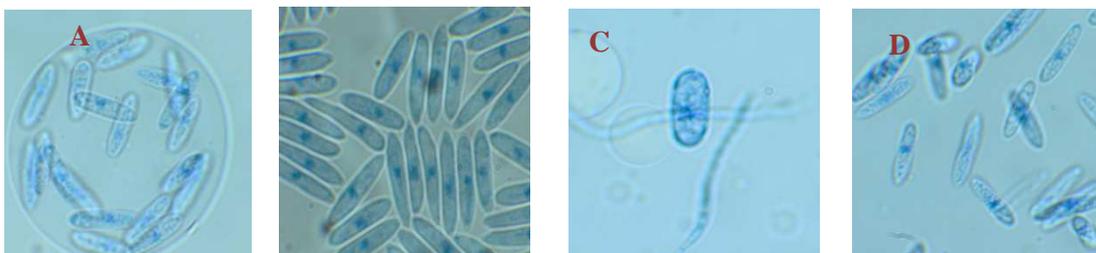


Fig. 12. Morfologia dei conidi da PDA. A- *Colletotrichum simmondsii*; B- *C. acutatum* s.s.; C- *C. gloeosporioides* s.l. (UWS66); D- *C. clavatum*

Tab. 7- Rilievo delle dimensioni dei conidi prelevati dal substrato PDA

Gruppo	Altezza lunghezza	Larghezza media	rapporto A/L	Forma prevalente
<i>C. clavatum</i>	12,2±2,8	3,2±0,7	3,9±1,3	C
<i>C. acutatum</i> A5	8,9±3	3±0,5	3,1±1,3	F
<i>C. simmondsii</i>	10,2±2,6	3,4±0,6	3±0,7	C
<i>C. gloeosporioides</i> s.l	13,4±1,9	3,9±0,3	3,5±0,6	R

I conidi ottenuti da drupe artificialmente inoculate hanno mostrato differenze molto più attenuate tra loro e solo in alcuni sono risultati di dimensioni differenti con significatività statistica (Fig. 13, 14). In queste osservazioni è stato possibile inserire anche *C. fioriniae* (OLPUGLIA) e *C. gloeosporioides* (S1/S2) poiché su olive sono stati facilmente ottenuti i conidi.

Ad es. i conidi di *C. clavatum* hanno mostrato un'altezza media di 11,3±3 µm, una larghezza media di 3,8±0,5 µm e un rapporto tra le due dimensioni di 3±0,7 µm con forma prevalente delle estremità arrotondata (R) (Tab. 8). Questi dati sono significativamente differenti se comparati con le misurazioni di conidi ottenuti su PDA con quanto riportato in letteratura (Faedda *et al.*, 2011).

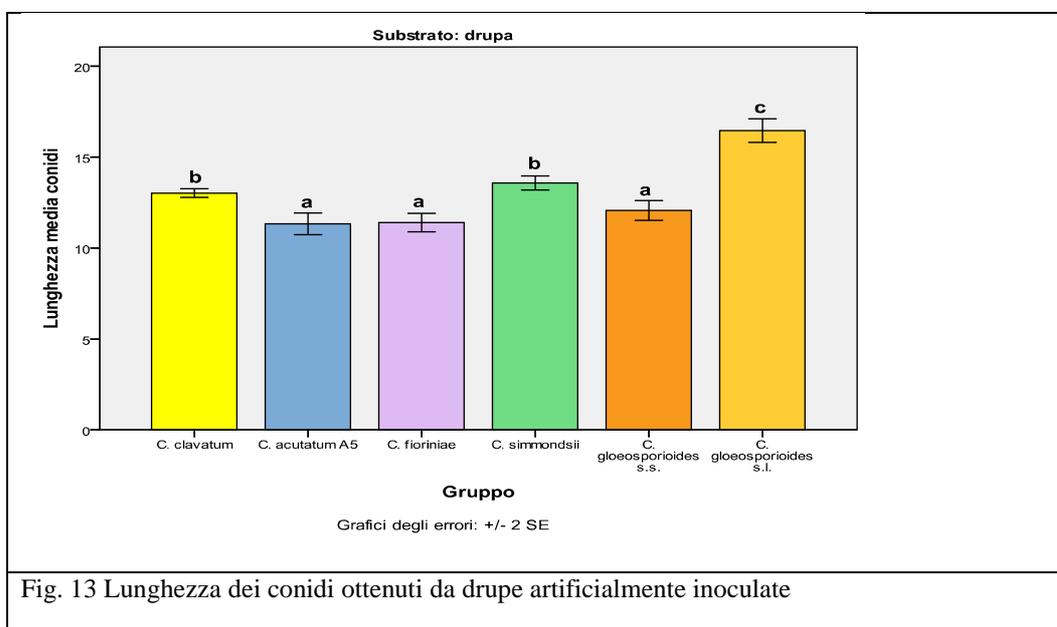
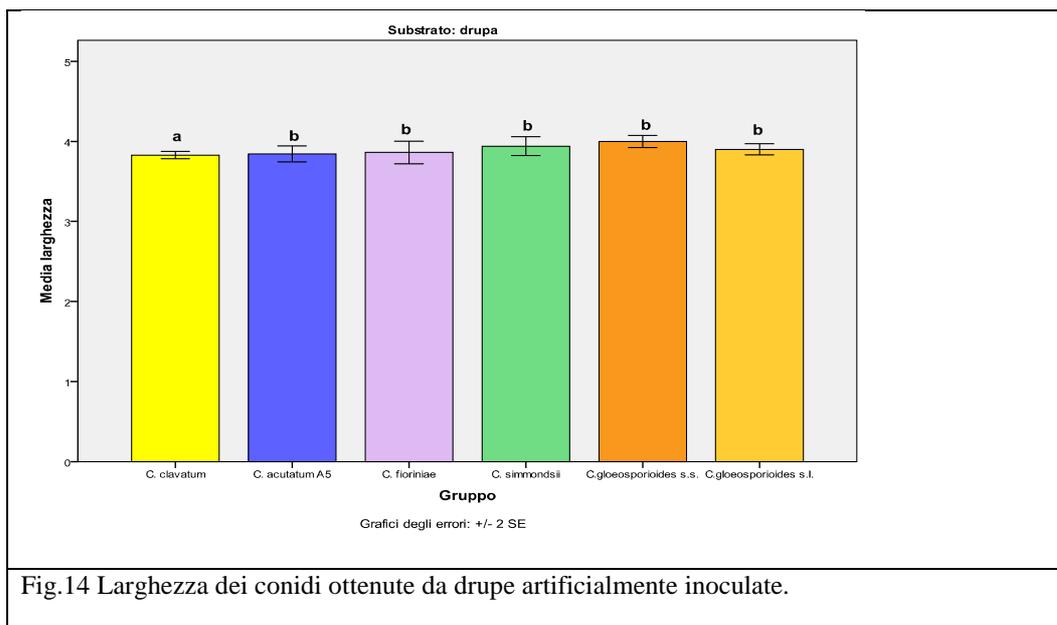


Fig. 13 Lunghezza dei conidi ottenuti da drupe artificialmente inoculate



Tab. 8-Rilievo delle dimensioni dei conidi prelevati dal substrato Drupa

Gruppo	Altezza media	Larghezza media	rapporto a/l	Forma prevalente
<i>C. clavatum</i>	13±2	3,8±0,4	3,4±0,7	R
<i>C. acutatum A5</i>	11,3±3	3,8±0,5	3±0,7	R
<i>C. fioriniae</i>	11,5±1,8	3,9±0,5	3±0,5	R
<i>C. simmondsii</i>	13,6±2,3	3,9±0,7	3,6±1,5	R
<i>C.gloeosporioides s.s.</i>	12,1±1,9	4±0,3	3±0,5	R
<i>C.gloeosporioides s.l.</i>	16,1±2,3	3,9±0,2	4,2±0,7	R

I risultati della caratterizzazione morfologica dei conidi ottenuti nel presente lavoro sembrano essere una testimonianza tangibile di come questi caratteri siano assolutamente inaffidabili per l'identificazione di specie fungine nel complesso genere *Colletotrichum*. È noto che la morfologia delle strutture fungine può essere condizionata dai fattori ambientali (principalmente temperatura) e dal substrato colturale, ma in questo caso la variabilità riscontrata appare ancora più grave in quanto concerne caratteri considerati chiave per la definizione delle specie nell'ambito di del genere *Colletotrichum* (forma e dimensione dei conidi). Quanto detto viene ulteriormente aggravato dal fatto che spesso in letteratura non sono disponibili protocolli standardizzati per la coltivazione delle colture fungine da utilizzare per misurazioni micrometriche. Ad esempio, Baxter *et al.* (1993) ha descritto le specie basandosi sulla crescita su substrato MSA (mannitol salt agar) e CDY (Czapek Dox Yeast Extract) alla

temperatura di 20°C, mentre Sutton (1980) ha usato PDA sotto l'alternanza di raggi UV e ore di buio a 20°C, mentre ancora altri autori hanno utilizzato per la crescita PDA e sottoposte le colonie solo ad ore di buio (Cai *et al.*, 2009). Inoltre, è riportato in letteratura che conidi montati per la lettura su acqua o Blu di lattofenolo, producono conidi secondari che differiscono per forma e dimensione, aumentando la difficoltà nel riconoscimento della specie (Cannon *et al.*, 2000).

Per comparare misurazioni ottenute in differenti laboratori ed in diversi momenti storici, diventa pertanto indispensabile l'utilizzo di protocolli perfettamente standardizzati, in cui un numero quanto più elevato possibile di parametri dovrebbe essere tenuto sotto controllo (Cai *et al.*, 2009). Ad es. i risultati ottenuti con coltura allevata substrato PDA nel presente lavoro hanno evidenziato differenze significative tra i gruppi di *C. acutatum s. l.* e sono risultati concordanti con quanto riportato da Faedda *et al.* (2011), poiché le misurazioni sono state effettuate su colture allevate in condizioni molto simili. È tuttavia intuitivo che una perfetta uniformità nei parametri (substrato colturale, umidità, temperatura, intensità luminosa, etc.) è estremamente difficile da ottenere e pertanto resterà sempre una zona d'ombra nella valutazione dei dati delle misurazioni microscopiche. Appare evidente che queste tecniche pur essendo ancora oggi molto importanti, non possono in nessun modo prescindere da altri tipi di analisi ed in particolare di tipo molecolare. Diventa semplice comprendere il perché, solo in anni recenti grazie all'utilizzo di sofisticati approcci molecolari sia stato possibile iniziare a far chiarezza nella tassonomia del genere *Colletotrichum* (Cfr. capitolo I della presente tesi).

2.7.4. Saggi di sensibilità al *benomyl*

I risultati ottenuti evidenziano differenze statisticamente significative di sensibilità al fungicida *benomyl* fra i vari raggruppamenti ($F_{2,25}=12.81$, d.f.=3, $p<0,01$). In accordo con quanto riportato in letteratura, l'isolato S1/S2 di *C. gloeosporioides s. s.* è risultato molto sensibile al *benomyl* con una EC_{50} di 0,08 ppm (Tab. 9). Secondo in ordine di sensibilità sono risultati gli isolati di *C. clavatum* che mediamente hanno mostrato una medesima inibizione della crescita a 0,628 ppm. (Fig.15)

Tabella 9. Valori di EC₅₀ nei differenti gruppi

Gruppo	EC ₅₀
<i>C. acutatum</i> A5 s.s.	22,778 ppm
<i>C. clavatum</i>	0,628 ppm
<i>C. fiorinaie</i>	11,441 ppm
<i>C. gloeosporioides</i> s.l. (UWS66)	12,279 ppm
<i>C. gloeosporioides</i> s. s. (S1/S2)	0,08 ppm
<i>C. simmondsii</i>	16,133 ppm

Gli isolati appartenenti al gruppo *C. acutatum* s. s. (A5) hanno mostrato il più elevato livello di tolleranza al fungicida con valori superiori rispetto a quanto riportato in letteratura (Peres *et al.*, 2004). Livelli leggermente inferiori di tolleranza al *benomyl* sono stati riscontrati nell'ordine per *C. simmondsii*, *Colletotrichum* sp. (UWS66) e *C. fiorinaie*. Sebbene non siano disponibili informazioni sul comportamento *C. fiorinaie* e *C. simmondsii* in presenza di *benomyl*, i dati ottenuti non sorprendono considerando che queste specie sono state separate recentemente dal complesso *C. acutatum* s. l. . Più sorprendente e meritevole di ulteriori approfondimenti appare la bassa tolleranza di *C. clavatum*, in considerazione del fatto che la sensibilità al *benomyl* veniva tradizionalmente utilizzata per differenziare isolati di *C. acutatum* s.l. (resistenti) da altri isolati (suscettibili) che si riteneva appartenessero a *C. gloeosporioides*.

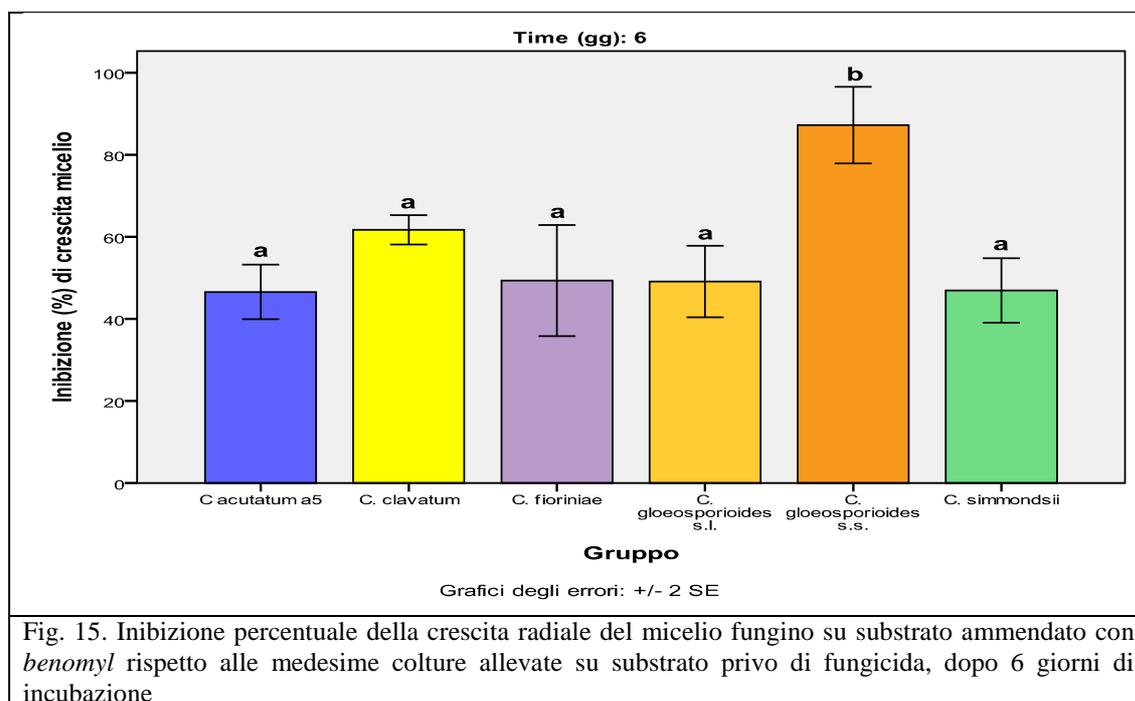


Fig. 15. Inibizione percentuale della crescita radiale del micelio fungino su substrato ammendato con *benomyl* rispetto alle medesime colture allevate su substrato privo di fungicida, dopo 6 giorni di incubazione

I dati del presente studio evidenziano l'inadeguatezza di questo approccio in considerazione dell'elevata variabilità riscontrata nell'ambito di *C. acutatum s.l.* e del fatto che l'isolato UWS66, pur non essendo un *C. acutatum s.l.* è dotato di un analogo livello di tolleranza al fungicida. Questo isolato, rientra in un gruppo estremamente eterogeneo per cui non è stato possibile stabilire con precisione l'identità a livello di specie (Cfr. Capitolo III, par. 4). Inoltre, la comparsa di fenomeni di resistenza nell'ambito del complesso di specie che costituiscono *C. gloeosporioides* e *C. acutatum sensu lato* ha contribuiscono a rendere questo metodo sempre meno attendibile (Adaskaveg e Hartin, 1997; Peres *et al.*, 2004; Valero *et al.*, 2010).

2.8 Conclusioni

L'antracnosi dell'olivo (*O. europaea*) rappresenta una delle più gravi patologie fungine dell'olivo a causa delle ingenti perdite di produzione e qualità degli oli ottenuti dai frutti colpiti (Talhinhas *et al.*, 2005; Moral e Trapero, 2009, Cacciola *et al.*, 2011). L'uso combinato di tradizionali criteri di riconoscimento tassonomici con le analisi filogenetiche, in particolar modo lo studio delle regioni ITS e del gene della β *tubulina*, ha evidenziato nell'ambito di *C. acutatum* una notevole eterogeneità, tale da essere considerato un complesso di specie. La scoperta di questa diversità ha portato all'avvio di un processo di profonda revisione nella classificazione di questa specie cosmopolita (Lardner *et al.*, 1999, Sreenivasaprasad e Talhinhas, 2005, Liu *et al.*, 2007, Hyde *et al.*, 2009). e, attualmente, l'analisi multi-genica rappresenta l'approccio più affidabile per gli studi filogenetici all'interno di questo complesso *taxa*

L'analisi delle regioni ITS, di frammenti del gene β -*tubulina2*, dei geni GS e GDPH, hanno permesso di identificare nell'ambito di *C. acutatum s. l.* nove differenti gruppi (A1-A9), due dei quali recentemente elevati a specie indipendenti (Sreenivasaprasad e Talhinhas, 2005; Whitelaw-Weckert *et al.*, 2007; Shivas and Tan, 2009). In questo studio, è stato impiegato un approccio polifasico per fare chiarezza all'interno del gruppo *C. acutatum* gruppo A4, identificato in precedenza da Sreenivasaprasad e Talhinhas (2005). Questo gruppo, patogeno su diverse specie di piante, è stato dimostrato essere il principale agente responsabile di epidemie di antracnosi dell'olivo in Italia, Grecia, Andalusia (sud della Spagna) (Cacciola *et al.*, 2007; Talhinhas *et al.*, 2009, Faedda *et al.*, 2011, Cacciola *et al.*, 2011).

Nel complesso, tutte le analisi filogenetiche condotte hanno supportato il gruppo A4 di *C. acutatum* come entità nettamente differente da tutti gli altri *C. acutatum s.l.*, confermando l'ipotesi già formulata da altri studiosi Italiani che esso costituisca una nuova specie nell'ambito del complesso *C. acutatum s.l.* (Agosteo *et al.*, 2000; Cacciola *et al.*, 2007). La maggiore distanza genetica tra il gruppo A4 e gli altri gruppi del complesso *C. acutatum s.l.*, supportata da elevati livelli di bootstrap con due differenti metodi di analisi, insieme ai risultati ottenuti attraverso le analisi morfologiche e biologiche, con l'integrazione di altri studi condotti in collaborazione presso l'Università di Catania, hanno permesso di elevare il gruppo A4 a nuova specie nell'ambito di *C. acutatum s. l.*, identificata come *C. clavatum* sp. nov. (Faedda *et al.*,

2011). L'utilizzo integrato di differenti approcci di identificazione tassonomica potranno significativamente contribuire a migliorare la comprensione della complessità nell'ambito di *C. acutatum* s. l., permettendo di poter sviluppare corretti sistemi di diagnosi e di controllo di questi importanti patogeni vegetale, sebbene molti altri aspetti restano ancora da chiarire.

Bibliografia

Adaskaveg, J.E., Hartin, R.J., 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* **87**, 979–987.

Afanador-Kafuri L., D. Minz, M. Maymon and S. Freeman, 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* **93**, 579–587.

Agosteo G.E., 2010. Avversità dell'olivo ed evoluzione dei relativi sistemi di difesa in Calabria fra XVIII e XX se-colo. *Petria* 20, suppl. 1, 41–70.

Agosteo, G.E., Magnano di San Lio, G., Cacciola, S.O., Frisullo, S 2002. Characterisation of the causal agent of olive anthracnose in southern Italy. *Acta Horticulturae* 586, 713–716.

Baxter, A.P., von der Westhuizen, G.C.V., Eicher, A. 1983. Morphology and taxonomy of South African isolations of *Colletotrichum*. *South African Journal of Botany* **2**: 259-289.

BLAST Basic Local Alignment Search Tool. (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Brown, A. E., Sreenivasaprasad, S., Timmer, L.W., 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* **86**:523-527.

Bryson, R.J, Caten, C.e., Hollomon, D.W., Bailey, J.A. , 1992. In: Bailey J.A, Jeger M.J. (eds). *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control, pp. 1-26. CAB International, Wallingford, UK

Cacciola S.O., Agosteo G.E., Faedda R., Frisullo S., Magnano di San Lio G., 2007, Characterization of *Colletotrichum* species causing olive anthracnose in Italy. *IOBC/WPRS Bulletin* **30**: 229.

Cacciola S.O., Agosteo G.E., Pane A., Magnano di San Lio G., 1996. Osservazioni sull'epidemiologia dell'antracnosi dell'olivo in Calabria. *Informatore Fitopatologico* **46 (6)**: 27-32.

Cacciola, S.O., Faedda, R., Agosteo G.E., 2011. Anthracnose. Olive Diseases and Disorders, ISBN: 978-81-7895-539-1

Cacciola, S.O., Faedda, R., Sinatra, F., Agosteo G.E., Schena, L. Frisullo, Magnano di San Lio, G., 2012. Olive anthracnose. Invited review. *Journal of Plant Pathology*

Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B., Waller J, Abang, M.M., Zhang, J.Z., Yang, Y.L., Phoulivong, S., Liu, Z.Y., Prihastuti, H., Shivas, R.G., McKenzie, E.H.C., Johnston, P.R., 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers* **39**:183–204

Cannon, P.F., Bridge, P.D. Monte, E. 2000. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host Pathogen Interaction* (eds. D. Prusky, S. Freeman and M.B. Dickman). APS Press, St. Paul, Minnesota, USA: 1-20. 483–495.

Ciccarone A., 1950. Considerazioni biologiche e sistematiche sull'agente della "lebbra" delle olive, recentemente osservata nel Leccese. *Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale di Roma*, S. III, **5**: 143-165.

Duarte H.S.S., Cabral P.G.C., Pereira O.L., Zambolim L, Gonçalves E.D., Vieira Neto J., Zambolim E.M., Sergeeva V., 2010. First report of anthracnose and fruit mummification of olive fruit (*Olea europaea*) caused by *Colletotrichum acutatum* in Brazil. *New Disease Reports* **20**: 37.

Faedda R., Agosteo G.E., Schena L., Mosca S., Frisullo S., Magnano di San Lio G., Cacciola S.O., 2011. *Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the causal agent of olive anthracnose in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* **50**: 283-302.

Förster H. and J.E. Adaskaveg, 1999. Identification of sub-populations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. *Phytopathology* **89**, 1056–1065.

Freeman S., Katan T., Shabi E., 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* **82**:596-605.

Glass, N.L. , 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**, 1323–1330.

Gomes, S., Pietro., P., Martins-Lopes, P., Carvalho, T., Martin, A., Guedes-Pinto., E., 2009. Development of *Colletotrichum acutatum* on Tolerant and Susceptible *Olea europaea* L. cultivars: A Microscopic Analysis. *Mycopathologia* **168**:203–211

González, E., Sutton, T.B. Correll, J.C. (2006). Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. *Phytopathology* **96**: 982-992.

Graniti A., Frisullo S., Pennisi A.M., Magnano di San Lio G., 1993. Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **23**: 457-465.

Guerber J.C., Correll J.C., 2001. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia* **93**: 216-229.

Guerber J.C., Liu B., Correll J.C., Johnston P.R., 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* **95**:872-895.

<http://barcoding.si.edu/DNABarcoding.htm>

Hyde K.D., Cai L., Cannon P.F., Crouch J.A., Crous P.W., Damm U., Goodwin P.H., Chen H., Johnston P.R., Jones E.B.G., Liu Z.Y., McKenzie E.H.C., Moriwaki J., Noireung P., Pennycook S.R., Pfenning L.H., Prihastuti H., Sato T., Shivas R.G., Taylor P.W.J., Tan Y.P., Weir B.S., Yang Y.L., Zhang J.Z. 2009^a . *Colletotrichum* names in current use. *Fungal Diversity* **39**: 147-183.

Hyde K.D., Cai L., McKenzie E.H.C., Yang Y.L., Zhang J.Z., Prihastuti H. 2009 b. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* **39**: 1-17.

Johnston, P. R., Jones, D. 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* **89**:420-430.

Lardner R., Johnston P.R., Plummer K.M., Pearson M.N., 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum sensu lato*. *Mycological Research* **103**: 275-285.

Liu, B., Wasilwa, L.A., Morelock, T.E., O'Neill, N.R. and Correll, J.C. 2007. Comparison of *Colletotrichum orbiculare* and several allied *Colletotrichum* spp. for mtDNA RFLPs, intron RFLP and sequence variation, vegetative compatibility and host specificity. *Phytopathology*, **97**: 1305-1314.

Lubbe, C.M, Denman, S., Cannon, P.F., Groenewald, J.Z., Lamprecht, S.C., Crous, P. W., 2004. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of *Proteaceae*. *Mycologia*, **96**(6), pp. 1268–1279.

Martelli G.P., 1960. Primo contributo alla conoscenza della biologia di *Gloeosporium olivarum* Alm. *Phytopathologia Mediterranea* **1**: 31–43.

Martelli, G.P. 1959, La lebbra delle olive. Presenza e diffusione in Calabria, Italia Agricola, **96**, 905-914.

Martín M.P., García-Figueres F., 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 733-741.

Martín, M.P., García-Figueres F., Trapero A. 2002. Inicadores específicos para detectar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de los olivos. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **28**: 43-50.

Martinez-Culebras, P.V., A.A., Querol, M.B., Suarez Fernandez, M.D., Garcia-Lopez E. Barrio, 2003. Phylogenetic relationship among *Colletotrichum* pathogens of strawberry and design of PCR *primers* for their identification. *Journal of Phytopathology* **151**, 135–143.

Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D., Freeman, S., 2006. Identification and Characterization of Benomyl-Resistant and Sensitive Populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from Statice (*Limonium* spp.) *The American Phytopathological Society*. 10.1094 / PHYTO-96-0542

McKinney, H. H., 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection on wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, **26**(5): 195–217.

Milne I, Lindner D, Bayer M, Husmeier D, McGuire G, Marshall DF, Wright F, 2008. TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics*, 25:126-127

Moral J, Trapero A., 2009a. Assessing the susceptibility of olive cultivars to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* **93**: 1028-1036.

Moral J., Bouhmidi K., Trapero A., 2008. Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* **92**: 1421-1426.

Moral J., de Oliveira R., Trapero A., 2009b. Elucidation of disease cycle of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* **99**: 548-556.

Moral, J., Ávila, A., López-Doncel, L.M., Alsalimiya, M., Oliveira, R., Gutiérrez, F., Navarro, N., Bouhmidi, K., Benali, A., Roca, L.F., Trapero, A. 2005. Resistencia a los repilos de distintas variedades de olivo. *Vida Rural* **208**: 34-40.

Moral, J., Oliveira, R., Tello, J.C., Trapero, A., 2007 Caracterización fisiológica y patogénica de cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. Causantes de la antracnosis del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*.

Moriwaki, J., Sato, T., Tsukiboshi, T., 2003. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience*. **44**:47–53.

Multalin: Multiple Alignment Source:
http://npsa.pbil.ibcp.fr/NPSA/npsa_multalinan.html

Oliveira R., Moral J., Bouhmidi K., Trapero A., 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **31**: 531-548.

Pennisi, A.M., Agosteo, G.E., Grasso, S. 1993, Chemical control of the olive rot caused by *Glomerella cingulata*, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 23, 467-472.

Peres N.A., Timmer L.W., Adaskaveg J.E., Correll J.C., 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* **89**: 784-796.

Peres, N.A.R., Souza, N.L., Peever, T.L., Timmer, L.W., 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Dis.* **88**: 125–130.

Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., Hyde, K.D., 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. *Fungal Divers* **39**:89–109

Prusky D., McEvoy J.L., Leverentz B., Conway W.S. 2001. Host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Molecular Plant Microbe Interactions* **14**: 1105-1113.

Rhouma A., Triki M.A., Msallem M., 2010. First report of olive anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea* **49**: 95-98.

Roca, L.F., Moral, J., Viruega, J.R., Ávila, A., Oliveira R., Trapero, A. 2007, Copper fungicides in the control of olive diseases, *Olea*, 26, 48-50.

Russel, P. J., 2006. iGenetica. Edises. ISBN 88-7959-284.

Scarito, G., Pane, A., Raudino, F., Frisullo, S., Cacciola, S.O. 2003, *Colletotrichum gloeosporioides* causal agent of olive rot in Sicily, *J. Plant Pathol.*, **84**, 310.

Schena L., Cooke, D.E.L, 2006. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a “molecular tool box” for the detection and characterization of *Phytophthora* species. *Journal of Microbiological Methods* **67**, 70–85.

Schoch C. L., Gi-Ho Sung, Pez-Gir Ldez F. L, Townsend J. P., Miadlikowska J, Hofstetter V. R., Robbertse B., Matheny P. B, Kauff F., Zheng Wang, Gueidan C C., Andrie R. M., Trippe K, Ciuffetti L.M., Wynns A., Fraker E., Hodkinson B.P., Bonito G., Groenewald J.Z., Arzanlou M., De Hoog G. S., W. Crous P.,Hewitt P., Pfister D.H., Peterson K., Gryzenhout M., Wingfield M. J.,Aptroot A., Sung-Oui Suh, Blackwell M., Hillis D. M., Griffith G. W., Castlebury L.A., Rossman A. L., Thorsten Lumbsch H., Ucking R.L., Udel B.U., Rauhut A.,

Diederich P., Ertz D., Geiser D.M., Hosaka K., Inderbitzin P., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Mostert L., O'donnell K., Sipman H., D. Rogers J., Shoemaker R.A., Sugiyama J., Summerbell R. C., Untereiner W., Johnston P.E., Stenroos, S., Zuccaro A., Dyer P.S., Crittenden P.T., Cole M. S., Hansen K., Trappe J. M., Yahr R., Lutzoni F., and Spatafora J.W., 2009. The ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, **58**(2):224-239

Sergeeva V., Schena L., Mosca S., Mammella M.A., Faedda R., Cacciola S.O., 2010. *Colletotrichum acutatum* as causal agent of olive anthracnose in Australia. *Petria* **20**: 251.

Sergeeva V., Spooner-Hart R., Nair N.G., 2008 a. Evidence of early flower infection in olives (*Olea europaea*) by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing anthracnose disease. *Australasian Plant Pathology* **3**, 81-82

Sergeeva V., Spooner-Hart R., Nair N.G., 2008 b. First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing leaf spots of olives (*Olea europaea*) in Australia. *Australasian Plant Pathology* **3**: 143-144.

Sergeeva, V., Hall, B., Tesoriero, L., Spooner-Hart, R-. Olive diseases and disorders in Australia and New Zealand. Olive Diseases and Disorders, 2011: 000-000 ISBN: 978-81-7895-539-1

Shivas R.G., Tan Y.P., 2009. A taxonomic re-assessment of *C. acutatum* introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. *Fungal Diversity* **39**: 111-122.

Sreenivasaprasad S., Talhinhos P., 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular Plant Pathology* **6**: 361-378.

Sutton B.C., 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey J.A, Jeger M.J. (eds). *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control, pp. 1-26. CAB International, Wallingford, UK.

Talhinhos P., Mota-Capitão, Martins S., Ramos A.P., Neves-Martins J., Guerra-Guimarães L., Várzea V., Silva M.C., Sreenivasaprasad S., Oliveira H., 2011. Epidemiology, histopathology, and aetiology of olive anthracnose caused by

Colletotrichum acutatum and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathology* **60**: 483-495.

Talhinhas P., Neves-Martins J., Oliveira H., Sreenivasaprasad S. 2009. The distinctive population structure of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose in the Algarve region of Portugal reflects a host-pathogen diversity hot spot. *FEMS Microbiology Letters* **296**: 31-38.

Talhinhas P., Sreenivasaprasad S., Neves-Martin J., Oliveira H., 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal the association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2987-2998.

Templeton, M.D., Rikkerink, E.H., Solon, S.L, Crowhurst, R.N., 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* **122**:225–230

Than, P.P., Jeewon, R., Hyde, K.D., Pongsumasamit, S., Mongkolporn, O., Taylor, P.W.J., 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology* **57**, 562–572.

Than, P.P., Shivas, R.G., Jeewon, R., Pongsupasamit, S., Marney, T.S., Taylor, P.W.J., Hyde, K.D., 2008a. Epitypification and phylogenyn of *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. *Fungal Diversity* **28**: 97-108

Thompson, J.D., D.G. Higgins, Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680.

TOPALi (<http://www.topali.org/>)

Trapero Casas A., 2003. La Antracnosis o Aceituna jabonosa en el cultivo del olivo. *Vida Rural* **168**: 46-50.

Valero, M., García-Martínez, S.M., Giner, M.J., Alonso, A., Ruiz, J.J., 2010. Benomyl sensitivity assays and species-specific PCR reactions highlight association of

two *Colletotrichum gloeosporioides* types and *C. acutatum* with rumple disease on Primofiori lemons. *Eur J Plant Pathol* 127:399–405

Vinnere, O., Fatehi, J., Wright, S.A.I., Gerhardson, B. 2002. The causal agent of anthracnose of Rhododendron in Sweden and Latvia. *Mycological Research* 106(1), 60-69.

Wharton, P.S., Diéguez-Uribeondo, J., 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61: 3-22.

Whitelaw-Weckert, M.A., Curtin, S.J., Huang, R., Steel, C.C., Blanchard C.L., Roffey, P.E., 2007. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. *Plant Pathology* 56: 448–463.

CAPITOLO III

3. Caratterizzazione biologico-molecolare di isolati di *Colletotrichum gloeosporioides* s. l., agenti dell'antracnosi dell'olivo

3.1. Introduzione

Con il termine *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. e Sacc. viene generalmente indicato un complesso di specie che va ben oltre gli isolati tipo di *C. gloeosporioides sensu stricto* (s. s.). Questo complesso di specie comprende importanti funghi fitopatogeni con ampia distribuzione mondiale, responsabili di malattie con ripercussioni economicamente importanti su una vasta gamma di piante ospiti (Sutton, 1982). *C. gloeosporioides sensu lato* (s. l.) è una specie ubiquitaria ed estremamente polifaga, che si comporta sia da patogeno primario, sia da patogeno opportunista, diffuso nelle regioni tropicali, subtropicali e in climi temperati. La sua descrizione originaria risale a Penz (1882) che la identificò come *Vermicularia gloeosporioides* Penz., caratterizzando un isolato ottenuto in Italia da agrumi. Tuttavia, la definizione di questa specie, basata prevalentemente su caratteri morfologici e sull'ospite associato, risulta tuttora molto controversa (Sutton, 1992). È stata spesso associata ad altre specie, ed in particolar modo a *C. acutatum*, con il quale esibisce la sovrapposizione di alcuni tratti morfologici e ospiti (Freeman *et al.*, 1998, Guerber *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005; Sreenivasaprasad e Thalhinias, 2005), fattori che hanno contribuito a generare notevole confusione nell'identificazione degli isolati appartenenti a questo complesso.

La forma perfetta o sessuale del genere *Colletotrichum* fu descritta per la prima volta da Stoneman (1898) come *Gnomoniopsis cingulata*, isolata da foglie di *Ligustrum*. Stoneman considerò *G. cingulata* come stato sessuale di *Gloeosporium cingulatum*, precedentemente descritto da Atkinson (1892) (Johnston e Jones, 1997). Tuttavia, questo nome generico era stato usato per identificare altri funghi e von Schrenk e Spaulding (1903), introdussero il genere *Glomerella*, per ospitare il telomorfo di *Colletotrichum* Corda e *Gloeosporium* auct. (Bryson *et al.*, 1992). Arx (1957) nella sua revisione indicò *Gloeosporium cingulata* sinonimo di *Colletotrichum gloeosporioides*, e *Glomerella cingulata* fu indicata come forma sessuale di *C. gloeosporioides*. All'interno di questo *taxon*, alcuni ceppi sono omotallici e producono il telomorfo in coltura (Cannon *et al.*, 2008) che saltuariamente è stato osservato anche su foglie di olivo (Cacciola *et al.*, 1996).

C. gloeosporioides è stata riconosciuta come un *taxon* complesso da von Arx (1957), che realizzò una prima importante revisione del genere *Colletotrichum* che portò alla riduzione delle specie accettate da 750 ad 11, con notevole diminuzione delle sinonimie particolarmente abbondanti in *C. gloeosporioides* (circa 600 specie) e all'identificazione di nove forme speciali ad esso riferibili (Liu *et al.*, 2007; Cannon *et al.*, 2008). In seguito alla revisione di von Arx, Sutton (1992) riportò il numero di specie a 37 ed elevò ciascuna delle forme speciali di *C. gloeosporioides* a specie distinte quali *C. orbiculare* (Berk e Mont.) Arx (sinonimo di *C. lagenarium* Pass. Ellis e Halst.), *C. trifolii* Bain, *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi e Cavara, *C. malvarum* (A. Braun & Casp.) Southw., *C. gnaphalii* Syd. (no ospite specifico), *C. helichrysi* (G. Winter) Arx (no ospite specifico), *C. miyabeana* (no ospite specifico), *C. musae* (Berk. & M. A. Curtis.) Arx, e *C. psoraleae* Peck (Sherriff *et al.*, 1994; Jonhston e Jones, 1997; Liu *et al.*, 2007). Sutton, inoltre, differenziò *C. gloeosporioides s. s.* da altre sette forme speciali indicate nel complesso come *C. gloeosporioides s. l.* (Sutton, 1992; Moriwaki *et al.*, 2003).

Attualmente, *C. gloeosporioides* costituisce un complesso di specie contenente una serie di sottogruppi che mostrano vari gradi di patogenicità, ospite-specificità e omogeneità genetica (Hyde *et al.*, 2009). Photita *et al.* (2005), sulla base di studi morfologici e dell'analisi delle regioni ITS del rDNA ribosomale, ha distinto *C. gloeosporioides s. l.* in cinque morfo-gruppi: *C. musae*, *C. truncatum*, identificate come specie separate e 3 gruppi distinti di *C. gloeosporioides*. Al primo gruppo, sono stati associati isolati di *C. fragariae* e *C. kahawae*, suggerendo che queste due specie possono essere considerate sottogruppi del complesso *C. gloeosporioides s. l.*, come indicato da diversi autori (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Hyde *et al.*, 2009; Prihastuti *et al.*, 2009). Il secondo gruppo di *C. gloeosporioides*, comprendeva isolati di *C. boninense*, specie separata recentemente in base a caratteri morfologici e molecolari (Moriwaki *et al.*, 2003). Il terzo gruppo, presentava isolati con caratteristiche morfologiche differenti rispetto a quelle indicate da Sutton, tali da essere considerati come nuova specie (Photita *et al.*, 2005). *Colletotrichum musae* è stata considerata, in funzione dei caratteri morfologici, come una specie distinta da Sutton, successivamente confermata anche da Sreenivasaprasad *et al.* (1996) sulla base di polimorfismi nelle regioni ITS, ma la sua separazione da *C. gloeosporioides* non è confermata

universalmente anche per la mancanza dell'epitipo (Cannon *et al.*, 2008). *Colletotrichum fragariae* A.N. Brooks, agente responsabile dell'antracnosi della fragola, è stato distinto all'interno dell' aggregato *C. gloeosporioides*, ma le divergenze tassonomiche basate sullo studio delle regioni ITS del rDNA sono minime per distinguerla come una specie separata (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996) ed inoltre la specie presenta una distribuzione più ampia di ospiti che richiederebbe una maggiore definizione (Cannon *et al.*, 2008; Hyde *et al.*, 2009).

L'agente patogeno inizialmente indicato come *C. coffeanum* Noack, da isolati di caffè in Brasile, considerato sinonimo di *C. gloeosporioides* (Sutton, 1992; Sreenivasaprasad *et al.* 1993, Cannon *et al.*, 2008), successivamente rinominato come *C. kahawae* Waller e Bridge, agente responsabile dell'antracnosi del caffè in Africa, risulta essere strettamente collegato a *C. gloeosporioides*, come evidenziato dall'analisi delle regioni ITS (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996). Analisi mediante SSREP e ALFP hanno evidenziato che *C. kahawae* risulta essere una popolazione clonale che differisce solo per alcuni caratteri biochimici e per la patogenicità da *C. gloeosporioides* (Cannon *et al.*, 2008; Hyde *et al.*, 2009). Tuttavia, ci sono ancora molti studi controversi sulla tassonomia di questa specie a causa della sua rilevanza economica e distribuzione geografica, anche se recentemente è stata accettata come specie distinta (Bridge *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2009, Hyde *et al.*, 2009; Prihastuti *et al.* 2009, Nguyen *et al.*, 2010). Altre specie sono state formalmente descritte e separate dal complesso *C. gloeosporioides s. l.* tra cui *C. asianum*, *C. siamense*, *C. fructicola* e *C. cordylinicola* (Prihastuti *et al.* 2009) ma ulteriori studi dovranno essere affrontati per rivalutare la corretta distinzione di altre specie quali *C. horii* B. Weir e P.R. Johnst, *C. nymphaeae* (Pass.), *C. nupharicola* D.A. Johnson Carris e J.D. Rogers, *C. xathorrhoeae* R.G. Shivas, *C. gossypi* Southw., *C. hymenocallidis* (Cannon *et al.*, 2008; Hyde *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2011). L'analisi delle sequenze ITS, gene chiave per l'identificazione dei funghi mediante strategie di "barcoding", appare molto importante, ma non sembra sufficiente per comprendere la diversità filogenetica in maniera univoca all'interno di questo complesso di specie (Cai *et al.*, 2009 e Prihastuti *et al.*, 2009). La grande confusione tassonomica ha portato al deposito di sequenze geniche in GenBank associandole a nomi quasi sempre non corretti (Cannon *et al.*, 2008). Inoltre anche piccoli errori nelle sequenze depositare possono comprometterne la validità tenuto conto

che nel genere *Colletotrichum* la distinzione fra le specie è spesso legata a poche basi polimorfiche. Attualmente la comunità scientifica sta cercando di porre rimedio con una intensa ricerca filogenetica basata su molti geni, tra cui le regioni ITS-rDNA, e i geni β -tubulina, MAT1-2 e GDPH e GS (Moriwaki *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2006; Cannon *et al.*, 2008; Than *et al.*, 2008; Phoulivong *et al.*, 2010).

C. gloeosporioides s. s. attualmente identificato con l'ex epitipo di *Vermicularia gloeosporioides* isolato da *Citrus* in Italia meridionale (IMI 356878=CBS 953.97) (Cannon *et al.*, 2008): Su PDA, presenta un micelio variabile, assumendo colorazioni dal bianco chiaro al grigio scuro, micelio aereo, infeltrito o fioccoso verso i margini della colonia. Le temperature cardinali di crescita su tutti i substrati 5°C (minima), 35°C (massima) 25°C (optimum). Il tasso medio giornaliero di crescita è di 26,5 mm/g a 25°C. Le setole presentano una lunghezza di 40-120 μm , con 1-5 setti, conidiofori irregolarmente ramificati, spesso pigmentati alla base. I conidi sono ialini, lisci generalmente dritti, leggermente ellissoidali o subcilindrici con le estremità leggermente arrotondate e la base appiattita, a volte ristretti leggermente a metà del conidio. Le dimensioni dei conidi in acqua sono 12-17 (23,5) x 4,5-6 μm (l/b ratio =2,6). Gli appressori presentano dimensioni comprese tra i 7,2-8,6 x 4,7-6 μm , sono asettati, clavati, più ampi al centro (Sutton, 1982; Cannon *et al.*, 2008). Il pH ottimale per la crescita del fungo è 5,5-7 (Prusky *et al.*, 2001) e risulta inoltre sensibile al *benomyl* (Peres *et al.*, 2004; Nakaune e Nakano, 2007).

C. gloeosporioides s. l. è un patogeno cosmopolita su un'ampia gamma di piante ospiti tra cui: *Agavaceae*, *Pomaceae*, avocado (Shabi e Katan, 1983, Freeman *et al.*, 1996), stative (Freeman *et al.*, 2000; Maymon *et al.*, 2006), agrumi (Agostini e Timmer, 1992), mandorlo, fragola (Adaskaveg e Hartin, 1997), caffè, mango, *Cucurbitaceae*, pomodoro (Maymon *et al.*, 2006), papaya, frutto della passione, *Proteaceae* (Lubbe *et al.*, 2004), *stylosanthes* (Hyde *et al.*, 2009a) e olivo (Martin Garcia e Figueres, 1999). Alcuni ceppi sono altamente ospite-specifici da esserne stato ipotizzato l'impiego come erbicidi (Templeton, 1992).

Numerosi nomi sono stati associati negli anni agli agenti causali dell'antracnosi dell'olivo a partire dalla prima descrizione di Almeida (1899) in Portogallo che parlò di *Gloeosporium olivarum* Alm. Successivamente quello che si riteneva essere l'agente causale della lebbra fu riclassificato da von Arx (1957) come *C. gloeosporioides*

(Graniti *et al.*, 1993; Cacciola *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2002; Trapero Casas, 2003). Attualmente, è noto che l'antracnosi dell'olivo è causata da un complesso di specie appartenenti principalmente *C. acutatum s. l.* (Cfr. capitolo II, par. 2.1.1.), ma anche da altri *taxa* genericamente indicati come *C. gloeosporioides*. In Spagna, *C. gloeosporioides* è stato considerato debole patogeno marginale con comportamento saprofitario che si sviluppa sui frutti solo quando molto maturi (Martin e García-Figueroles, 1999; Moral *et al.*, 2008; Moral e Trapero, 2009). Analogamente studi condotti in Portogallo hanno evidenziato una netta prevalenza di *C. acutatum* (97%) sebbene gli isolati di *C. gloeosporioides* abbiano mostrato una virulenza simile alle quella di isolati *C. acutatum s. l.* (Talhinhas *et al.*, 2005; Talhinhas *et al.*, 2009). Recentemente, è stata segnalata in Tunisia la presenza di *C. gloeosporioides* come agente causale di antracnosi sulle cv *Meski*, *Manzanilla* e *Picholine* (Rhouma *et al.*, 2010). Anche in Italia prevale nettamente *C. acutatum s. l.* ed in particolare il gruppo A4 recentemente classificato come *C. clavatum* sp. nov. (Faedda *et al.*, 2011), tuttavia l'isolamento di ceppi genericamente riconducibili a *C. gloeosporioides* è abbastanza frequente, soprattutto in Sicilia (Agosteo *et al.*, 2002; Scarito *et al.* 2003). Una situazione diversa sembra essere presente in Australia in cui isolati riconducibili a *C. gloeosporioides* sembrano essere ampiamente diffusi e sono causa di ingenti perdite (Sergeeva, comunicazione personale)

Scopo del presente lavoro è stato caratterizzare geneticamente e biologicamente una popolazione di isolati genericamente riconducibili a *C. gloeosporioides* a fine di meglio determinarne l'identità e valutarne la virulenza su olive artificialmente inoculate.

3.2. Materiali e metodi

3.2.1 Isolati fungini

Lo studio ha riguardato isolati di *Colletotrichum* spp. non riconducibili a *C. acutatum* s. l., ottenuti principalmente da olive, ma anche da agrumi in diverse aree dell'Italia meridionale (principalmente Sicilia e Puglia), oltre che dalla California, ex Jugoslavia e l'Australia. Tutti gli isolati fanno parte della collezione micologica del Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari e Forestali, dell'Università "Mediterranea" di Reggio Calabria e del Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari e Ambientali dell'Università di Catania.

3.3. Caratterizzazione molecolare

3.3.1. Estrazione di DNA da micelio

L'estrazione del DNA è stata eseguita su gli isolati indicati nella Tab. 1., usando la procedura descritta da Schena e Cooke, (2006) (Cfr. capitolo II paragrafo 2.3.1). Il DNA ottenuto è stato sospeso in 50 µl di NFW (nuclease-free water) e conservato a -20°C.

Tabella 1. Isolati di *Colletotrichum* spp. esaminati in questo studio

Codice isolato	Ospite	Origine geografica	Data collezione	Accessione GenBank	
				ITS-rDNA	β -tubulin 2
1765	<i>Citrus</i> sp.	California	1999 ^a	n.d.	n.d.
8	<i>Citru sinensis</i>	California	1999 ^a	n.d.	n.s.
A1	<i>Annona cherimoya</i>	Calabria	1992	n.d.	n.d.
ACI2	<i>Olea europaea</i>	Sicilia	2000	n.d.	n.d.
C1	<i>Citrus limon</i>	Calabria	1992	n.d.	n.d.
C2	<i>C. limon</i>	Calabria	1992	n.d.	n.d.
C42	<i>Pistacia vera</i>	Puglia	1995	n.d.	n.d.
C43	<i>Prunus cersifera</i>	Puglia	2005	n.d.	n.d.
CAMP34	<i>O. europaea</i>	Puglia	2005 ^a	n.d.	n.d.
CAMP7	<i>O. europaea</i>	Puglia	2005 ^a	n.d.	n.d.
CINA	<i>O. europaea</i>	Cina	1998 ^a	n.d.	n.d.
CITRUS 63	<i>Citrus</i>	Misterbianco (CT), Sicilia, Italia	2011	n.d.	n.s.
CITRUS 64	<i>Citrus</i>	Misterbianco (CT), Sicilia, Italia	2011	n.d.	n.d.
CITRUS 66	<i>Citrus</i>	Misterbianco (CT), Sicilia, Italia	2011	n.d.	n.d.
CITRUS 67	<i>Citrus</i>	Misterbianco (CT), Sicilia, Italia	2011	n.d.	n.d.
CITRUS 69	<i>Citrus</i>	Misterbianco (CT), Sicilia, Italia	2011	n.d.	n.d.
CITRUS79	<i>Citrus</i>	Misterbianco (CT), Sicilia, Italia	2011	n.d.	n.d.
F169	<i>Citrus</i>	Catania, Sicilia	2010	n.d.	n.d.
F170	<i>Citrus</i>	Piana di Catania, Sicilia	2010	n.d.	n.d.
F171=OL MINEO	<i>O. europaea</i>	Mineo (CT), sicilia	2010	n.d.	n.d.
F172	<i>Citrus</i>	Chiaromonte, Sicilia	2010	n.d.	n.d.
F190	<i>Citrus</i>	Sicilia	2011	n.d.	n.d.
F191=T1COLL	<i>Citrus</i>	Sicilia	2011	n.d.	n.s.
F96	<i>Citrus</i>	Sicilia	2011	n.d.	n.s.
OL15	<i>O. europaea</i>	Puglia	1992	n.d.	n.s.
R31	<i>O. europaea</i>	Calabria	1992	n.s.	n.d.

Codice isolato	Ospite	Origine geografica	Data collezione	Accessione GenBank	
				ITS-rDNA	β-tubulin 2
PEP	<i>Capsicum annuum</i>	Calabria	1992	n.d.	n.d.
S1=S1/S2	<i>O. europaea</i>	Sicilia	1992	n.d.	n.d.
SEP.LIMERA	<i>Citrus</i>	Calabria	1992	n.d.	n.d.
UWS169	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.
UWS170	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.
UWS171	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.
53	<i>O. europaea</i>	Puglia	1995	n.d.	n.d.
MUSAE	<i>Musa spp.</i>	Sicilia	1992	n.d.	n.d.
C18	<i>Citrus</i>	Calabria	1992	n.d.	n.d.
C47	<i>Pistacia vera</i>	Puglia	1995	n.d.	n.d.
C53	<i>Pyrus communis</i>	Puglia	1995	n.d.	n.d.
CAM	<i>Camellia spp.</i>	Sicilia	1990	n.d.	n.d.
MIMOSA	<i>Acacia dealbata</i>	Calabria	1993	n.d.	n.d.
OLF23	<i>O. europaea</i>	Puglia	1993	n.d.	n.d.
OLF24	<i>O. europaea</i>	Puglia	1992	n.d.	n.d.
OLF38	<i>O. europaea</i>	Puglia	1992	n.d.	n.d.
OLF39	<i>O. europaea</i>	Puglia	1992	n.d.	n.d.
OLF41	<i>O. europaea</i>	Puglia	1992	n.d.	n.d.
UWS1	<i>O. europaea</i>	NSW, Australia	2007	n.d.	n.d.
UWS13	<i>O. europaea</i>	NWS, Australia	2007	n.d.	n.d.
UWS168	<i>Nerium sp.</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.
UWS178	<i>O. europaea</i>	Australia	2011	n.d.	n.d.
UWS66	<i>O. europaea</i>	NWS, Australia	2007	n.d.	n.d.
VMIN	<i>O. europaea</i>	Ex Jugoslavia	1997	n.d.	n.d.

^a Anno di ricevimento dell'isolato

3.3.2. Amplificazione dei geni nucleari di interesse

Il DNA estratto è stato utilizzato per amplificare e sequenziare la regione ITS1-5.8S-ITS2 dell'rDNA e un frammento della β -tubulina 2 compreso fra l'esone 1 e 6. Le regioni ITS sono state amplificate e sequenziate con i primer universali ITS5-ITS4 (White *et al.*, 1990) mentre per la β -tubulina 2 sono stati usati i primer T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997) e β t/2b (Glass e Donaldson, 1995) (Tab. 2).

Tabella 2 Primer utilizzati nel presente lavoro per amplificare i geni di interesse

Regione genica	Primer	Sequenza	Riferimento bibliografico
ITS-5.8S-ITS2	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS4	CCTCCGCTTATTGATATGC	
β -tubulina 2 (regione 1)	T1	CTTACAATCTCACGCATGTT	O'Donnell e Cigelnik, 1997
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Glass e Donaldson, 1995

Tutte le reazioni di PCR sono state realizzate con un termociclatore (Mastercycler, Eppendorf) secondo le condizioni descritte nel Cap. II, paragrafo 2.3.2. I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% in tampone TBE (Tris-borato, EDTA) e visualizzati mediante colorazione con SYBR SAFE DNA gel stain (Invitrogen). Per la stima delle dimensioni degli ampliconi è stato utilizzato un 100 bp marker (Invitrogen). Tutte le immagini dei gel elettroforetici sono state acquisite mediante Gel Doc (Biorad).

3.3.3. Sequenziamento delle regioni geniche di interesse

I prodotti delle amplificazioni sono stati purificati, per eliminare *primer* in eccesso e dimeri degli stessi *primer*, con l'uso di colonnine di purificazione PCRExtract Mini Kit (5 Prime GmbH). Per la purificazione è stata seguita la procedura indicata dalla casa produttrice. I prodotti dell'amplificazione sono stati analizzati nuovamente mediante elettroforesi come descritto in precedenza. I frammenti purificati sono stati sequenziati in entrambe le direzioni mediante servizio di sequenziamento esterno eseguito dalla ditta Macrogen presso la sua filiale in Europa (Amsterdam, Olanda). Gli

elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati con il programma ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>) per verificare la qualità e l'affidabilità delle sequenze e per generare la sequenza consenso dalle due sequenze ("forward" e "reverse") ottenute per ciascun campione. Tutte le sequenze ottenute sono state comparate con quelle disponibili nelle banche dati internazionali mediante analisi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) e con sequenze certificate rese disponibili nell'ambito di un progetto di "barcoding2 per funghi (<http://www.fungalbarcoding.org/>). Inoltre, le sequenze ITS ottenute nel presente lavoro di tesi, insieme a sequenze di riferimento (Tab. 3) disponibili per colture "tipo" delle diverse specie di *Colletotrichum* spp. attualmente accettate dalla comunità scientifica (Hyde *et al.*, 2009), sono state allineate utilizzando il programma ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) e introdotte nel programma TOPALi (www.topali.org/) per la costruzione di alberi filogenetici con i metodi PhyML e MrBayes (Milne *et al.*, 2008). La stessa procedura è stata utilizzata per costruire un albero filogenetico basato sulle sequenze della β -tubulina 2, ma in questo caso non sono state inserite sequenze di riferimento poiché quelle disponibili, non sempre apparivano attendibili o erano di lunghezza diversa rispetto a quelle ottenute nel presente lavoro.

Tabella 3. Sequenze ITS 5.8S-ITS2 del rDNA ottenute da isolati di riferimento ed utilizzate nelle analisi molecolari

Codice isolato	Codici di accesso (GenBank)	Articolo di riferimento
<i>C. horii</i>		
C1180	GQ329690	Weir e Johnston, 2010
<i>C. boninense</i>		
Isolate MAFF 305972	AB051400	Moriwaki <i>et al.</i> , 2003
<i>C. kahawae</i>		
ICMP17816	GU174550	Weir e Johnston, 2010
<i>C. hymenocallidis</i>		
CSSN2	GQ485600	Yang <i>et al.</i> , in stampa
<i>C. fragariae</i>		
ICMP17814	GU174546	Weir <i>et al.</i> , 2010
<i>C.xanthorrhoeae</i>		
BRIP45094	GU048667	Hyde <i>et al.</i> , 2009
<i>C. fructicola</i>		
BPDI16	F5972603	Prihastuti <i>et al.</i> , 2009
<i>C. gloeosporioides</i>		
STE-U 4295	AY376532	Lubbe <i>et al.</i> , 2004
IMI 356878	EU371022	Cannon <i>et al.</i> , 2008

3.4. Caratterizzazione biologica

3.4.1. Saggi di patogenicità su drupe di olivo

I saggi di patogenicità sono stati eseguiti con olive della *cultivar* di olivo *Picholine* con l'obiettivo di comparare la virulenza di differenti isolati di *C. gloeosporioides s. s.* e di *Colletotrichum* spp. Nelle prove sono stati utilizzati 9 isolati di *C. gloeosporioides s. s.*, 10 isolati rappresentativi di *C. gloeosporioides s.l.* e un isolato (OLF24) non ben identificato, affine a *C. crassipes*. Nelle prove di patogenicità sono stati anche inseriti come elemento di paragone due isolati di *C. clavatum*, due di *C. simmondsii* e due di *C. acutatum* gruppo A5 (Tab. 4). Le olive sono state raccolte da una pianta coltivata in Puglia in regime di agricoltura biologica. Le prove sono state ripetute in due differenti fasi fenologiche:

- ✓ stadio verde = frutti in fase di pre-invaiaitura di colore verde;
- ✓ stadio maturo = frutto con pericarpo uniformemente nero;

Le prove sono state condotte con frutti sani privi di alterazioni esterne e di infezioni da mosca delle olive, seguendo il protocollo descritto nel Cap. II (par. 2.3.4). In tutte le prove, ogni isolato fungino è stato inoculato su 30 olive suddivise in tre ripetizioni posizionate in tre differenti contenitori di plastica. Come testimone negativo è stato utilizzato un ugual numero di olive inoculate con un tassello di PDA privo di micelio.

Le osservazioni sintomatologiche sono state eseguite con regolarità ogni 7 giorni a partire da 7 giorni dopo l'inoculazione, per un totale di 3 osservazioni (21 gg). Le alterazioni superficiali sono state utilizzate per valutare la percentuale di frutti infetti e la gravità della malattia espressa in termini di % di superficie dei frutti infetti interessata da marciume. Per questa rilevazione è stata utilizzata una scala di gravità della malattia con 5 classi di infezione come di seguito riportato (Tab. 5).

Tabella. 5. Scala empirica utilizzata per la valutazione della gravità delle infezioni su olive artificialmente inoculate.

Classe di infezione	Sintomi rilevati
0	Assenza di sintomi
1	1-25% della superficie interessata da marciume
2	26-50% della superficie interessata da marciume
3	51-75% della superficie interessata da marciume
4	76-100% della superficie interessata da marciume

Inoltre, la medesima scala, è stata utilizzata per valutare separatamente la superficie esterna dei frutti ricoperta da micelio sporulante. L'incidenza della malattia (% di frutti infetti) e la gravità della stessa (estensione della superficie con marciume o estensione della superficie con micelio sporificato) sono stati combinati in un unico indice (indice di McKinney – McKinney, 1923) come descritto nel capitolo II (Cfr. Cap. II, par. 2.3.4.) che tiene in considerazione sia l'incidenza del sintomo che la sua gravità su ciascuna drupa.

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il programma di statistica Spss che ha consentito l'analisi della varianza (ANOVA). Le medie ottenute sono state comparate con l'ausilio del test di "Duncan".

Tabella 4. Isolati di *Colletotrichum* spp. utilizzati nelle prove di patogenicità

Codice isolato	Ospite	Origine geografica	Raggruppamento filogenetico
1765	<i>Citrus</i>	California	<i>C. gloeosporioides s. s.</i>
ACI2	<i>Olea europaea</i>	Sicilia	<i>C. gloeosporioides s. s.</i>
CAMP34	<i>O. europaea</i>	Puglia	<i>C. gloeosporioides s. s.</i>
CAMP7	<i>O. europaea</i>	Puglia	<i>C. gloeosporioides s. s.</i>
F171=OL MINEO	<i>O. europaea</i>	Sicilia	<i>C. gloeosporioides s. s.</i>
F191=T1COLL	<i>Citrus</i>	Sicilia	<i>C. gloeosporioides s. s.</i>
S1=S1/S2	<i>O. europaea</i>	Sicilia	<i>C. gloeosporioides s. s.</i>
UWS171	<i>O. europaea</i>	Australia	<i>C. gloeosporioides s. s.</i>
OLF38	<i>O. europaea</i>	Puglia	<i>C. gloeosporioides s. l. (A)</i>
OLF39	<i>O. europaea</i>	Puglia	<i>C. gloeosporioides s. l. (A)</i>
OLF41	<i>O. europaea</i>	Puglia	<i>C. gloeosporioides s. l. (A)</i>
53	<i>O. europaea</i>	Puglia	<i>C. gloeosporioides s. l. (B)</i>
OLF23	<i>O. europaea</i>	Puglia	<i>C. gloeosporioides s. l. (B)</i>
UWS1	<i>O. europaea</i>	Australia	<i>C. gloeosporioides s. l. (B)</i>
UWS13	<i>O. europaea</i>	Australia	<i>C. gloeosporioides s. l. (B)</i>
UWS168	<i>Nerium sp.</i>	Australia	<i>C. gloeosporioides s. l. (B)</i>
UWS66	<i>O. europaea</i>	Australia	<i>C. gloeosporioides s. l. (B)</i>
VMIN	<i>O. europaea</i>	Ex Jugoslavia	<i>C. gloeosporioides s. l. (B)</i>
OLF24	<i>O. europaea</i>	Puglia	<i>Colletotrichum crassipes?</i>
1568	<i>O. europaea</i>	Portogallo	<i>C. simmondsii</i>
UWS68	<i>O. europaea</i>	Australia	<i>C. simmondsii</i>
UWS14	<i>O. europaea</i>	Australia	<i>C. acutatum A5</i>
UWS147	<i>O. europaea</i>	Australia	<i>C. acutatum A5</i>
CBS193,32	<i>O. europaea</i>	Grecia	<i>C. clavatum</i>
FV168	<i>O. europaea</i>	Calabria	<i>C. clavatum</i>

4. Risultati e Discussione

Nel presente lavoro isolati di *C. gloeosporioides sensu stricto* e *C. gloeosporioides sensu lato* ottenuti principalmente da olivo ed agrumi, provenienti da diverse aree geografiche, sono stati caratterizzati mediante amplificazione e sequenziamento della regione ITS1-5.8S-ITS2 e di una porzione della β -*tubulina* 2. Successivamente, 25 isolati rappresentativi dei principali gruppi filogenetici sono stati utilizzati in prove di patogenicità volte a valutarne il livello di virulenza su olive artificialmente inoculate in due differenti stati fenologici (olive verdi e olive uniformemente nere).

Le analisi filogenetiche condotte con entrambi i geni hanno permesso l'identificazione di quattro 4 gruppi principali supportati da due differenti metodi di analisi (*Maximum likelihood* e *Bayesian*). Un primo gruppo è costituito da un solo isolato (OLF24) ottenuto da olivo in Puglia (Fig. 1 ITS, Fig. 2 β -*tubulina*). Come per molti altri isolati, l'identità di OLF24 non è chiara a causa dell'estrema confusione esistente nella tassonomia del genere *Colletotrichum*; tuttavia, sia la sequenza ITS che quella del gene della β -*tubulina* suggeriscono un'elevatissima affinità con *C. crassipes*. In particolare, la regione ITS è identica a quella di un isolato di riferimento (CBS 159.75) utilizzato nel programma di "barcoding" per l'identificazione molecolare dei funghi (<http://www.fungalbarcoding.org/>). Da un punto di vista patogenetico, questo isolato si è comportato in modo analogo agli isolati del gruppo *C. gloeosporioides s. l. A*, poiché non è stato in grado di determinare lo sviluppo di marciume su olive verdi (Fig. 3) ed è risultato un debole patogeno su olive mature (Fig. 4).

Un secondo gruppo di isolati è stato identificato nel presente lavoro come *C. gloeosporioides s. l. A* e comprende tre isolati ottenuti da olivo (OLF38, OLF39 e OLF41) e tre isolati ottenuti rispettivamente da agrumi, pistacchio e camelia. Questo gruppo è molto uniforme essendo gli isolati che lo costituiscono accomunati da sequenze ITS identiche (Fig. 1) e da sequenze del gene della β -*tubulina* che si differenziano per pochissime basi (Fig. 2). Nel complesso, questo gruppo di isolati sembra essere molto vicino a *C. boninense* ed in particolare all'isolato di riferimento di questa specie (MAFF305972) da cui si differenzia per 3 basi azotate a livello dei geni ITS.



Fig. 1. Albero filogenetico costruito utilizzando la regione ITS1-5.8S-ITS2 del DNA ribosomiale di isolati rappresentativi di *Colletotrichum gloeosporioides* s.l.. L'albero mostrato in figura è stato costruito con il metodo *Maximum likelihood* (PhyML) e i numeri a livello dei nodi rappresentano i valori di "bootstrap" con questo metodo (numero superiore) e con il metodo "*Bayesian*" (MrByes) (numero inferiore).

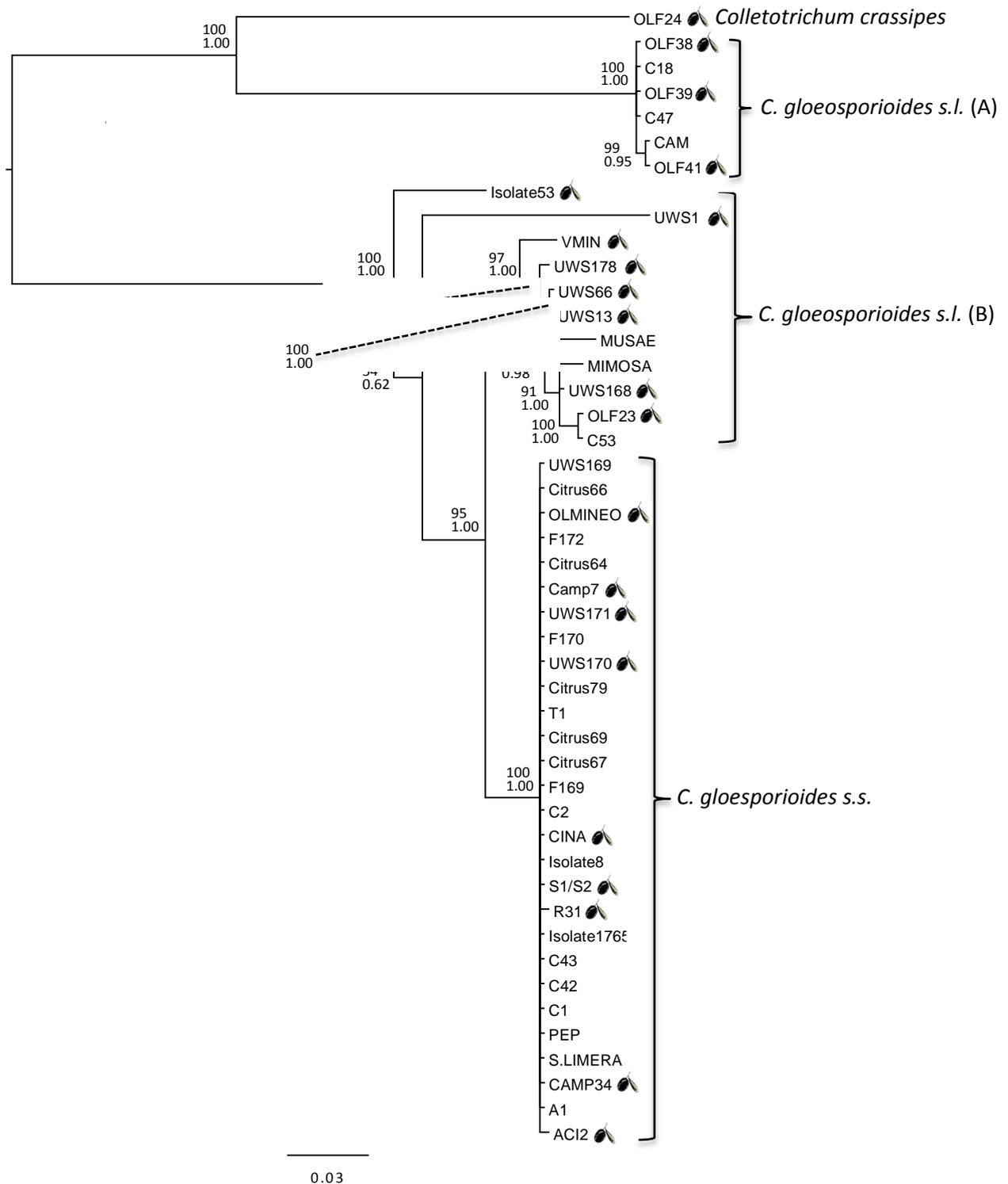


Fig 2 Albero filogenetico costruito utilizzando una porzione del gene della β -tubulina2 di isolati rappresentativi di *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. L'albero mostrato in figura è stato costruito con il metodo *Maximum likelihood* (PhyML) e i numeri a livello dei nodi rappresentano i valori di "bootstrap" con questo metodo (numero superiore) e con il metodo "*Bayesian*" (MrByes) (numero inferiore).

Colletotrichum boninense originariamente rientrava nell'ampio concetto di specie di *C. gloeosporioides s. l.* poiché differente da *C. gloeosporioides s. s.* per una serie di caratteri morfologici (von Arx, 1957; Sutton 1980). Più recentemente, questo fitopatogeno è stato separato dal complesso *C. gloeosporioides s. l.* anche perché ritrovato su un' ampio gamma di ospiti (Moriwaki *et al.*, 2003; Lubbe *et al.*, 2004), ma altri Autori continuano a ritenere che la sua collocazione in *C. gloeosporioides s. l.* sia appropriata tanto che *C. boninense* è stato definito come rappresentante tipo del gruppo III di *C. gloeosporioides s. l.* (Photita *et al.*, 2005).

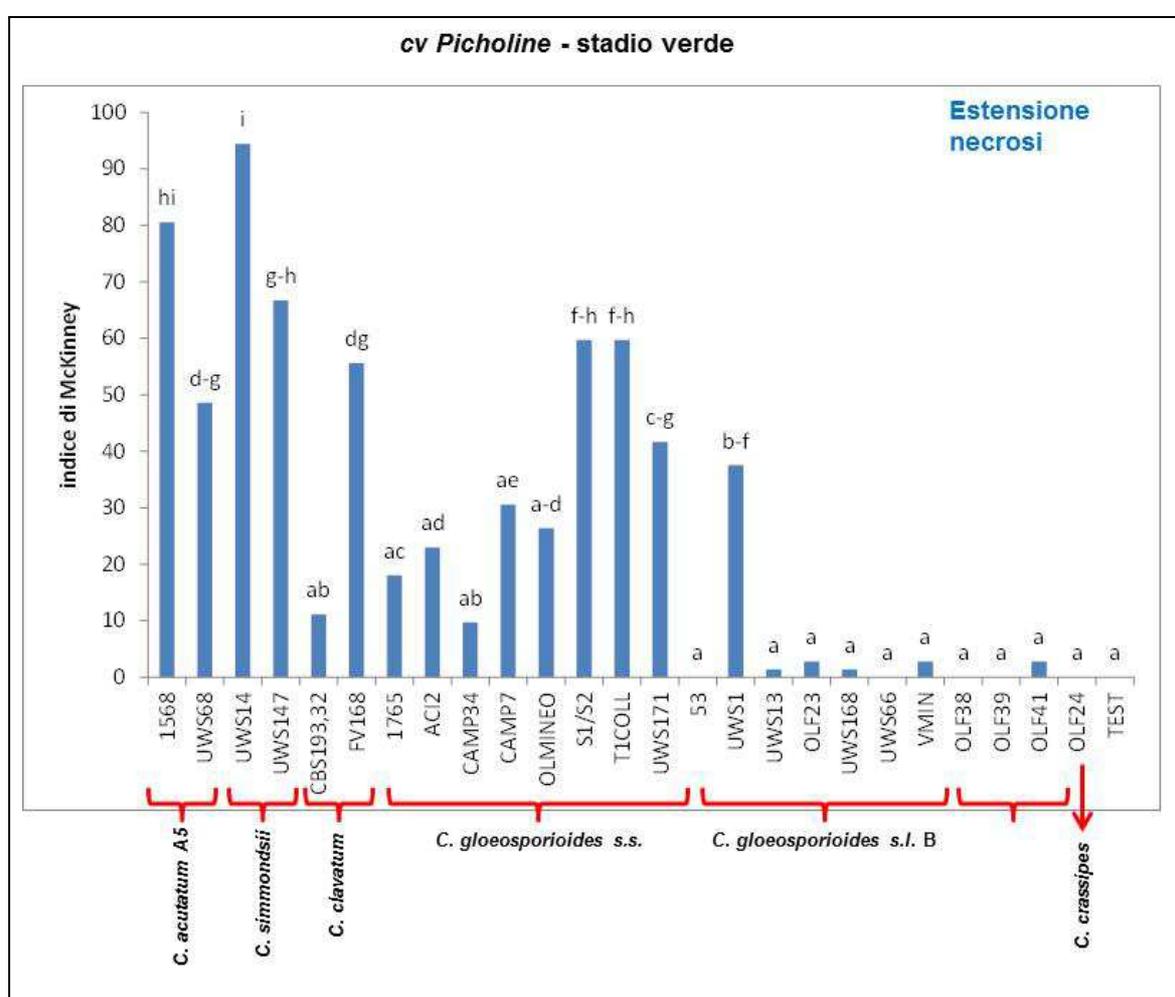


Fig.3 Estensione delle necrosi su olive inoculate con isolati di *Colletotrichum* spp. nella fase fenologica “olive verdi”

Gli isolati di questo gruppo utilizzati nelle prove di patogenicità hanno avuto un comportamento molto uniforme risultando sostanzialmente non patogeni sulle olive

nella fase fenologica verde e poco patogeni su olive uniformemente nere. Questo gruppo di isolati sembra rappresentare una specie patogena, che come visto in precedenza potrebbe essere *C. boninense*, di scarsa rilevanza per l'antracnosi dell'olivo poiché interessa solo olive in fase avanzata di maturazione. A conferma di quanto detto, i tre isolati da olivo utilizzati nelle prove di patogenicità sono stati ottenuti in Puglia da olive ben oltre il livello ottimale di maturazione.

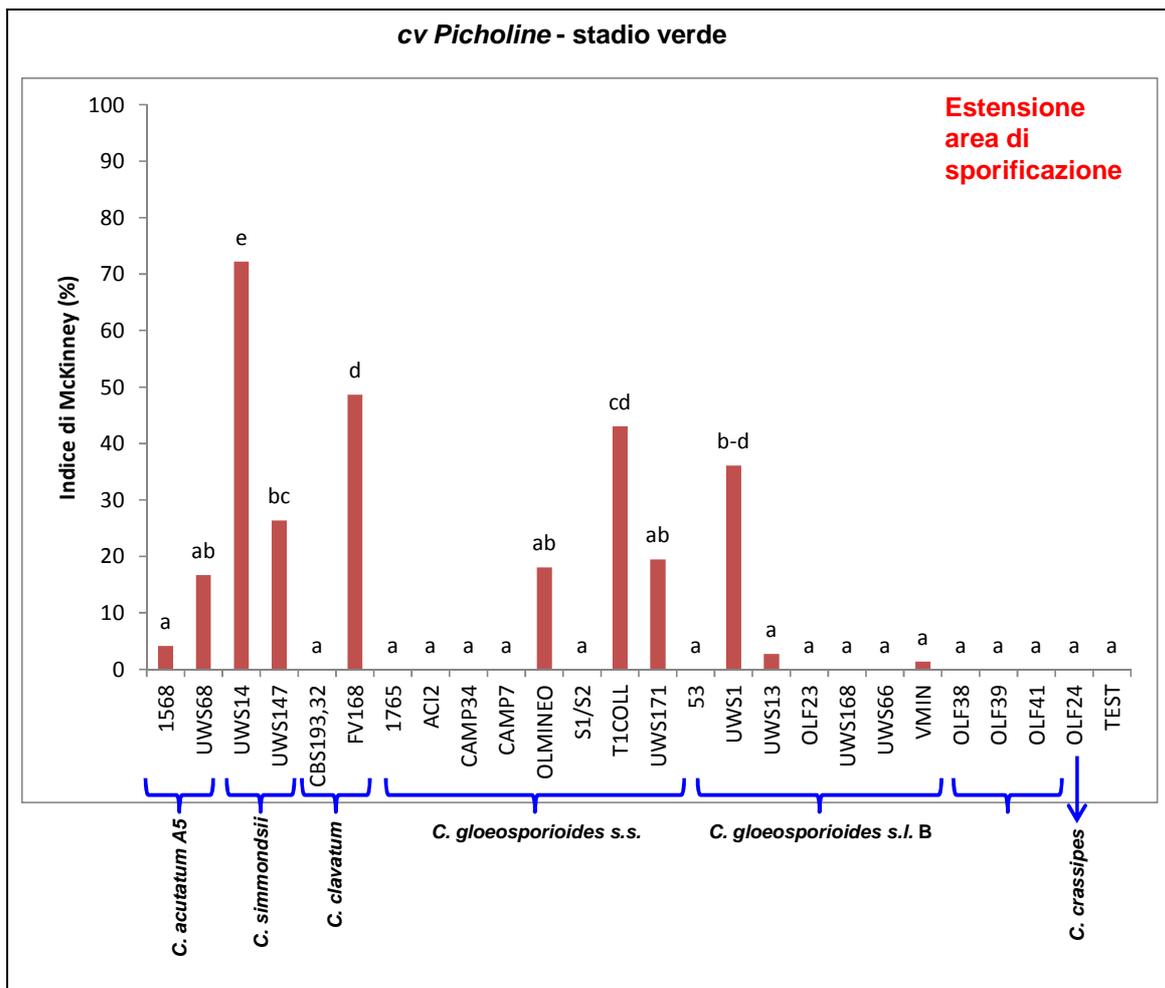


Fig. 4 Estensione della superficie ricoperta da spore su olive inoculate con isolati di *Colletotrichum* spp. nella fase fenologica “olive verdi”.

Un livello intermedio di virulenza è stato osservato per un terzo gruppo di isolati, geneticamente estremamente eterogeneo e identificato nel presente lavoro come *C. gloeosporioides* s. l. B (Fig.1, Fig. 2). L'identità degli isolati rientranti in questo gruppo appare estremamente dubbia a causa della confusione regnante nella tassonomia di *Colletotrichum* spp. ed in particolare in un gruppo di specie molto vicine da un punto

di vista filogenetico, che possono essere associate a questo gruppo. Come mostrato in Fig.1, nel gruppo B di *C. gloeosporioides s.l.* confluiscono 7 isolati ottenuti da olivo, un isolato da pero, un isolato da mimosa, un isolato da banana, identificato come *C. musae* (MUSAE), e 7 differenti specie (*C. kahawae*, *C. horii*, *C. hymenocallidis*, *C. fragariae*, *C. xanthorrhoeae*, *C. asianum* e *C. fructicola*) di cui era nota la sequenza dei geni ITS in isolati di riferimento (Hyde *et al.*, 2009). L'esistenza di numerose specie chiamate con nomi diversi, ma nella sostanza molto vicine da un punto di vista filogenetico è ampiamente supportato dalla letteratura. Photita *et al.* (2005) ha distinto *C. gloeosporioides s.l.* in cinque morfo-gruppi costituiti da *C. musae* e *C. truncatum* (identificate come specie separate) e da 3 gruppi distinti di cui uno costituito da *C. fragariae* e *C. kahawae* (primo gruppo) e uno costituito da *C. boninense* (Moriwaki *et al.*, 2003). *Colletotrichum musae* è stata considerata specie a se stante in funzione dei caratteri morfologici, ma la sua differenziazione da *C. gloeosporioides* non è universalmente accettata (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Cannon *et al.*, 2008). Anche *Colletotrichum fragariae*, agente responsabile dell'antracosi della fragola, è comunemente considerata specie a se stante, ma risulta essere filogeneticamente molto vicina a *C. gloeosporioides*, presentando un'ampia distribuzione di ospiti che suggeriscono la necessità di ulteriori approfondimenti (Cannon *et al.*, 2008; Hyde *et al.*, 2009). *C. kahawae*, precedente noto come *C. coffeanum* (agente dell'antracosi del caffè), è strettamente collegato a *C. gloeosporioides s. s.* tanto che è stato ipotizzato che si tratti di una popolazione clonale (Cannon *et al.*, 2008; Hyde *et al.*, 2009) anche se recentemente è stata confermata come specie distinta sulla base di un approccio multigenico (Bridge *et al.* 2008; Prihastuti *et al.*, 2009). Numerose altre specie sono state formalmente descritte e separate nel complesso *C. gloeosporioides s.l.* tra cui *C. asianum*, *C. siamense*, *C. fructicola* e *C. cordylinicola* (Prihastuti *et al.* 2009), ma ulteriori studi dovranno essere affrontati per definire la corretta collocazione di queste e altre specie tra cui *C. horii*, *C. nymphaeae*, *C. nupharicola*, *C. xanthorrhoeae*, *C. gossypi* e *C. hymenocallidis* (Cannon *et al.*, 2008; Hyde *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2011).

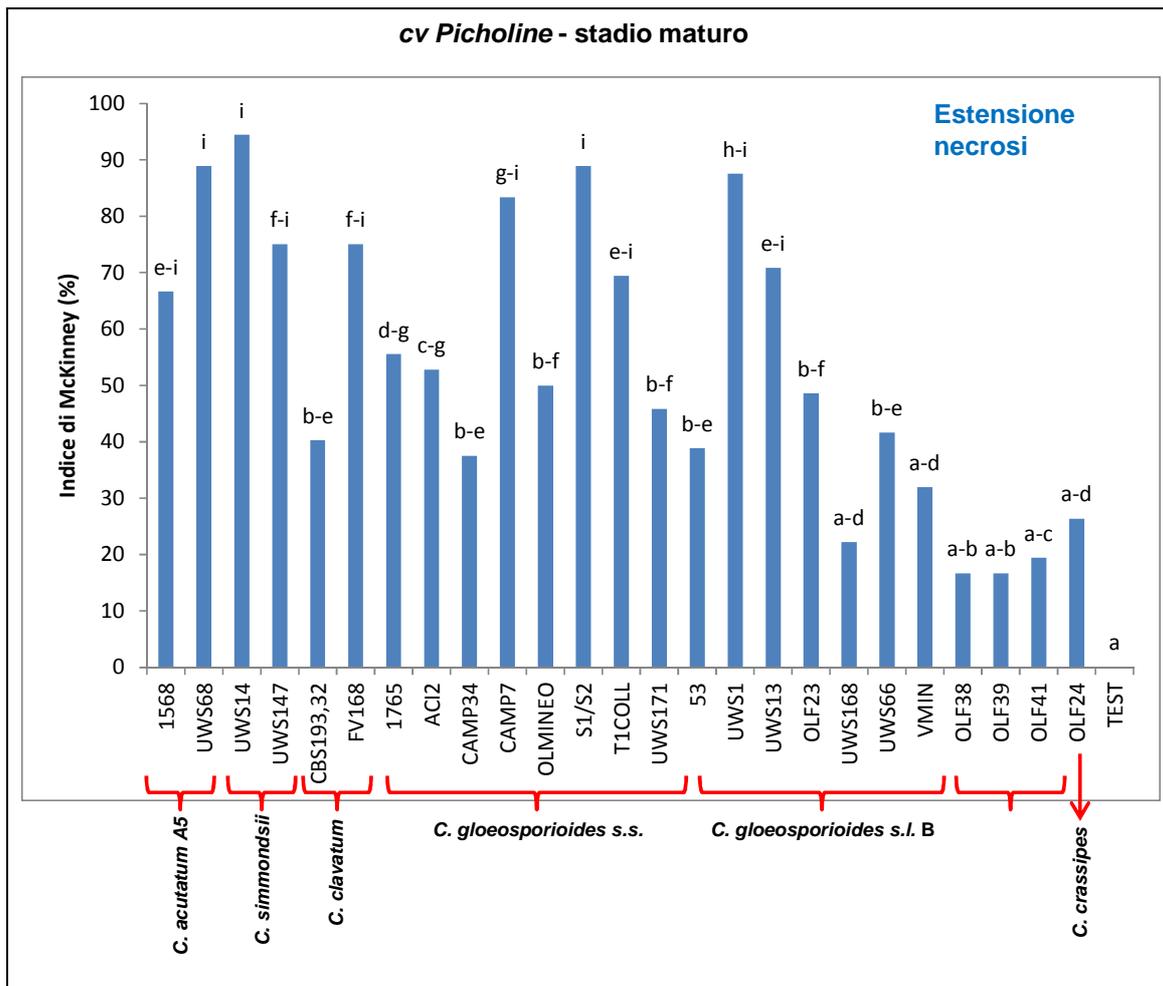


Fig. 5. Estensione delle necrosi su olive inoculate con isolati di *Colletotrichum* spp. nella fase fenologica “olive mature”.

Tenuto conto della complessità tassonomica esposta in precedenza, solo per alcuni isolati ottenuti da olivo e rientranti nel gruppo di *C. gloeosporioides* s. l. B è stato possibile ottenere informazioni realistiche sulla loro identità a livello di specie (UWS178=*C. fruticola*; UWS1=*C. fragariae*; Isolate53=*C. kahawae*) poiché accomunati da sequenze ITS identiche a quelle degli isolati di riferimento. Per altri isolati (Isolate 53, UWS168, UWS66, UWS13, OLF23, VMIN) questo non è stato possibile. In ogni caso, chi scrive è pienamente consapevole che l’identificazione di una specie non possa essere basata esclusivamente sulla comparazione di sequenze geniche e che ulteriori approfondimenti sono necessari per tutti gli isolati.

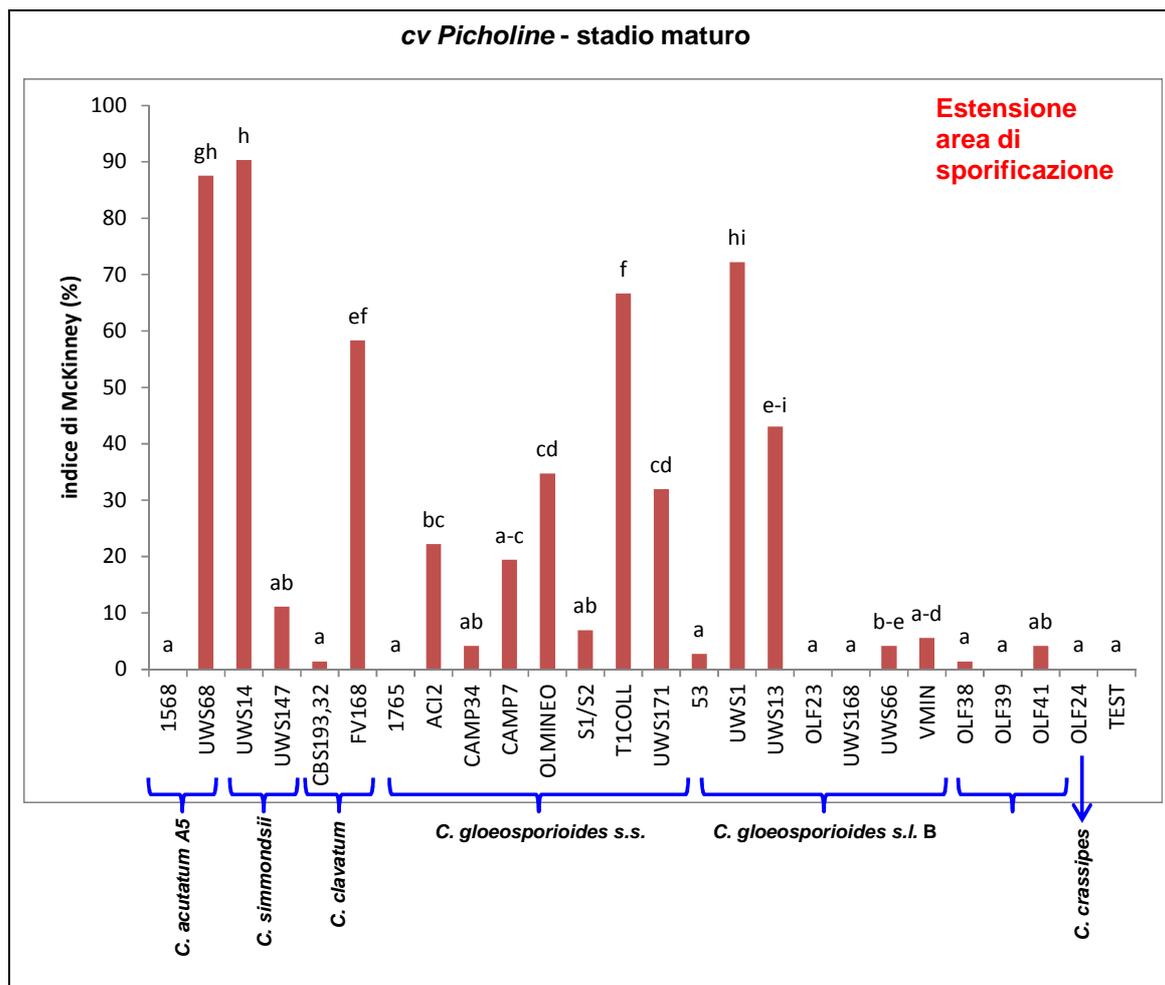


Fig. 6. Estensione della superficie ricoperta da spore su olive inoculate con isolati di *Colletotrichum* spp. nella fase fenologica “olive mature”.

Nel complesso, gli isolati del gruppo *C. gloeosporioides* s.l. B sono apparsi poco virulenti su olive inoculate in fase fenologica verde con la sola eccezione di un isolato ottenuto in Australia (UWS1) che ha rapidamente colonizzato i tessuti delle olive inoculare, producendo anche un’abbondantissima sporificazione (Fig. 3, 4). Considerato che l’isolato UWS1 ha mostrato una sequenza ITS identica a quella dell’isolato di riferimento di *C. fragariae* (ICMP17814) sarebbe di estremo interesse valutare la virulenza su olive di altri isolati di questa specie ottenuti da fragole con antracnosi. Su olive di colore nere l’isolato UWS1 ha confermato un elevato livello di virulenza essendo in assoluto uno degli isolati con valori di Indice di McKinney più alti, sia per quanto concerne l’estensione dei marciume che l’attitudine a produrre spore (Fig. 5, 6).

Su olive mature tuttavia, anche l'isolato UWS13 ha mostrato elevati livelli di virulenza sia in termini di estensioni delle lesioni che di sporificazione, mentre tutti gli altri sono risultati meno aggressivi, pur confermando di essere agenti di antracnosi dell'olivo.

Nel caso di questo gruppo di isolati (*C. gloeosporioides* s. l. B) l'elevata variabilità riscontrata in termini di virulenza e di attitudine sporigena sembra essere di semplice spiegazione poiché, come ampiamente discusso, si tratta di un gruppo estremamente eterogeneo, in cui rientrano numerosi *taxa* comunemente accettati come specie a se stanti dalla comunità scientifica internazionale. Ciò non toglie che l'identificazione e la caratterizzazione di questi agenti fitopatogeni sia di estrema importanza proprio perché, essendo differenti da un punto di vista genetico oltre ad essere caratterizzati da differenti virulenza e attitudine sporigena, potrebbero essere caratterizzati da differenti caratteristiche biologiche, epidemiologiche, ecologiche oltre che di sensibilità ad eventuali sostanze chimiche da utilizzare nella lotta all'antracnosi.

L'ultimo gruppo di isolati identificato nel presente lavoro è geneticamente molto uniforme e corrisponde a *C. gloeosporioides* s. s.. Questo gruppo comprende isolati da olivo, ma anche numerosi isolati da agrumi, oltre che singoli isolati da ciliegio, pistacchio e annona. L'identità degli isolati di questo gruppo appare chiara poiché tutti gli isolati hanno mostrato una sequenza ITS1-5.8s-ITS2 identica a quella degli isolati di riferimento STE-U4295 e IMI35678 (Hyde et al., 2009). In particolare l'isolato

IMI371022, originariamente identificato come *V. gloeosporioides* Penz. (Penzing, 1882), viene considerato dalla comunità scientifica come epitipo designato per questa specie (Cannon *et al.*, 2008). Inoltre, tutti gli isolati analizzati hanno mostrato una sequenza identica del gene della β -*tubulina* 2, nonostante quest'ultimo gene sia noto per essere molto variabile, anche a livello intraspecifico. A supporto dell'identità degli isolati di *C. gloeosporioides* s. s. vi sono anche le caratteristiche morfologiche delle colture fungine.

A dispetto dell'elevata uniformità genetica riscontrata nel gruppo degli isolati di *C. gloeosporioides* s. s., la caratterizzazione biologica ha rilevato una notevole variabilità in termini di livello di virulenza, capacità di produrre spore e tipo di sintomo su olive inoculate artificialmente (Fig.3, 4, 5, 6, 7-D). Su olive verdi, 5 degli isolati analizzati (1765, ACI2, CAMP7, CAMP 34, OLMINEO) hanno evidenziato un livello di patogenicità medio basso in termini di estensione della lesione, con differenze

statisticamente non significative tra di loro. Inoltre, solo l'isolato OLMINEO ha evidenziato una discreta capacità di produrre spore sulle olive infette, mentre sulle olive inoculate con gli altri isolati non è stata rilevata un'apprezzabile sporificazione (Fig. 4). Gli altri tre isolati del gruppo *C. gloeosporioides s. s.* hanno mostrato elevati livelli di virulenza comparabili con quelli degli isolati più virulenti del complesso *C. acutatum s. l.* utilizzati nel presente lavoro, come confronto positivo. In particolare, gli isolati S1/S2 e T1COLL sono risultati molto virulenti, ma con un quadro sintomatologico molto differente, evidenziato soprattutto dalla completa assenza di sporificazione nel primo caso e da un discreto livello di scorificazione nel secondo (Fig. 3, 4, 7-D). Un livello intermedio di virulenza è stato riscontrato per l'isolato UWS171 che di contro, ha mostrato una buona attitudine sporigena. I dati sulla virulenza riscontrati su olive verdi sono stati in gran misura confermati anche su olive nere, sebbene la maggiore sensibilità dei frutti abbia reso le differenze tra gli isolati meno evidenti (Fig.5, 6). Su olive mature, inoltre, tutti gli isolati di questo gruppo con la sola eccezione dell'isolato 1765 hanno evidenziato una certa attitudine sporigena, sebbene gli isolati che hanno sporificato anche su olive verdi (OLMINEO, T1COLL e UWS171) abbiano sporificato in misura nettamente maggiore.

Non è semplice formulare delle ipotesi per spiegare l'elevata variabilità biologica riscontrata nel gruppo degli isolati di *C. gloeosporioides s. s.* analizzati nel presente lavoro. Il quadro si complica ulteriormente tenendo conto che nelle analisi sono stati introdotti due isolati ottenuti da agrumi (1765 e T1COLL) che hanno mostrato un differente comportamento sia in termini di estensione dei marciumi che di attitudine sporigena. Sembrerebbe tuttavia che gli isolati di *C. gloeosporioides* ottenuti da olivo o da agrumi, non siano specifici dell'ospite di provenienza e che possano passare da un'ospite all'altro. Questo dato non stupisce considerando che in Italia, ed in particolare in Sicilia, agrumi e olivo vengono spesso consociati anche perché l'olivo viene spesso usato per la costituzione di frangiventi a protezione degli agrumeti.

I risultati delle analisi molecolari condotte nel presente lavoro confermano quanto già ampiamente riportato in letteratura. L'analisi dei geni ITS rappresenta un perfetto punto di partenza per stabilire le relazioni filogenetiche nell'ambito di funghi fitopatogeni e quindi anche di *Colletotrichum* spp. tenuto conto che è il gene largamente più utilizzato dalla comunità scientifica internazionale, della semplicità con cui può

essere amplificato e sequenziato e del fatto che questo gene tende ad essere conservato a livello di specie, ma variabile tra specie affini. Lo stesso può essere affermato per il gene della β -tubulina 2, anche se aumentano le difficoltà di sequenziamento ed il più elevato livello di variabilità può essere un'arma a doppio taglio. Ciò nonostante, tenuto conto della complessità del genere *Colletotrichum* appare evidente che questi geni da soli non possono fornire risultati definitivi e risolutivi. Quanto detto viene fortemente aggravato dalla erronea nomenclatura di molte specie/isolati per cui sono stati, negli anni, depositate sequenze in GenBank, ma anche dall'esistenza di due differenti strutture secondarie all'interno della regione ITS1 (Bridge *et al.*, 2008b). Come dimostrato in un recente studio, le sequenze delle regioni ITS depositate in GenBank come *C. gloeosporioides* e *G. cingulata* risultano molto vicine a quelle di altre specie rientranti nel complesso *C. gloeosporioides* s. l. (*C. horii*, *C. hymenocallidis*, *C. xathorrhoeae*, *C. asianum* e *C. fructicola*), ma anche di specie che dovrebbero differenziarsi maggiormente (*C. boninense*, *C. truncatum*, *C. lindemuthianum*) (Hyde *et al.*, 2010). Cai *et al.* (2009) analizzando circa 300 sequenze depositate in GenBank come *C. gloeosporioides*, hanno evidenziato un'elevata divergenza filogenetica (86%) rispetto all'epitipo designato da Cannon *et al.* (2008), molto probabilmente poiché sono state depositate con questo nome sequenze di altre specie di *Colletotrichum*. Un approccio corretto dovrebbe basarsi sullo studio di ceppi ben definiti mediante caratterizzazione di molteplici geni dotati di differenti livelli di variabilità e con il supporto di caratteri morfologici e colturali (Cai *et al.*, 2009). Nel corso del presente lavoro sono stati amplificati e sequenziati anche altri geni nucleari e mitocondriali (Cfr. Capitolo II, par. 2.3.2.-3.), ma i risultati che pur confermavano quanto esposto in precedenza, non sono stati riportati poiché riguardavano solo un numero limitato di isolati.

I dati ottenuti evidenziano che contrariamente a quanto comunemente riportato in letteratura, ed in particolare in Spagna, gli isolati agenti responsabili dell'antracnosi dell'olivo, indicati genericamente come *C. gloeosporioides*, non possano essere considerati solo deboli patogeni marginali con comportamento saprofitario che si sviluppino solo su frutti molto maturi (Martin e García-Figueres, 1999; Moral *et al.*, 2008; Moral e Traperò, 2009). Sebbene alcuni isolati o gruppi di isolati affini, siano effettivamente deboli patogeni, numerosi altri sono caratterizzati da elevati livelli di

virulenza sia su olive verdi che mature analogamente ai ceppi di *C. acutatum* A5, *C. clavatum* e *C. simmondsii* utilizzati come elementi di riferimento. Da queste osservazioni vale la pena escludere il ceppo CBS193.32 di *C. clavatum* che, essendo in coltura da quasi 100 anni, ha molto probabilmente subito un fenomeno di attenuazione della virulenza. È verosimile che le popolazioni di *Colletotrichum* spp. non rientranti nel complesso *C. acutatum* s.l. diffuse in Spagna, o più semplicemente gli isolati saggiati, siano caratterizzati da una debole patogenicità. I dati del presente lavoro sono in accordo con quanto riportato in Portogallo dove è stata evidenziata una netta prevalenza di *C. acutatum* (97%), ma gli isolati di *C. gloeosporioides* hanno mostrato una virulenza simile alle quella di isolati *C. acutatum* s.l. (Talhinhas *et al.*, 2005; Talhinhas *et al.*, 2009). Non esistono dati approfonditi circa l'identità delle popolazioni prevalenti in Tunisia, ma recentemente *C. gloeosporioides* è stato segnalato come agente causale di antracnosi sulle cv *Meski*, *Manzanilla* e *Picholine* (Rhouma *et al.*, 2010). Per quanto riguarda l'Italia, prima del presente lavoro non erano disponibili dati sulla virulenza di isolati genericamente identificati come *C. gloeosporioides*, ma era stato più volte riportato che questi erano nettamente minoritari come frequenza di isolamento rispetto a *C. clavatum*, che rappresenta il principale agente causale dell'antracnosi (Agosteo *et al.*, 2002; Scarito *et al.* 2003; Faedda *et al.*, 2011). Solo in Australia, le popolazioni di *C. gloeosporioides* sembrerebbero essere ampiamente diffuse sebbene al momento non siano disponibili dati supportati da elevato rigore scientifico (Sergeeva, comunicazione personale).



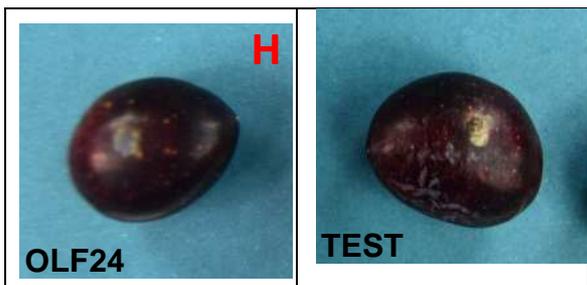


Fig. 7 Olive inoculate con i differenti isolati utilizzati nei saggi di patogenicità nella fase fenologica verde, in corrispondenza del terzo rilievo (R3). Le lettere in corrispondenza di ciascuna foto si riferiscono alla specie/gruppo di appartenenza di ciascun isolato: A – *C. simmondsii*; B - *C. acutatum* gruppo A5; C - *C. clavatum*; D - *C. gloeosporioides s.s.*; E - *C. gloeosporioides s.l.* B; F - *C. gloeosporioides s.l.* A; G - *Colletotrichum crassipes*.

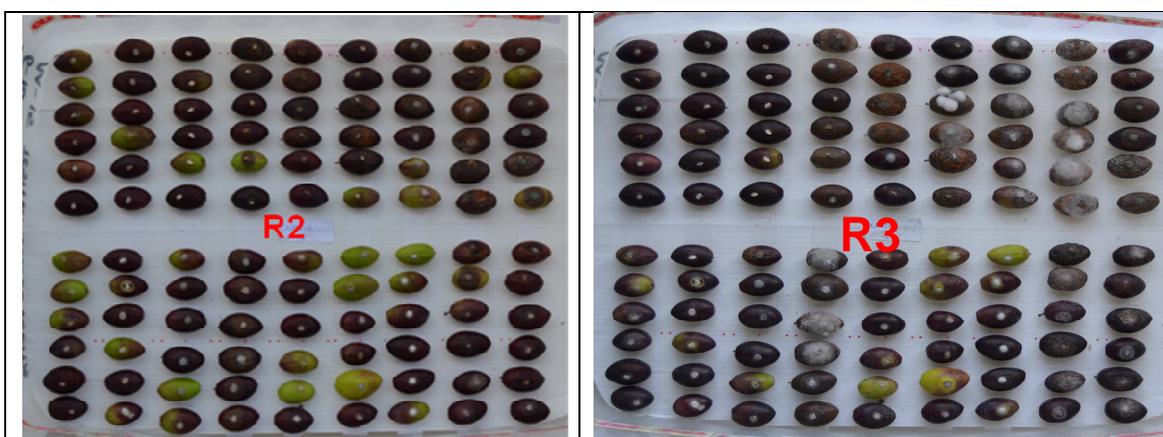


Fig. 8. Visione complessiva delle olive sottoposte ai saggi di patogenicità nella fase fenologica verde in corrispondenza del secondo (R2) e del terzo (R3) rilievo.

I dati in nostro possesso non permettono di formulare ipotesi accurate sul perché di una bassa frequenza di popolazione negli isolati genericamente identificati come *C. gloeosporioides*, sebbene alcuni di essi siano dotati di elevati livelli di virulenza. Per alcuni isolati una possibile spiegazione potrebbe essere la bassa attitudine sporigena, ma come dimostrato nel presente lavoro altri isolati producono abbondantissime, sporificazioni sia su olive verdi che mature. Molto, per non dire quasi tutto, resta da studiare e comprendere sulla biologia e l'ecologia di questi agenti di lebbra. Il tutto viene ulteriormente complicato dalla constatazione che alcuni isolati ottenuti da altri ospiti (ad es. T1COLL e 1765) possono causare antracnosi nell'olivo.

In conclusione, nonostante le difficoltà legate allo studio di un genere complesso quale *Colletotrichum* spp., le analisi dei geni ITS e β -*tubulina* in associazione con la determinazione della virulenza su olive artificialmente inoculate, hanno fornito una

chiara informazione sull'estrema complessità eziologica degli organismi responsabili dell'antracnosi dell'olivo non riconducibili a *C. acutatum* s.l. In passato questi agenti patogeni sono stati erroneamente accomunati e semplicisticamente considerati "*C. gloeosporioides*". Il presente lavoro dimostra chiaramente la non sostenibilità scientifica di questa tendenza e rappresenta uno spartiacque per le future ricerche.

Bibliografia

Agosteo G.E., G. Magnano di San Lio, S.O. Cacciola and S. Frisullo, 2002. Characterisation of the causal agent of olive anthracnose in southern Italy. *Acta Horticulturae* 586, 713–716.

Basic Local Alignment Search Tool –(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

Bridge, P.D., Waller, J.M., Davies, D. and Buddie, A.G. 2008a. Variability of *Colletotrichum kahawae* in relation to other *Colletotrichum* species from tropical perennial crops and the development of diagnostic techniques. *Journal of Phytopathology* 156: 274-280.

Bridge, P.D., Cannon, P.F., Buddie, A.G., Baker, M., Borman, A.M., 2008 b. Domain II hairpin structure in ITS1 sequences as an aid in differentiating recently evolved animal and plant pathogenic fungi. *Mycopathologia* **166**: 1-16.

Bryson, R.J, Caten, C.e., Hollomon, D.W., Bailey, J.A. , 1992. In: Bailey J.A, Jeger M.J. (eds). *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control, pp. 1-26. CAB International, Wallingford, UK.

Cacciola, S.O., Faedda, R., Agosteo G.E., 2011. Anthracnose. Olive Diseases and Disorders, ISBN: 978-81-7895-539-1

Cacciola S.O., Agosteo G.E., Faedda R., Frisullo S., Magnano di San Lio G., 2007, Characterization of *Colletotrichum* species causing olive anthracnose in Italy. *IOBC/WPRS Bulletin* **30**: 229.

Cacciola S.O., Agosteo G.E., Pane A., Magnano di San Lio G., 1996. Osservazioni sull'epidemiologia dell'antracnosi dell'olivo in Calabria. *Informatore Fitopatologico* **46 (6)**: 27-32.

Cai, L., Giraud T., Zhang, N., Begerow, D., Cai, G., Shivas, R.G., 2011. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. *Fungal Diversity, Review*, 011-0127-8

Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B., Waller J, Abang, M.M., Zhang, J.Z., Yang, Y.L., Phoulivong, S., Liu, Z.Y., Prihastuti, H., Shivas, R.G., McKenzie, E.H.C., Johnston, P.R., 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers* 39:183–204

Cannon, P.F., Bridge, P.D., Monte, E. 2000. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host Pathogen Interaction* (eds. D. Prusky, S. Freeman and M.B. (Dickman). APS Press, St. Paul, Minnesota, USA: 1-20.

Cannon, P.F., Buddie, A.G., Bridge, P.D. 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon* 104: 189-204.

Faedda R., Agosteo G.E., Schena L., Mosca S., Frisullo S., Magnano di San Lio G., Cacciola S.O., 2011. *Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the causal agent of olive anthracnose in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* **50**: 283-302.

Freeman S., Katan T., Shabi E., 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* **82**:596-605.

Freeman, S., Katan, T., Shabi, E., 1996 Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates from Avocado and Almond Fruits with Molecular and Pathogenicity Tests. *applied and environmental microbiology*, p. 1014–1020

García-Figueres F., Pedret Tena E., Marco Sanz V., Duatis Monllaó J.J., 1997. Sensibilidad de diversas variedades de olivo al hongo "*Colletotrichum gloeosporioides*". *Fruticultura Profesional* **88**: 60-63.

Glass, N.L., 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**:1323-1330.

González, E., Sutton, T.B. Correll, J.C. (2006). Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. *Phytopathology* **96**: 982-992.

Graniti A., Frisullo S., Pennisi A.M., Magnano di San Lio G., 1993. Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **23**: 457-465.

Guerber J.C., Liu B., Correll J.C., Johnston P.R., 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* **95**:872-895.

<http://www.fungalbarcoding.org>

Hyde, K.D., Chomnunti ,P., Crous , P.W ., Groenewald, J.Z., Damm, U. Ko Ko., T.W., Shivas, R.G., Summerell, B.A., Tan, Y.P., 2010. A case for re-inventory of Australia's plant pathogens.. Plant pathogens in Australia. *Persoonia* **25**, 50–60

Hyde K.D., Cai L., Cannon P.F., Crouch J.A., Crous P.W., Damm U., Goodwin P.H., Chen H., Johnston P.R., Jones E.B.G., Liu Z.Y., McKenzie E.H.C., Moriwaki J., Noireung P., Pennycook S.R., Pfenning L.H., Prihastuti H., Sato T., Shivas R.G., Taylor P.W.J., Tan Y.P., Weir B.S., Yang Y.L., Zhang J.Z. 2009 a . *Colletotrichum* names in current use. *Fungal Diversity* **39**: 147-183.

Hyde K.D., Cai L., McKenzie E.H.C., Yang Y.L., Zhang J.Z., Prihastuti H. 2009 b. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* **39**: 1-17.

Johnston, P. R., and Jones, D. 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* **89**:420-430.

Lardner R., Johnston P.R., Plummer K.M., Pearson M.N., 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum sensu lato*. *Mycological Research* **103**: 275-285.

Liu, B., Wasilwa, L.A., Morelock, T.E., O'Neill, N.R. and Correll, J.C. 2007. Comparison of *Colletotrichum orbiculare* and several allied *Colletotrichum* spp. for mtDNA RFLPs, intron RFLP and sequence variation, vegetative compatibility and host specificity. *Phytopathology*, **97**: 1305-1314.

Lubbe, C.M, Denman, S., Cannon, P.F., Groenewald, J.Z., Lamprecht, S.C., Crous, P. W., 2004. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of *Proteaceae*. *Mycologia*, **96**(6), pp. 1268–1279

Martelli G.P., 1960. Primo contributo alla conoscenza della biologia di *Gloeosporium olivarum* Alm. *Phytopathologia Mediterranea* **1**: 31–43.

Martelli, G.P .1959. La lebbra delle olive. Presenza e diffusione in Calabria. *Italia agricola* **96**:905-914

Martín M.P., García-Figueres F., 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 733-741.

Martín, M.P., García-Figueres F., Trapero A. 2002. Iniciadores específicos para detectar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de los olivos. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **28**: 43-50.

Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D., Freeman, S., 2006. Identification and Characterization of Benomyl-Resistant and Sensitive Populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from Statice (*Limonium* spp.) The *American Phytopathological Society*. 10.1094 / PHYTO-96-0542

McKinney, H. H., 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection on wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, **26**(5): 195–217.

Moral J., Bouhmidi K., Trapero A., 2008. Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* **92**: 1421-1426.

Moral, J., Oliveira, R., Tello, J.C., Trapero, A., 2007 Caracterización fisiológica y patogénica de cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. Causantes de la antracnosis del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*

Moriwaki, J., Sato, T., Tsukiboshi, T., 2003. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience*. **44**:47–53.

Nakaune, R., Nakano, M., 2007. Benomyl resistance of *Colletotrichum acutatum* is caused by enhanced expression of b-tubulin 1 gene regulated by putative leucine zipper protein CaBEN1. *Fungal Genetics and Biology* **44** 1324–1335

Nguyen, T. H. P., Vinnere Petterson, O., Olsson, P., Liljeroth, E., 2010. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. *European J Plant Pathol* **127**:73–87

Peres N.A., Timmer L.W., Adaskaveg J.E., Correll J.C., 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* **89**: 784-796.

Peres, N.A.R., Souza, N.L., Peever, T.L., Timmer, L.W., 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Dis.* **88**: 125–130.

Photita, W., Taylor, P.W.J., Ford, R., Hyde, K.D. , Lumyong, S., 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity* **18**: 117-133

Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., Hyde, K.D, 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* **44**, 33–43.

Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., Hyde, K.D., 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. *Fungal Divers* **39**:89–109

Prusky D., McEvoy J.L., Leverentz B., Conway W.S. 2001. Host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Molecular Plant Microbe Interactions* **14**: 1105-1113.

Rhouma A., Triki M.A., Msallem M., 2010. First report of olive anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea* **49**: 95-98.

Scarito, G., Pane, A., Raudino, F., Frisullo, S., Cacciola, S.O. 2003, *Colletotrichum gloeosporioides* causal agent of olive rot in Sicily, *J. Plant Pathol.*, **84**, 310.

Schena L., Cooke, D.E.L, 2006. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a “molecular tool box” for the detection and characterization of *Phytophthora* species. *Journal of Microbiological Methods* **67**, 70–85.

Sherriff, C., Whelan, M.J., Arnold, G.M., Lafay, J.F., Brygoo, Y. and Bailey, J.A. 1994. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology* **18**: 121-138.

Shivas R.G., Tan Y.P., 2009. A taxonomic re-assessment of *C. acutatum* introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. *Fungal Diversity* **39**: 111-122.

Sreenivasaprasad S., Talhinhos P., 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular Plant Pathology* **6**: 361-378.

Sreenivasaprasad, S., Mills, P.R., Meehan, B.M., Brown, A.E., 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome* **39**: 499-512.

Sutton B.C., 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey J.A, Jeger M.J. (eds). *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control, pp. 1-26. CAB International, Wallingford, UK.

Talhinhos P., Mota-Capitão, Martins S., Ramos A.P., Neves-Martins J., Guerra-Guimarães L., Várzea V., Silva M.C., Sreenivasaprasad S., Oliveira H., 2011. Epidemiology, histopathology, and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathology* **60**: 483-495.

Talhinhos P., Neves-Martins J., Oliveira H., Sreenivasaprasad S. 2009. The distinctive population structure of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose in the Algarve region of Portugal reflects a host-pathogen diversity hot spot. *FEMS Microbiology Letters* **296**: 31-38.

Talhinhos P., Sreenivasaprasad S., Neves-Martin J., Oliveira H., 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal the association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2987-2998.

Templeton, G.E., 1992. Use of colletotrichum strain as mycorrhizal biocontrol agents. In: Bailey J.A, Jeger M.J. (eds). *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control, pp. 1-26. CAB International, Wallingford, UK....

Weir, B.S., Johnston, P.R., 2010 Characterization and neotypification of *Gloeosporium kaki* Hori as *Colletotrichum horii* nom. nov. . *Mycotaxon* **111**, 209-219

White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: PCR Protocols. A guide to methods and applications". (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, eds.), Academic Press, San Diego, USA: 315-320.

Yang, Y.L., Hyde, K.D., Liu, Z.Y., Cai, L., Yu, Z.N., 2010. *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*. *Fungal Divers.*, In press

INDICE

CAPITOLO I

1. Introduzione	2
1.1. Il genere <i>Colletotrichum</i> spp.	3
1.2. Classificazione tassonomica	4
1.2.1. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	4
1.2.2. <i>Colletotrichum acutatum</i>	5
2. Antracnosi dell'olivo	7
2.1 Sintomi	9
2.2. Agente causale dell'antracnosi dell'olivo	12
2.3. Ciclo della malattia	16
2.3. Lotta	21
3. Metodi per l'identificazione di funghi appartenenti al genere <i>Colletotrichum</i> spp.	24
3.1 Metodi tradizionali	25
3.1.1. Caratteri morfologici	25
3.1.2. Caratteri colturali	26
3.1.2.1. Sensibilità al benomyl	26
3.1.2.2. Compatibilità vegetativa	27
3.1.2.3. Test di patogenicità	28
3.2. Metodi molecolari	28
3.2.1. <i>Random amplified polymorphic DNA (RAPD)</i>	29
3.2.2. <i>Restriction fragment length polymorphism (RFLP)</i>	30
3.2.3. <i>Amplified fragment length polymorphism (AFLP)</i>	31

3.2.4. <i>Simple sequence repeat</i> (SSR) o microsatelliti	32
3.3 Analisi di sequenze geniche	33
3.3.1. Regioni ITS dell'rDNA	33
3.3.2. β -tubulina	34
3.3.3. Gene GS (<i>glutamina sintetasi</i>)	35
3.3.4. Gene GPDH (<i>gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi</i>)	36
3.3.5. mtDNA mitocondriale	36
3.3.6. Fungal barcode.....	37
4. Scopo della tesi.....	39
Bibliografia.....	41
CAPITOLO II	
2. Caratterizzazione biologico-molecolare di isolati di <i>Colletotrichum acutatum</i> <i>sensu lato</i> , agenti dell'antracnosi dell'olivo.....	53
2.1. Introduzione	53
2.2. Materiali e metodi.....	56
2.2.1. Isolati fungini	56
2.3. Caratterizzazione molecolare	61
2.3.1. Estrazione di DNA da micelio.....	61
2.3.2. Amplificazione dei geni nucleari di interesse	62
2.3.3. Amplificazione mtDNA mitocondriale	63
2.3.4. Sequenziamento delle regioni geniche di interesse	64
2.4. Caratterizzazione biologica.	67
2.4.1. Saggi di patogenicità su drupe di olivo	67
2.5. Caratterizzazione morfologica	69
2.5.1. Rilievo morfologico dei conidi	69
2.6. Caratterizzazione fisiologica.....	70

2.6.1. Saggi di sensibilità al <i>benomyl</i>	70
2.7. Risultati e discussioni	71
2.7.1. Analisi filogenetiche.....	71
2.7.2. Caratterizzazione biologica.....	80
2.7.2.1. Saggio di patogenicità su drupe	80
2.7.3 . Caratterizzazione morfologica	85
2.7.3.1. Rilievo morfologico dei conidi.....	85
2.7.4. Saggi di sensibilità al <i>benomyl</i>	89
2.8. Conclusioni.....	92
Bibliografia.....	94
CAPITOLO III	
3.1. Caratterizzazione biologico-molecolare di isolati di <i>Colletotrichum gloeosporioides s.l.</i> , agenti dell'antracnosi dell'olivo	103
3.1. Introduzione	104
3.2.. Materiali e metodi.....	109
3.2. 1 Isolati fungini	109
3.3. Caratterizzazione molecolare	109
3.3.1. Estrazione di DNA da micelio.....	109
3.3.2 Amplificazione dei geni nucleari di interesse	110
3.3.3. Sequenziamento delle regioni geniche di interesse	112
3.4. Caratterizzazione biologica	115
3.4.1. Saggi di patogenicità su drupe di olivo	115
4. Risultati e Discussione	118
Bibliografia	133