



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie Agrarie
Ciclo XXIV

Coordinatore: prof. Mauro Spanghero

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**Biodiversità degli endofiti fungini della vite e
sviluppo di un metodo molecolare per il loro
fingerprinting in piante sane, infette e recovered da
Legno nero (LN).**

DOTTORANDO
Dott. Simone Grisan

SUPERVISORE
Dott.ssa. Marta Martini

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

1. PREMESSA	10
2. ENDOFITI	10
2.1 Funghi endofiti, classificazione e aspetti tassonomici	11
2.2 Endofiti clavicipitacei C-Endophytes	11
2.3 Endofiti non clavicipitacei	14
2.3.1 Endofiti non clavicipitacei Classe 3	16
2.3.2 Endofiti classe 4	17
2.4 Ruoli ecologici (in agro ecosistemi)	18
3. APPROCCI ALL'IDENTIFICAZIONE E ALLO STUDIO DELLE COMUNITÀ ENDOFITICHE FUNGINE	22
3.1 Approcci dipendenti dalla coltivazione	23
3.1.1 Isolamento micologico classico	23
3.1.2 Metodi molecolari applicati all'identificazione dei taxa fungini coltivabili.	24
3.2 Approcci indipendenti dalla coltivazione.	28
3.3 Tecniche di fingerprinting	31
3.3.1 LH-PCR	31
3.3.2 T-RFLP	32
3.3.3 Single-strand conformational polymorphism (SSCP).	33
3.3.4 DGGE – TGGE	33
3.4 Approccio integrato	37
4. VITIS VINIFERA	38
4.1 Biologia	38
4.2 Areale di distribuzione	38
4.3 Importanza economica	39
4.4 Principali avversità	39

4.5	Fitoplasmi	40
4.5.1	Fitoplasmi della vite	42
4.5.2	Metodi di diagnosi dei fitoplasmi della vite	45
4.6	Il fenomeno del “recovery	48
4.7	Endofiti della vite	49
5.	SCOPO DELLA TESI	51
6.	STUDIO DELLA BIODIVERSITÀ DEGLI ENDOFITI FUNGINI DELLA VITE	53
6.1	Campionamento in vigneti a conduzioni biologica del Friuli Venezia Giulia.	53
6.2	Sterilizzazione del materiale vegetale campionato	53
6.3	Approccio dipendente dalla coltivazione	54
6.3.1	Isolamento	54
6.3.2	Identificazione micologica degli isolati	55
6.3.3	Estrazione del DNA totale dagli isolati fungini.	56
6.3.4	Amplificazione mediante PCR della regione ITS degli isolati endofitici fungini.	58
6.4	Approccio indipendente dalla coltivazione	59
6.4.1	Estrazione DNA genomico totale da piante. (<i>Vitis vinifera L.</i>)	59
6.4.2	Scelta dei primers selettivi per il DNA fungino ed escludenti il DNA della pianta.	61
6.4.3	Amplificazione e clonaggio della regione ITS di specie fungine presenti in materiale vegetale	63
6.5	Analisi RFLP dei prodotti di PCR delle regioni ITS ottenute dai due approcci dipendente e indipendente dalla coltivazione ottenute e generazione di OTU's.	67
6.6	Sequenziamento delle regioni ITS ottenute da isolamento micologico classico (approccio dipendente da coltivazione), clonaggio molecolare (approccio indipendente da coltivazione) e analisi BLAST delle sequenze.	68
6.7	Analisi filogenetica sulla base della regione ITS degli endofiti fungini ottenuti dai due approcci, dipendente e indipendente dalla coltivazione.	69
7.	SVILUPPO DI UN METODO MOLECOLARE PER IL FINGERPRINTING DELLA COMUNITÀ ENDOFITICA FUNGINA DI VITI SANE INFETTE O RECOVERED DA LEGNO NERO (LN)	72
7.1	Messa a punto protocollo DGGE	73

Indice

7.1.1	Scelta dei primers e delle condizioni di PCR.	73
7.1.2	Analisi PCR con i primers ITS1F-GC/ITS2 su DNA di endofiti fungini ottenuti mediante i due approcci dipendente ed indipendente dalla coltivazione.	75
7.1.3	DGGE	76
7.2	Prove preliminari di Fingerprinting delle comunità endofitiche fungine in viti sane, infette o recovered da Legno nero (LN)	78
7.2.1	Campionamento di viti sane, infette e recovered da fitoplasmi del Legno nero per fingerprinting della comunità endofitica fungina associata.	78
7.2.2	Estrazione del DNA Genomico Totale	78
7.2.3	SYBR® Green I real-time PCR per la determinazione della presenza del fitoplasma dello stolbur.	79
7.3	Analisi DGGE delle viti di Lucinico	81
8.	APPROCCIO DIPENDENTE DALLA COLTIVAZIONE	84
8.1	Sterilizzazione del materiale vegetale	84
8.2	Isolamento	84
8.3	Identificazione micologica degli isolati fungini	87
8.3.1	Estrazione del DNA dagli isolati fungini.	87
8.3.2	Amplificazione mediante PCR della regione ITS degli isolati endofitici fungini.	88
8.4	Approccio indipendente dalla coltivazione	88
8.4.1	Scelta dei primers selettivi per il DNA fungino ed escludenti il DNA della pianta.	88
8.4.2	Amplificazione e clonaggio della regione ITS di specie fungine presenti in materiale vegetale	90
8.5	Analisi RFLP dei prodotti di PCR delle regioni ITS ottenute dai due approcci dipendente ed indipendente dalla coltivazione e generazione di OTU'S	90
8.6	Sequenziamento delle regioni ITS ottenute da approccio dipendente ed indipendente dalla coltivazione, clonaggio molecolare e analisi BLAST delle sequenze.	95
8.7	Analisi filogenetica sulla base della regione ITS degli endofiti fungini ottenuti dai due approcci dipendente e indipendente dalla coltivazione.	101
9.	SVILUPPO DI UN METODO MOLECOLARE PER IL FINGERPRINTING DELLA COMUNITÀ ENDOFITICA FUNGINA DI VITI SANE INFETTE E RECOVERED DA LEGNO NERO (LN)	105
9.1	Messa a punto di un protocollo DGGE	105
9.1.1	Scelta dei primers e delle condizioni di PCR	105
	"Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine". Soggetta alle licenze <i>creative commons</i> (http://creativecommons.org/choose/) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte"	

Indice

9.1.2	Analisi PCR con i primers ITS1F-GC/ITS2 SU DNA di endofiti fungini ottenuti mediante i due approcci dipendente ed indipendente dalla coltivazione.	106
9.1.3	DGGE	107
9.2	Prove preliminari di fingerprinting delle comunità endofitiche fungine in viti sane infette o recovered da Legno nero (LN)	109
9.2.1	Conferma dello stato fitosanitario delle piante mediante real-time PCR	109
9.3	Analisi DGGE delle viti campionate a nelle località di Lucinico e Cormons.	112

Abstract

Endophytes were defined by Petrini (1991) as “All organisms inhabiting plant organs that at some time in their life, can colonize internal plant tissues without causing apparent harm to the host”. The ecological role of these organisms is still not well determined but most of them exhibit positive effect to host plants by promoting plant growth, improving resistance to multiple stresses, protection from diseases and insects (Rodriguez *et al.*, 2008). Recently, it has been hypothesized that ‘recovery’, spontaneous remission of symptoms, could be explained through the involvement of S.A.R.(systemic acquired resistance). Endophytic microorganisms are presumed to play an active role in enhancing the host defence response against Phytoplasma infection (Musetti *et al.*, 2011). In the present work we combined culture-dependent and culture-independent methods to estimate the diversity of grapevine fungal endophytic community. We also developed a new fingerprinting molecular tool, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) useful to describe and compare the fungal diversity respectively in healthy, and phytoplasma infected or recovered grapevines. In 2009, healthy grapevine leaf, node and internode tissues were randomly collected from fifteen grapevine plants cvs. Tokai and Merlot, in two organic vineyards in Friuli Venezia Giulia (FVG) region, Italy. All tissues were surface sterilized according to Mostert *et al.* (2000) and a total of 540 small pieces obtained from these grapevine tissues were placed on PDA medium amended with ampicillin (150 µg/ml) and streptomycin (100 µg/ml). All isolates obtained in pure culture were preliminarily grouped as morphospecies, and then sporulating fungi were identified at genus level by morphological characteristics. A DNA-dependent method was applied to all isolates, performing a DNA extraction (Martini *et al.*, 2009) followed by amplification of ITS region of fungal rRNA genes by ITS1F-ITS4 primers (Gardes and Bruns, 1993) and by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis with *Tru1I* and *HpaII* endonucleases. Identical patterns were grouped into operational taxonomic units (OUT's), and one or more, when possible, representative isolate of each OTU was randomly chosen for sequencing of ITS region and BLAST analysis. Shoots of the plants described above were pooled and total genomic DNA was extracted by a CTAB procedure (Martini *et al.*, 2009), ITS region amplified and cloned using pGEM®-T Easy Vectors System (Promega, WI, USA). Six ITS libraries were constructed and 282 clones randomly selected, were grouped in OTUs by RFLP analysis described above. Primers pairs ITS1F-GC and ITS2 (Bougoure and Cairney, 2005) amplifying ITS1

Abstract

region of all representative culturable endophytic isolates were used to generate amplicons suitable for DGGE analysis. PCR products were run on an 8% polyacrylamide gel in a 30-45% urea/formamide denaturant gradient using the DCode system (Bio-Rad, CA, USA). DGGE were carried out at 180 V at 60°C for 6.5 h in 1.25 x TAE buffer.

As result, we obtained a total of 236 fungal isolates, representing 44% of isolation rate. The isolates were grouped by mycological analyses in 21 different morphospecies and identified at genus level. The following DNA-dependent method allowed obtaining 29 OTUs. The culture-independent method consented to discover other 26 OTUs associated to a non culturable fraction of fungal endophytic community. From collected data, it resulted that more than 90% of isolates obtained by the culture-dependent method, belonged to seven main genera. Similarly, the same seven genera, represented the 82% of total OTUs obtained from the culture-independent method. Differences in some of the relative frequencies of main fungal genera could be explained by the higher variability of tissues used for isolations, and by the difficulty in the culture-independent method to extract DNA from fungal endophytes that may be present predominantly by spores within plant tissues. PCR-based DGGE analysis permitted a very good discrimination among the majority of amplicons obtained from different OTU representatives derived from the culture dependent method. Some amplicons have been chosen randomly to constitute two examples of reference markers. In conclusion, different tissues, collected in different localities from different grapevine cultivars grown under organic regime permitted us to obtain a great variability of fungal endophytes. Moreover the use of a synergy of different approaches, culture-dependent and culture-independent, allowed us to increase the determination of diversity of fungal endophytic community. PCR-based DGGE analyses resulted to be a valuable culture-independent approach for the rapid and reliable identification of fungal endophytic species. Further DGGE analyses are in progress with the aim to obtain differences among fungal endophytic communities associated with healthy, recovered and phytoplasma diseased grapevines. This way, it may be possible in the future to discover fungal endophytes as potential biocontrol agents acting like inducers of recovery.

Introduzione

1. Premessa

Il sistema biologico-vegetale connesso con l'agricoltura sta diventando progressivamente più fragile e per questo più difficile da governare. Bastano lievi turbamenti perché esso entri in crisi (Osler, 2011).

Numerosi sono i lavori pubblicati in letteratura dai quali si evince come le piante sia in ecosistemi naturali che in ecosistemi antropici siano colonizzate da comunità microbiche endofitiche (che risultano essere in un equilibrio dinamico all'interno delle piante ospiti. Questi equilibri dinamici sono alterati dai cambiamenti ambientali negli ecosistemi naturali e dai pesanti interventi antropici negli agroecosistemi.

Negli ultimi anni, un numero via via crescente di studi sono stati condotti relativamente ad un fenomeno che potrebbe rivoluzionare le attuali prassi di difesa fitosanitaria, il fenomeno del *recovery*.

Pur non essendo ancora ben determinate le basi fisiologiche di tale fenomeno, è stato ipotizzato che esso possa essere l'espressione di una forma di resistenza acquisita. Da indagini finora effettuate su albicocco, melo e vite, volte a chiarire le interazioni ed i cambiamenti fisiologici presenti nelle piante recovered, è stata evidenziata la possibile, anche se non esclusiva, implicazione degli endofiti nel risanamento spontaneo osservato. (Musetti et al., 2005; Musetti et al., 2007; Bulgari et al., 2011; Landi e Romanazzi, 2011).

Gli endofiti, ed in particolare gli endofiti fungini, producono una vasta e articolata gamma di interazioni con la pianta e con l'ecosistema, in questa ottica una articolata analisi di queste interazioni risulta di fondamentale importanza per una migliore comprensione delle dinamiche del sistema e le possibili implicazioni pratiche che queste potrebbero avere nel limitare le fragilità del sistema biologico-vegetale connesso con l'agricoltura.

2. Endofiti

Diverse sono in letteratura le definizioni di organismo endofita, secondo Petrini (1991), endofiti sono "**Tutti gli organismi abitanti gli organi della pianta che in un dato momento della loro vita riescono a colonizzare i tessuti interni della pianta senza causare danni apparenti all'ospite.**", per Wilson (1995) endofiti sono "*Funghi e batteri che, per tutto o parte del loro ciclo*

"Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine". Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte"

vitale, invadono tessuti di piante vive causando non apparenti e asintomatiche infezioni all'interno dei tessuti delle piante e senza causare sintomi di malattia".

Da queste definizioni si evince come gli endofiti siano descritti in funzione del raggruppamento tassonomico (Eubacteria; Eukarya; Archaea), delle relazioni con la pianta ospite e del tempo, inteso prevalentemente come fenologia della pianta e ciclo vitale dell'organismo endofita .

2.1 Funghi endofiti, classificazione e aspetti tassonomici

Più di 100 anni di ricerche scientifiche suggeriscono che la maggior parte, se non la totalità delle piante presenti in ecosistemi naturali o agro ecosistemi sono colonizzate da funghi micorrizici e/o da funghi endofiti (Rodriguez *et al.*, 2009)

In letteratura, gli endofiti fungini sono suddivisi in due principali raggruppamenti:

- Endofiti non clavicipitacei (NC-endophytes)
- Endofiti clavicipitacei (C-endophytes)

Tali raggruppamenti sono stati definiti in funzione di differenze in termini di relazioni evolutive, caratteri tassonomici, relazioni con la pianta ospite e ruoli ecofisiologici.

2.2 Endofiti clavicipitacei C-Endophytes

I C-ENDOPHYTES rappresentano un piccolo numero di specie, appartenenti alla famiglia delle *Clavicipitaceae*, filogeneticamente correlate, difficili da coltivare in vitro e colonizzanti prevalentemente piante erbacee dell'ordine *Poales*, (Rodriguez *et al.*, 2009).

All'interno delle *Poales* si annoverano specie di rilevante importanza per l'alimentazione sia umana che animale, prive di metaboliti secondari endogeni tossici.

Il riscontro di fenomeni di tossicosi in animali in alimentazione su pascoli con prevalenza di queste piante erbacee attrasse l'attenzione del mondo accademico e, nel 1977 Bacon mise in stretta correlazione il fenomeno osservato con la presenza di endofiti clavicipitacei all'interno dei tessuti delle piante analizzate. Nel 1988 Clay definì gli endofiti clavicipitacei come mutualisti difensivi di piante erbacee.

La famiglia delle *Clavicipitaceae* (Ord. Hypocreales Phylum Ascomicota) comprende specie saprofitiche e simbiotiche associate a piante erbacee, insetti, funghi (Nikoh and Fukatsu, 2000), muschi e alghe (Bacon & White, 2000), accomunate dalla elevata produzione di composti bioattivi (Clay and Schardl, 2002).

"Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine". Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte"

Analisi filogenetiche (ASR, "Ancestral state reconstruction") indicano come gli endofiti clavicipitacei derivino da progenitori patogeni di insetti privi di enzimi o tossine in grado di uccidere o degradare i tessuti delle piante ospiti, evolutisi attraverso adattamenti ad ospiti appartenenti a regni diversi (Spatafora *et al.*, 2007; Nikoh and Fukatsu, 2000; Korocho *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2007).

Si ritiene quindi che, in questo gruppo di organismi endofiti, l'evoluzione da biotrofismo ad endofitismo si sia concretizzato mediante:

- riduzione delle capacità enzimatiche in grado di indurre meccanismi di difesa nelle piante ospiti;
- incremento della dipendenza dalla pianta ospite per nutrimento e crescita;
- incremento di metaboliti secondari benefici per la simbiosi (Clay & Schardl 2002).

I C-ENDOPHYTE sono stati distinti in tre tipologie in base alle interazioni biologiche intercorrenti con la pianta ospite (Clay & Schardl 2002):

- **Tipo 1** interazioni sintomatiche-patogene, i tessuti delle piante ospiti vengono invasi sistemicamente, in concomitanza della fioritura, in prossimità delle infiorescenze, il fungo genera i corpi fruttiferi, andando così ad inibire il normale sviluppo degli organi riproduttivi della pianta e causando la malattia definita "choke disease" (White *et al.*, 1991 a). In questa tipologia di interazione, il seme, quando prodotto, non è infettato ed è in grado di originare piante sane.
- **Tipo 2** interazione mista, i funghi di questo raggruppamento hanno una elevata specializzazione in termini di piante ospiti, colonizzano solo piante a ciclo fotosintetico C₃ della sottofamiglia delle *Pooideae*, la pianta infetta può contemporaneamente avere infiorescenze normali e infiorescenze abortite. I funghi in grado di stabilire questo tipo di interazione sono definiti "simbionti pleiotropici" (Schardl *et al.*, 1997), sono in grado di massimizzare i benefici del mutualismo con la possibilità di riproduzione e ricombinazione genetica. Studi d'inoculazione dimostrano come la sporulazione sia sotto controllo genetico da parte dell'endofita (Leuchtman & Clay 1993).
- **Tipo 3** asintomatici, i funghi inseriti in questo raggruppamento hanno una elevata specializzazione in termini di piante ospiti (piante C₃ sottofamiglia delle *Pooideae*), hanno andamento intercellulare all'interno dei tessuti vegetali, e, sotto il controllo di ROS endogene (Kuldau and Bacon., 2008), le ife si mantengono non ramificate. In

fioritura, nessun corpo fruttifero viene prodotto, non esiste un meccanismo regolare di ricombinazione genetica e di regola un singolo genotipo fungino viene trasmesso verticalmente al seme mediante crescita ifale all'interno degli ovuli in sviluppo. Esistono evidenze che dimostrano la presenza di ricombinazione genetica mediante ibridazione interspecifica (Schardl and Craven 2003).

Le tre tipologie d'interazione descritte, possono essere riscontrate all'interno della famiglia delle *Clavicipitaceae* ed in particolare tra diverse specie di *Epichloë*, e *Neotyphodium*. La maggior parte delle specie di *Epichloë*, forma infezioni sintomatiche-patogene o miste, mentre le specie appartenenti al genere *Neotyphodium*, manifestano in via esclusiva interazioni asintomatiche.

Neotyphodium coenophialum, rappresenta un esempio significativo in letteratura, pur essendo indicato come ibrido interspecifico di tre diverse specie di *Epichloë* a comportamento patogeno (Tipo1, Tipo2), (Clay and Schardl, 2002; Kuldau and Bacon, 2008), manifesta, nei confronti della pianta ospite, un comportamento endofitico-simbiontico (Tipo 3). *Neotyphodium coenophialum*, è produttore di diverse classi di alcaloidi tossici (*Ergovaline*, *Ergot alkaloids*, *Loline Alkaloids*, *Lolitremes*, *Peramine*) e metaboliti secondari (Kuldau and Bacon, 2008), in numero e concentrazione nettamente superiori rispetto a quelle prodotte dai parentali, questa caratteristica, ha come effetto un incremento della resistenza dell'ospite nei confronti di insetti fitofagi, mammiferi erbivori e stress abiotici (Kuldau and Bacon, 2008). L'intensità di tale maggior resistenza riscontrata è modulata dall'interazione con il genotipo della pianta ospite, e da fattori ambientali (Clay and Schardl, 2002).

In letteratura, gli endofiti clavicipitacei sono riportati, fornire protezione anche nei confronti di organismi patogeni quali *Rhizoctonia* sp. (Gwinn and Gavin, 1992), *Puccinia coronata*, (Ford and Kirkpatrick, 1989), oltre ad incrementare la resistenza nei confronti di nematodi (West *et al.*, 1988; Kimmons 1990)

Esiste però un costo alla simbiosi, è stato dimostrato che ad elevate pressioni di insetti fitofagi, come nel caso di popolazioni Argentine di *Bromus setifolius* sottoposte a danni da formiche "taglia-foglie" *Acromyrmex* sp., l'incidenza dell'endofita *Neotyphodium tembladerae* raggiunge 80-100%. Contrariamente in aree dove la pressione delle formiche "taglia-foglie" è inferiore, l'incidenza dell'endofita scende a percentuali intorno al 20%, in

linea con l'ipotesi che ospitare l'endofita potrebbe essere costoso in assenza di pressioni ambientali (White *et al.*, 2001). Si afferma pertanto che gli effetti positivi, negativi o neutri dell'interazione tra questi organismi e le piante ospiti siano in costante equilibrio e dipendano da fattori genotipo ospite, genotipo endofita, presenza o assenza di pressioni ambientali.

2.3 Endofiti non clavicipitacei

Gli endofiti non-clavicipitacei sono distinti sostanzialmente in tre gruppi funzionali in base ad una serie di differenze in termini di piante ospite, modalità di trasmissione, biodiversità in pianta, e ruoli ecologici (Rodriguez *et al.*, 2009).

- Endofiti non-clavicipitacei (*Classe 2*)

Questa classe comprende un'elevata variabilità in termini di specie, la maggior parte delle quali afferisce al phylum *Ascomycota*, sub phylum *Pezizomycotina*. In misura nettamente inferiore sono le specie appartenenti al phylum *Basidiomycota* che a loro volta sono distribuite tra gli *Agaricomycotina* e *Pucciniomycotina*.

Gli endofiti "non clavicipitacei Classe 2" (Clay, 1988; Rodriguez *et al.*, 2009) sono in grado di:

- Formare infezioni estensive all'interno della pianta ospite, colonizzando radici, fusti e foglie,
- Essere trasmessi via tegumento del seme o rizomi ed essere poco presenti nella rizosfera.
- Colonizzare i tessuti delle piante ospiti mediante appressori o per penetrazione ifale diretta
- Crescere all'interno dei tessuti della pianta intercellularmente con minimo o nessun impatto alle cellule dell'ospite.
- Conferire incrementi di biomassa della pianta ospite mediante induzione di ormoni,
- Proteggere la pianta da funghi patogeni grazie all'elevata produzione di metaboliti secondari.

Caratteristica peculiare e distintiva degli endofiti "non-clavicipitacei Classe 2" è la capacità di conferire benefici in termini di fitness alla pianta definiti come "habitat-adapted".

Due esempi molto interessanti sono riportati in letteratura; gli autori dimostrano come piante spontanee caratteristiche di diversi habitat, costiero e geotermale, necessitano della simbiosi con organismi fungini endofitici per ottenere tolleranza nei confronti di stress salino e termico rispettivamente (Rodriguez *et al.*, 2008).

È evidenziato inoltre come la tolleranza allo stress sia caratteristica peculiare dell'habitat, ovvero la simbiosi in habitat costiero conferisce tolleranza a stress salino ma non allo stress termico, mentre in habitat geotermale la simbiosi conferisce tolleranza a stress termico ma non a quello salino. Gli autori infine dimostrano come la tolleranza, a stress salino e stress termico possa essere trasferita da monocotiledoni e dicotiledoni, indicando come l'associazione endofita-pianta possa essere datata fra i 140 e 235 milioni di anni fa ovvero prima della divergenza evolutiva tra monocotiledoni e dicotiledoni. Quest'asserzione trova conferma anche in funzione del ritrovamento di prove dell'esistenza di associazioni pianta-fungo in reperti fossili datati 400 milioni di anni fa (Krings *et al.*, 2007).

Il meccanismo ipotizzato per la tolleranza agli stress va ricercato nella risposta comune delle piante agli stress abiotici. Stress salini, termici, carenze idriche, inducono nelle piante risposte simili, riguardanti modifiche del potenziale osmotico cellulare, produzione di osmoliti, produzione di molecole segnale, come acido abscissico (ABA) e la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Studi effettuati dimostrano come le specie reattive dell'ossigeno siano messe in stretta correlazione sia con la risposta a stress biotici-abiotici, che nella manifestazione della sintomatologia dovuta allo stress.

Negli esempi riportati in precedenza, gli organismi simbiotici agiscono a livello di detossificazione delle ROS prodotte in conseguenza dello stress termico o salino subito, tale detossificazione porta alla riduzione dei livelli di ROS nei tessuti e quindi alla riduzione dei danni da esse provocati, con il conseguente spostamento della soglia di tolleranza allo stress stesso (Rodriguez *et al.*, 2009).

L'attività degli endofiti "non-clavicipitacei Classe 2" nei confronti delle ROS differisce quindi sostanzialmente rispetto a quanto visto per gli endofiti clavicipitacei che utilizzano le ROS endogene per autoregolazione e mantenimento della simbiosi (Tanaka *et al.*, 2006; Rouhier & Jacquot, 2008)

2.3.1 Endofiti non clavicipitacei Classe 3

Gli endofiti appartenenti a questa classe sono caratterizzati:

- dalla capacità di colonizzare esclusivamente o preferenzialmente la parte epigea delle piante ospite dove tendono a formare delle infezioni iperlocalizzate prevalentemente su tessuti fotosintetici erbacei, anche se non mancano evidenze di colonizzazione di tralci legnosi, frutti e fiori.
- Dall'essere un gruppo di endofiti iperdiversi in associazione con piante tropicali, piante non vascolari, conifere, piante erbacee in habitat molto diversificati dalle foreste tropicali alle comunità artiche ed antartiche.
- dall'essere trasmessi per via orizzontale, e di fornire alla pianta ospite benefici non esclusivamente habitat-adapted.

Per esempio tessuti fogliari asintomatici di piante tropicali possono contenere numerose infezioni a mosaico, viene stimato che porzioni di 4 mm² di foglie tropicali possono arrivare ad avere dozzine di specie endofitiche diverse e che foglie della medesima pianta possono avere composizione endofitica totalmente diversa. Questi riscontri non sono limitati alle sole specie tropicali, infatti specie vegetali di climi da temperati a boreali ospitano una sorprendente quantità di specie endofitiche appartenenti a questo raggruppamento.

Dal punto di vista tassonomico, gli endofiti classe 3 appartengono in prevalenza al phylum *Ascomycota* rispetto al phylum *Basidiomycota*. All'interno del phylum *Ascomycota* il sub phylum *Pezizomycotina* con le classi dei *Pezizomycetes*, *Leotiomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Sordariomycetes* e *Dothideomycetes* risulta essere maggiormente rappresentato. Fra i basidiomiceti annoveriamo gli *Agaricomycotina*, *Pucciniomycotina* e *Ustilagomycotina*. Gli endofiti di questa classe si riproducono prevalentemente via frammentazione ifale o attraverso propaguli trasmissibili orizzontalmente mediante acqua e aria. Una differenza chiave con gli endofiti non-clavicipitacei classe 2 è rappresentata dalla mancanza di trasmissione verticale al seme. Il processo di colonizzazione dei tessuti delle piante risulta particolarmente favorito dall'elevato inoculo trasportato sulle superfici fogliari, e da condizioni di elevata umidità.

Il metabolismo fogliare non influenza generalmente la colonizzazione di questi endofiti, risulta infatti da prove di campo, che oltre l' 80 % delle foglie di *Theobroma cacao* risultano

colonizzate a due settimane dall'emergenza delle stesse e che su piante esenti da endofiti poste in campo, foglie giovani e vecchie dimostrano una eguale e rapida colonizzazione (Arnold & Herre 2003). Vista l'elevata biodiversità in pianta, il ruolo eco-fisiologico di questi organismi endofiti è di difficile interpretazione. Generalmente l'inoculazione artificiale di piante sane con questi endofiti fungini non portano ad incrementi osservabili di biomassa o altri valori quantificabili, tuttavia Webber nel 1981 ha indicato come questi endofiti potessero proteggere la pianta dal "Dutch elm disease", e Arnold et al., nel 2003 hanno ipotizzato una azione di difesa nei confronti di *Phytophthora* sp. in *Theobroma cacao*. Molti studi devono essere ancora eseguiti al fine di comprendere in maniera approfondita i ruoli ecologici e le dinamiche d'interazione pianta-endofita-patogeno di questa classe di endofiti *iperdiversi*, e le loro possibilità di applicazione in agricoltura.

2.3.2 Endofiti classe 4

In questa classe vengono inseriti organismi definito come miceli sterili associati alle radici delle piante o "*mycelium radicus astrovirens*", MRA o anche "dark septate endophyte", DSE. La maggior parte degli studi effettuati su questi funghi endofiti hanno focalizzato l'attenzione prevalentemente su aspetti tassonomici viste le elevate difficoltà nella loro corretta identificazione. Sono endofiti in grado di colonizzare l'apparato radicale di più di 600 piante distribuite in una grande variabilità di ecosistemi. Tali organismi sono stati inoltre riscontrati con una certa frequenza in ecosistemi ad elevate pressioni ambientali di stress. La trasmissione si ritiene avvenga per via orizzontale nel suolo attraverso frammentazione ifale (Jumpponen & Tappe, 1998). La colonizzazione radicale di *Phialocephala fortinii* viene descritta da diversi autori come rappresentativa dei DSA (Currah & van Dyk 1986). La colonizzazione prende inizio da un fitto intreccio di ife che avvolgono la superficie della radice. Alcune ife crescono lungo l'asse principale della radice addentrandosi tra gli spazi sub corticali senza causare nessuna alterazione nello sviluppo della radice della pianta ospite (O'Dell et al., 1993). Frequentemente questi endofiti sono in grado di formare fitti intrecci di ife generanti "masse pseudoparenchimatiche" sclerozi o pseudo sclerozi (Wang & Wilcox., 1985). Nonostante la vastissima bibliografia riguardante gli aspetti tassonomici, il ruolo eco fisiologico di questi organismi, rimane per molti aspetti

non chiarito. Si stima possano avere un ruolo importante nell'acquisizione dei nutrienti, nella crescita dell'ospite, nella protezione da patogeni anche mediante la produzione di metaboliti secondari. Con l'avvento delle metodiche molecolari grandi passi sono stati fatti nella tassonomia di questi organismi e lo studio può ora essere focalizzato nelle interazioni con la pianta ospite nella caratterizzazione dei loro ruoli eco fisiologici.

2.4 Ruoli ecologici (in agro ecosistemi)

Come visto nei capitoli precedenti le piante possono ospitare da un unico genotipo fungino fino a diverse decine o centinaia di specie fungine appartenenti a generi diversi anche molto distanti tra loro. Si può affermare che non esista in natura pianta che non sia colonizzata da organismi endofiti siano essi fungini o batterici. Quali sono le forze che plasmano le comunità endofitiche e le relazioni con la pianta ospite?

Ogni singola pianta studiata in letteratura, è risultata ospitare una comunità endofitica che, in ultima analisi, è un sottoinsieme di un "pool" di microorganismi che popolano l'habitat in cui la pianta è inserita (Saunders et al., 2010). Teorie riguardanti l'ecologia delle comunità microbiche suggeriscono la presenza di "filtri" che vanno a modulare la composizione di tali comunità microbiche. Questi "filtri" possono essere suddivisi in due grossi raggruppamenti: filtri legati all'habitat e interazioni intra-specifiche.

In dettaglio, specifiche variabili ambientali, agiscono da filtri legati all'habitat, andando ad escludere la possibilità di colonizzare una specie vegetale da parte di microorganismi non adattati alla sopravvivenza nel habitat medesimo. Diversamente, quando un microorganismo è in grado di tollerare le condizioni abiotiche ambientali imposte dall'habitat, la possibilità di colonizzare una specie vegetale dipende dall'esito di due tipologie di interazioni biotiche, quelle con la pianta stessa, e quelle con la comunità microbica in essa già insediata. La produzione di metaboliti di difesa, callosio, l'ispessimento delle pareti cellulari, rappresentano degli esempi di *filtri imposti dalla pianta* in risposta alla colonizzazione da parte di microorganismi. Dall'altro lato le specie fungine endofitiche hanno evoluto strategie per superare queste barriere.

A titolo di esempio, specie vegetali diverse, producono, metaboliti secondari con funzioni di difesa, che differiscono sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, pertanto la comunità endofitica residente sarà composta prevalentemente da organismi in grado di tollerare o detossificare questi composti.

Ad esempio il mais è in grado di produrre benzoxazinoidi, quali 2-benzoxazolinone (BOA) nei tessuti e di rilasciarlo anche al suolo (Krogh et al., 2006). I composti benzoxazinoidi (BX) hanno dimostrato tossicità contro funghi, batteri e piante (Niemeyer and Perez, 1995). Il mais normalmente ospita diverse specie di *Fusarium* aventi elevata tolleranza ad alti livelli di (BOA) (Glenn et al., 2001; Saunders and Kohn, 2008; Saunders and Kohn, 2009); tali specie sono riscontrate essere importanti produttrici di micotossine in grado di produrre tossicosi negli animali domestici e rischio di cancro e altri problemi sanitari nell'uomo. La necessità di produrre mais in grado di tollerare attacchi di *Ostrinia nubilalis* e altri insetti fitofagi ha portato alla selezione di ibridi in grado di produrre elevati livelli di BX (Barry and Darrah 1991), questo ha prodotto un vantaggio ecologico alle specie di *Fusarium* produttrici di micotossine e specie fungine in grado di detossificare agevolmente i BX. Anche la resistenza agli attacchi da insetti indotta in piante transgeniche di mais contenenti la proteina Cry₁AB originata da *Bacillus thuringiensis* (Plicher et al., 1997) ha dimostrato di avere importanti ricadute nella composizione endofitica delle piante. Sulle piante di mais transgeniche precedentemente citate è stata infatti evidenziata la riduzione di micotossine prodotte da specie endofitiche di *Fusarium*, questo dovuto alla minore presenza di insetti in alimentazione sulla pianta con conseguente riduzione della carica di spore dell'endofita trasportate sulla pianta e riduzione dei punti di inoculo dell'endofita a livello delle ferite prodotte dagli insetti stessi. Dal punto di vista della colonizzazione endofitica come pure nella patogenesi, una pianta appartenente ad una popolazione, può trovarsi in stato di *suscettibilità derivata dall'associazione* o *resistenza derivata dall'associazione*. Un esempio di *resistenza derivata dall'associazione* in agricoltura è l'utilizzo di una consociazione di diverse specie coltivate per ridurre la diffusione di un organismo patogeno. Al contrario l'utilizzo di elevate densità di singole specie vegetali in una determinata area pone le medesime in una situazione di suscettibilità derivata dall'associazione consentendo l'incremento di sorgenti di inoculo tanto di un organismo patogeno quanto di un potenziale endofita. Una pianta quindi ha una sfera di influenza che può estendersi oltre lo spazio fisico da essa occupato, andando ad esempio a rilasciare essudati radicali che creino un ambiente inadatto alla crescita di alcuni organismi, oppure la loro comunità endofitica può essere trasmessa preferenzialmente ad altre specie geneticamente correlate nel medesimo habitat.

Quando una specie fungina è stabilmente insediata all'interno dei tessuti della pianta, può a sua volta imporre delle barriere nei confronti di successive colonizzazioni fungine. Un organismo,

“Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine”. Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte”

colonizzatore secondario, che tenta di colonizzare la pianta ospite in questa situazione si trova a dover superare non solo le barriere imposte dalla pianta ma deve essere in grado anche di competere con la comunità endofitica stabilmente insediata. Si instaurano quindi interazioni microorganismo-microorganismo. Specie fungine insediate all'interno dei tessuti della pianta ospite possono essere in grado di prevenire completamente la colonizzazione da parte di altri organismi fungini o possono competere con altri microorganismi presenti all'interno dei tessuti, ne consegue che la comunità risultante sarà data dal risultato combinato di tutte le interazioni esaminate finora.

Diverse sono le tipologie di interazioni che possono intercorrere all'interno dei tessuti della pianta ospite tra diverse specie endofitiche.

- Competizione microbica mediante produzione di composti antifungini

Il risultato dell'interazione competitiva tra specie fungine è spesso attribuito alla produzione di composti bioattivi. In studi effettuati in vitro è emerso che circa l'80% delle specie endofitiche fungine sono in grado di produrre composti secondari ad attività erbicida, antibatterica, o antifungina. Alcune specie fungine sono inoltre in grado di detossificare i composti antifungini prodotti dai loro competitori, ad esempio *Fusarium graminearum* è in grado di detossificare il 6-pentil-alpha-pyrone prodotto da *Trichoderma harzianum* (Cooney et al., 2011). L'abilità di detossificare composti di origine fungina batterica o vegetale sembra essere una caratteristica comune a molteplici specie endofitiche fungine e rivestirebbe un ruolo fondamentale nell'assemblaggio delle comunità endofitiche.

La risposta dei funghi alle tossine sintetizzate dalla pianta o da altri organismi fungini, indica la presenza di tre primari meccanismi di tolleranza, la detossificazione, l'alterazione strutturale del target della tossina, e attivazione di trasportatori di membrana in grado di estrarre la tossina dai compartimenti cellulari (VanEtten et al., 2001). L'interazione tra la capacità di produrre composti antifungini di alcune specie fungine e l'abilità di tollerare o resistere ad esse da altre, risulta essere la migliore chiave di lettura in termini di competizione fungo-fungo. È interessante sottolineare il fatto che alcune specie endofitiche possano produrre composti volatili con attività antifungina in grado di esibire una competizione diretta a scala spaziale molto più grande rispetto ai composti tossici non volatili (Stinson et al., 2003; Steinebrunner et al., 2008). La tolleranza di specie fungine endofitiche a questi composti volatili e la loro influenza nell'alterare la composizione endofitica sono ad oggi sconosciute,

"Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine". Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte"

tuttavia il loro studio è di primaria importanza nella comprensione delle differenze in competizione a breve e lunga distanza.

- Competizione per lo spazio e per i nutrienti

Diverse specie fungine sono in grado di competere con altri microorganismi occupando tutti i tessuti disponibili in un particolare sito della pianta. La competizione per gli spazi e per i nutrienti è particolarmente intensa nei funghi e avviene secondo due modalità, nel primo caso una specie esaurisce i nutrienti disponibili a scapito di un'altra specie, nel secondo caso una specie è in grado di bloccare l'accesso ai nutrienti ad un'altra specie. Quest'ultima modalità si ricollega a quanto detto in precedenza per quanto riguarda la produzione di metaboliti secondari antifungini. Viene così a prendere sempre maggiore rilevanza il fattore tempo nella costituzione di una comunità endofitica. Una specie può quindi specializzarsi nella colonizzazione primaria ovvero con grande dispersione e rapida germinazione delle spore, con rapida crescita del micelio; mentre altre specie, colonizzatrici secondarie, dovranno utilizzare altre strategie quali produzione di composti antifungini, che per questo motivo rimangono come il principale tipo di interazione per moltissime specie fungine.

- Competizione via micoparassitismo

Gli endofiti fungini possono essere parassitizzati da altri funghi, batteri o virus. La tipica interazione caratteristica del micoparassitismo è senza dubbio la collisione ifale e l'abilità di penetrare all'interno dei tessuti di altri organismi fungini. Numerose specie del genere *Trichoderma*, espletano la propria attività di biocontrollo proprio attraverso micoparassitismo, produzione di composti antifungini e competizione per le risorse (Benitez et al., 2004). Le relazioni tra endofiti fungini e batteri ecto/endosimbionti può avere un vasto impatto sulla virulenza, metabolismo e sviluppo dei funghi.

Interessante è l'esempio di un ceppo avirulento di *Fusarium oxysporum* in grado di avere un'azione di biocontrollo nei confronti di ceppi virulenti della stessa specie (Minerdi et al., 2008). Al contrario il batterio endosimbiontico *Burkholderia rhizoxina* conferisce fitopatogenicità all'ospite fungino *Rhizopus microsporus* mediante produzione di fitotossine (Partida-Martinez & Hertweck 2005; 2007; Lackner et al. 2009). Queste modulazioni ottenute da interazioni tra diversi organismi concorrono alla costituzione delle comunità endofitiche.

- Induzione di risposte di difesa nella pianta

Un endofita colonizzatore primario può influenzare e limitare la colonizzazione della pianta da parte di altri organismi andando ad innescare una risposta di difesa della pianta (Trillas and Segarra, 2009). L'induzione di resistenza avviene al momento del primo riconoscimento come non-self attraverso segnali ben conservati (es. chitina) questo porta ad un incremento della capacità di reazione ad infezioni successive (Conrath et al., 2002). Le specie di biocontrollo possono indurre il "priming" (Trillas and Segarra, 2009), questa attivazione, ha delle ripercussioni negative sia su altri endofiti di colonizzazione secondaria sia nei confronti di patogeni. Tuttavia si osserva che il colonizzatore primario può ottenere un vantaggio competitivo solo se è in grado di indurre la resistenza ma è contemporaneamente in grado di tollerarne gli effetti.

- Facilitazione tra specie endofitiche.

La facilitazione è altrettanto possibile tra specie fungine (Lawrey 2000; Tiunov and Scheu, 2005; Pan and May, 2009) esempi sono *Fusarium verticilloides* che grazie alla sua elevata capacità di detossificare i composti benzoxazinoidi prodotti dalle piante di mais, mediante trasformazione degli stessi in prodotti meno tossici, favorisce la colonizzazione della pianta da parte di specie meno tolleranti; oppure *Nectria parmeliae* che può colonizzare il lichene *Punctelia rudecta* solo dopo che quest'ultimo sia stato preventivamente colonizzato da specie di *Fusarium* lichenicole in grado di degradare i composti antifungini prodotti dal lichene stesso (Lawrey, 2000).

3. Approcci all'identificazione e allo studio delle comunità endofitiche fungine

La Micologia, è una branca delle scienze naturali che si occupa dello studio dei funghi, essenzialmente derivata dalla botanica in quanto, almeno nei primi anni di indagine, i funghi furono considerati membri del regno vegetale, e lo studio delle loro strutture, cicli vitali, diffusione e biologia furono condotti prevalentemente da botanici (Carlile et al., 2002). Con l'avvento della microscopia ottica, la micologia acquisisce caratteri di sistematicità, e nel 1729 a Firenze Pier' Antonio Micheli con la pubblicazione di "*Nova Plantarum Genera*" getta le basi della micologia sistematica.

3.1 Approcci dipendenti dalla coltivazione

Colonie di micro funghi in natura sono di dimensioni microscopiche, pertanto studi tassonomici, ecologici e fisiologici potevano essere eseguiti solo con l'utilizzo di tecniche proprie della microbiologia. Robert Koch nel 1881 con la messa a punto della tecnica microbiologica per l'isolamento e mantenimento in coltura pura di batteri patogeni, fornì lo strumento operativo necessario ed applicabile anche allo studio sistematico di micro- e macro-funghi.

Le metodologie classiche di diagnosi applicate allo studio delle comunità dei funghi endofiti prevedono un approccio secondo le fasi descritte nei paragrafi successivi.

3.1.1 Isolamento micologico classico

Dal protocollo di sterilizzazione dipende in buona sostanza l'esito dell'isolamento, in letteratura sono evidenziate le criticità di tale passaggio. I protocolli di sterilizzazione sono stati sviluppati in funzione delle caratteristiche dei tessuti delle piante da analizzare, devono in sostanza eliminare la componente epifitica senza andare ad intaccare la componente endofitica. Nel lavoro di (Schulz & Boyle 2005) viene messo in evidenza come sia importante al fine di verificare l'avvenuta sterilizzazione la prova definita come leaf printing ovvero si pone la porzione di tessuto da analizzare, sterilizzata per qualche secondo, sul terreno agarizzato di crescita e successivamente si rimuove il frammento. Una corretta sterilizzazione del campione porta come risultato l'assenza di crescita di colonie.

- Campionamento, isolamento e condizioni di crescita

Numerosi sono in letteratura i lavori che sottolineano l'importanza della scelta del campione al fine di ottenere risultati affidabili. Essenzialmente la comunità endofitica può essere molto variabile, come riportato nei capitoli precedenti, in funzione dei tessuti, della fenologia della pianta e delle condizioni ambientali.

La stima della comunità endofitica fungina di una pianta è anche in funzione del terreno di crescita adottato per l'isolamento. Sono stati descritti e proposti in letteratura un gran numero di terreni di coltura. Prima della distinzione sulla base dei componenti, importante è la distinzione in termini funzionali, i terreni possono servire per l'isolamento, e quindi possono essere distinti in semplici o addizionati di antibiotici al fine di inibire la crescita di particolari organismi non di interesse.

Possono essere distinti anche in terreni per l'identificazione, ovvero terreni costituiti da substrati particolari utili per la generazione delle strutture riproduttive, o terreni comunque selettivi per particolari organismi. I terreni rivestono un ruolo importante nella tassonomia; in letteratura infatti le descrizioni dei funghi vengono frequentemente eseguite partendo da terreni specifici. Le condizioni di crescita sono altrettanto importanti, e sono dettate dalla biologia dei funghi in esame, anche in questo caso, variazioni di queste condizioni possono alterare la stima della comunità endofitica.

- Identificazione degli isolati

Gli isolati fungini ottenuti sono quindi sottoposti ad identificazione, storicamente gli approcci seguiti a tale scopo hanno previsto la comparazione di reperti fossili (Hawksworth et al., 1995), l'uso di marcatori biochimici fisiologici e di crescita (Bridge 1985; Paterson and Bridge 1994), la composizione della parete cellulare (Bartnicki-Garcia 1970, 1987), i pattern isoenzimatici (Kohn 1992), la presenza di pigmenti (Besl and Bresinsky, 1997) la presenza di metaboliti secondari (Frisvald and Filtenborg, 1990) e osservazioni ultrastrutturali (James et al., 2006) in combinazione con l'osservazione di caratteristiche macro e micro morfologiche delle strutture riproduttive che rimane tuttora uno dei più importanti criteri tassonomici.

Frequentemente accade tuttavia di ottenere miceli che non danno nelle condizioni sperimentali strutture riproduttive utili ai fini tassonomici, o a causa dell'inadeguatezza delle condizioni di crescita tra quelle precedentemente descritte o per caratteristiche intrinseche all'organismo in esame. Al fine di ovviare a tale problema vengono in nostro ausilio tecniche di biologia molecolare.

3.1.2 Metodi molecolari applicati all'identificazione dei taxa fungini coltivabili.

Frequentemente in letteratura sono riportati articoli dimostranti la presenza di organismi privi di caratteri tassonomici utili all'identificazione o per i quali a oggi non è nota la forma gamica come per alcuni endofiti non clavicipitacei di classe 4 o organismi strettamente correlati non differenziabili mediante i classici caratteri tassonomici.

Diverse ad oggi sono le tecniche di biologia molecolare che possono essere utilizzate e che saranno di seguito descritte:

L'acido desossiribonucleico (DNA), è un acido nucleico che contiene le informazioni genetiche necessarie alla biosintesi di RNA e proteine indispensabili per la vita di tutti gli organismi viventi. Il DNA è essenzialmente un polimero organico costituito da monomeri definiti come deossiribonucleotidi costituiti da uno zucchero deossiribosio, un gruppo fosfato, e una base azotata. Le basi azotate incorporate nei nucleotidi sono adenina, guanina, citosina e timina e per l'RNA, l'uracile. La disposizione in sequenza dei nucleotidi costituisce l'informazione genetica. Nel 1983 Kary Mullis, presso il Cetus Corporation, concettualizzò per la prima volta la "reazione a catena della polimerasi" PCR. La PCR è un semplice ma raffinato processo che consente, in linea teorica, di produrre in vitro infinite copie di una porzione di DNA target estratto preventivamente dai tessuti di interesse. Il funzionamento della PCR si basa sul funzionamento della DNA-polimerasi, la quale in natura presiede la replicazione del DNA catalizzando la sintesi di un nuovo filamento di DNA a partire da un filamento DNA stampo o template. La DNA polimerasi richiede per il suo funzionamento un DNA stampo a doppia elica, una coppia di primers o "inneschi", la presenza di deossinucleotidi 5'-trifosfato (dNTPS), magnesio ($MgCl_2$) ed un buffer per mantenere il pH a valori ottimali per la reazione. La reazione a catena della polimerasi consta di tre fasi principali:

Denaturation – il frammento di DNA stampo a doppia elica deve essere denaturato, ovvero si deve avere la separazione delle due eliche, questo avviene generalmente ad una temperatura pari o superiore ai $94^{\circ}C$

Annealing – la temperatura della miscela di reazione viene portata a temperature comprese tra i $45-65^{\circ}C$, alle quali i primers si attaccano alle regioni loro complementari sul DNA stampo denaturato

Extension – la temperatura della miscela viene portata a $72^{\circ}C$, che rappresenta l'*optimum* di temperatura per l'attività della DNA polimerasi, la quale consente la sintesi ex-novo del frammento di DNA.

Final elongation – questo step viene utilizzato generalmente per consentire alla polimerasi di estendere tutti i filamenti eventualmente presenti ancora in singola elica, generalmente viene condotta a $72^{\circ}C$ per un periodo variabile dai 5-20 minuti.

Una precisazione deve essere fatta a riguardo della polimerasi, essa deve essere in grado di sintetizzare il filamento a temperature di $72^{\circ}C$, deve tollerare il passaggio di

denaturazione a 95°C e deve essere in grado di funzionare per numerosi cicli, nei primi esperimenti l'enzima doveva essere sostituito ad ogni ciclo in quanto denaturato dalle elevate temperature. La scoperta del batterio termofilo *Thermus aquaticus* nelle sorgenti geotermali del parco nazionale di Yellowstone (USA), e della sua polimerasi termostabile ha consentito l'ottenimento della Taq polimerasi in grado di sopportare i diversi cicli di cui è composta la PCR.

Le tre fasi, *denaturation*, *annealing* ed *extension*, vengono ripetute ciclicamente per un numero di volte definito dall'operatore che in genere varia dai 35 ai 40. Il numero di copie del "template" raddoppiano ad ogni ciclo andando a generare quindi un numero esponenziale di frammenti amplificati di interesse.

Delle tre fasi descritte, la fase di denaturazione e di estensione sono generalmente invariate in letteratura per quanto riguarda le temperature, mentre i tempi possono essere oggetto di messa a punto; per la fase di annealing invece sia la temperatura che i tempi sono parametri essenziali per la buona riuscita della reazione di PCR, e dipendono in buona parte dalle caratteristiche dei primers.

Il disegno dei primers costituisce il nocciolo della reazione di PCR, in tutti i lavori presenti in letteratura, in qualsiasi settore di ricerca scientifica che contempra l'uso della PCR, sono descritti i primers disegnati o i riferimenti agli autori che per primi li hanno disegnati. Se le basi storiche dell'identificazione micologica risiedono nello studio dei caratteri morfologici e biochimici come evidenziato in precedenza ad oggi sempre più frequentemente le tecniche di biologia molecolare, basate su PCR, vengono affiancate al fine di validare o affinare l'identificazione micologica.

In letteratura sono disponibili diverse coppie di primers, specie specifiche, in grado di discriminare a livello di genere o di specie fungina, utilizzati per studi tassonomici dettagliati.

Di fondamentale importanza è la scelta della porzione di DNA da amplificare, negli ultimi 15-20 anni (Bellemain et al., 2010) la tassonomia fungina molecolare si è basata sullo studio delle regioni del DNA nucleare codificanti per l'RNA ribosomiale, tali regioni sono state scelte in quanto sono ripetute in tandem molteplici volte in uno o più loci dei genomi fungini e contengono sia sequenze altamente conservate utili per il disegno dei primers che sequenze altamente variabili, utili ai fini tassonomici (Richard et al., 2008).

Ogni unità ripetuta è costituita dal DNA ribosomiale della sub-unità piccola (SSU 18S rDNA), dalla regione interspaziatrice ITS₁, dal gene 5.8S rDNA, dalla regione interspaziatrice ITS₂, dal DNA ribosomiale della sub-unità grande (LSU 28S rDNA). Ogni unità ripetuta è separata dalla successiva dalla regione spaziatrice intergenica (IGS)

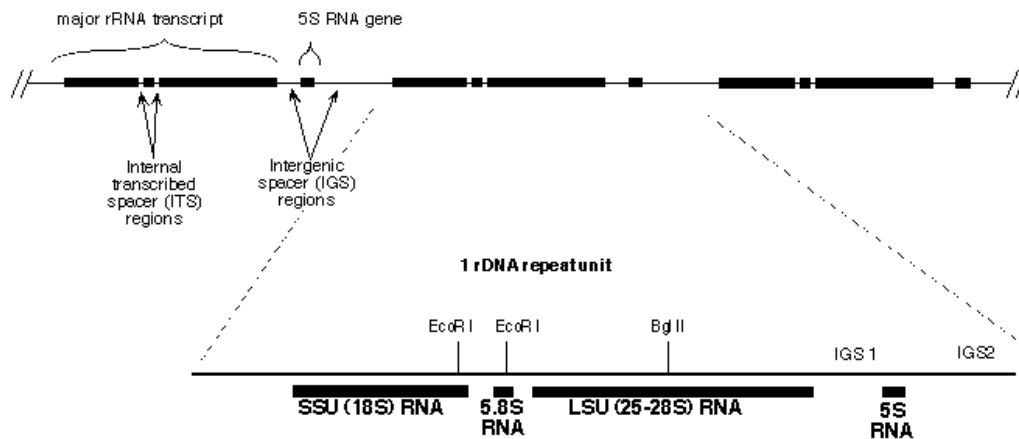


Figura 1 Struttura del DNA ribosomiale eucariotico (Vilgalys lab, Duke University)

La regione ITS del DNA nucleare ribosomiale (nrDNA) è stata proposta come indicatore primario per il barcoding degli organismi fungini (Seifert 2009), tale regione può essere utilizzata sia per la discriminazione a livello di taxa, sia come vedremo in seguito per applicazioni relative allo studio di comunità fungine (environmental DNA barcoding). È tuttavia da sottolineare come siano emerse delle carenze nella possibilità di risolvere accuratamente alcune specie fungine pertanto sono allo studio nuovi marcatori molecolari basati su β -tubulina (BenA), "elongation factor 1- α (EF-1- α), e la sub unità grande della RNA polimerasi II (RPB2) da affiancare ai dati ottenuti dalla regione ITS.

Negli studi di tassonomia molecolare è prassi consolidata l'affiancamento di tecniche di fingerprinting per raggruppare gli isolati fungini in base a caratteristiche molecolari, tali raggruppamenti sono definiti come OTU o MOTU ovvero operational taxonomic unit o molecular taxonomic unit, e possono essere generati da RFLP.

L'RFLP (restriction fragment length polymorphism) è una tecnica di biologia molecolare basata sulla attività di endonucleasi di restrizione, che ad opportune temperature e in un sistema tampone, sono in grado riconoscere specifiche sequenze nucleotidiche nel filamento di DNA amplificato ed operarvi dei tagli. I frammenti ottenuti sono visualizzati elettroforeticamente in gel di poliacrilammide, e possono costituire carattere

tassonomico. Tale tecnica viene utilizzata con successo anche per tipizzare o raggruppare organismi endofiti o per differenziare molecularmente ceppi diversi di alcuni organismi. Questa tecnica non è comunque di validità tassonomica assoluta, negli ultimi anni, grazie alla sempre maggiore economicità dell'accesso alle tecniche di sequenziamento molecolare, sono state create numerose banche dati contenenti un numero sempre maggiore di sequenze relative alle principali regioni genomiche precedentemente descritte di molteplici organismi. Queste banche dati create allo scopo di catalogare e classificare gli organismi viventi (DNA Barcoding) risultano di fondamentale importanza negli studi tassonomici fornendo un termine di confronto tra gli organismi isolati oggetto di studio e gli organismi già studiati in letteratura e presenti in banca dati.

Si rimarca tuttavia che ogni approccio presenta criticità e vantaggi, l'applicazione integrata delle tecnologie a nostra disposizione consente di ottenere risultati più robusti, e questa è la linea di pensiero attualmente proposta. L'approccio dipendente dalla coltivazione esaminato fin qui, sia nei suoi aspetti micologici classici che affiancato alle moderne metodiche molecolari presenta delle problematiche. È noto, infatti, da numerosi lavori in letteratura che sia per gli organismi endofiti che per organismi patogeni esiste la possibilità che questi possano essere biotrofi obbligati o che non possano essere coltivati su substrati artificiali. Per lo studio di questi organismi le metodiche molecolari risultano essere indispensabili.

3.2 Approcci indipendenti dalla coltivazione.

Il DNA può essere estratto, in linea teorica, da qualsiasi substrato biologico, e la tecnologia PCR può quindi essere applicata con successo al DNA genomico totale estratto direttamente dai tessuti vegetali da analizzare.

Nello studio delle comunità endofitiche fungine, risulta evidente l'importanza dell'utilizzo di primers universali per funghi in grado di escludere l'amplificazione del DNA della pianta o di altri microorganismi non target. Come descritto nei paragrafi precedenti la regione ITS risulta essere la regione maggiormente utilizzata nella diagnosi sia dei taxa fungini che delle comunità microbiche associate alle piante. Per studi di "environmental barcoding", diversi sono stati i primers universali per funghi disegnati in letteratura.

I primi primers, universalmente accettati e utilizzati per l'amplificazione della regione ITS sono stati gli "ITS1" e "ITS4" (White et al., 1990), tuttavia la loro non sufficiente discriminazione nei confronti del DNA delle piante, ne ha consentito l'uso prevalentemente in lavori di identificazione degli organismi isolati. Successivamente sono stati disegnati i primers ITS1-F, ITS4-A e ITS4-B (Gardes & Bruns, 1993) discriminanti per il DNA della pianta e specifici per funghi, basidiomiceti ed ascomiceti.

Un recente lavoro di Martin & Rygielwicz (2005) ha messo in luce le problematicità di alcuni primers utilizzati in letteratura e pur non contestandone la validità generale gli autori hanno proposto una nuova gamma di coppie di primers da applicare a studi tassonomici ed ecologici (Figura 2).

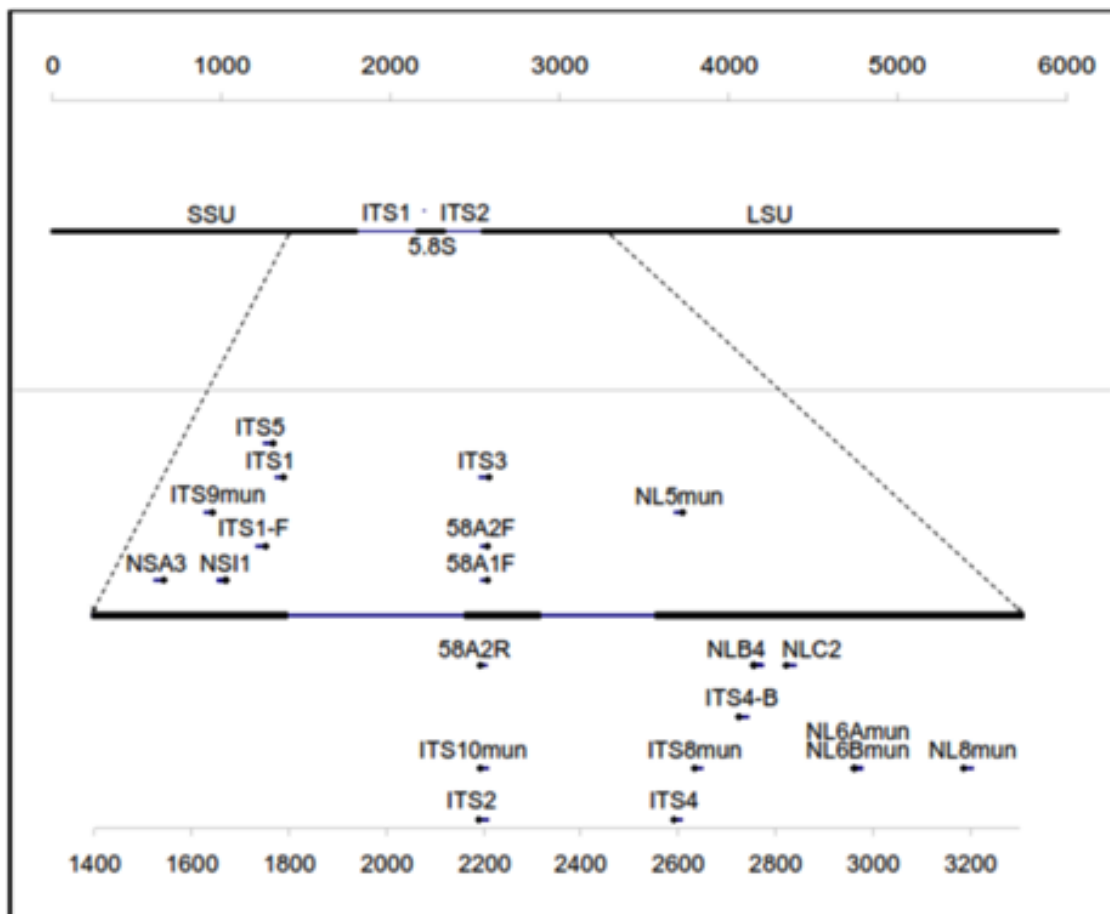


Figura 2 Primers universali per i funghi disegnati sulle regioni conservate del 18S, 5,8S, 28S rDNA.

In letteratura sono ad oggi presenti decine di primers utilizzabili per studi tassonomici molecolari, i più utilizzati sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1 Primers universali per funghi riportati in letteratura utilizzabili per studi tassonomici molecolari.

primer name	sequence (5'->3')	reference
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al, 1990
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White et al, 1990
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White et al, 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al, 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al, 1990
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns, 1993
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Gardes & Bruns, 1993
NSA3	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA	Martin & Rygiewicz, 2005
NSII	GATTGAATGGCTTAGTGAGG	Martin & Rygiewicz, 2005
NLB4	GGATTCTCACCTCTATGAC	Martin & Rygiewicz, 2005
NLC2	GAGCTGCATTCCCAAACAACCTC	Martin & Rygiewicz, 2006

Nello studio delle comunità endofitiche, il DNA genomico totale estratto dai tessuti delle piante, è stato comunemente analizzato mediante una particolare tecnica di biologia molecolare definita clonaggio molecolare. Tale tecnica pone le sue basi nella tecnologia del DNA ricombinante. Il DNA genomico totale estratto dal materiale vegetale, viene amplificato con una opportuna coppia di primers universali per organismi fungini consentendo in tal modo, di ottenere diversi ampliconi della regione genomica di interesse di ogni organismo fungino presente. Mediante reazione di ligasi, gli ampliconi ottenuti, vengono inseriti in un plasmide e successivamente incorporati in un una cellula competente. Ogni cellula trasformata acquisisce resistenza ad un antibiotico e dà origine in piastra ad una colonia batterica di colore bianco che può essere facilmente trasferita e analizzata. Ogni colonia batterica ottenuta incorpora un solo plasmide legato all'amplicone, pertanto lo screening di un adeguato numero di colonie batteriche, mediante colony-PCR ed analisi RFLP, consente l'individuazione di diversi patterns molecolari che possono esser messi in correlazione con altrettanti diversi organismi fungini. Il sequenziamento degli ampliconi di DNA relativi ad ogni pattern molecolare, o OTU's ottenuta consentirà l'identificazione, per confronto, con altre sequenze depositate in GenBank dei diversi organismi fungini presenti nei tessuti vegetali analizzati. L'applicazione delle moderne tecniche di sequenziamento costituiscono un valido ausilio all'identificazione tassonomica di organismi fungini privi di caratteri morfologici necessari all'identificazione. La descrizione di una comunità

"Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine". Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte"

microbica endofitica utilizzando le metodiche fino a qui descritte, è da considerarsi essenzialmente completa, e come visto in precedenza l'approccio integrato è ad oggi sempre più adottato o suggerito come procedura. Le metodiche finora descritte impiegano molte risorse e tempo per essere condotte, hanno d'altro canto una elevata capacità di descrivere in maniera esaustiva la comunità di un campione. La carenza di questo approccio risiede tuttavia nell'impossibilità di rilevare in maniera rapida le variazioni nella composizione della comunità endofitica, e di avere un quadro immediato e rapido delle stesse per poterne descrivere le differenze che ci possono essere per esempio tra piante, habitat e stadi fenologici diversi.

3.3 Tecniche di fingerprinting

La necessità di identificare in maniera rapida la composizione di una comunità di microorganismi presenti in un substrato ha portato allo sviluppo di nuove tecniche di biologia molecolare, basate sulla tecnologia PCR. Esistono sostanzialmente due classi generali di polimorfismi del DNA utilizzabili per differenziare organismi o comunità, il polimorfismo legato a variazioni della composizione nucleotidica della sequenza di DNA e il polimorfismo legato a variazioni della lunghezza della sequenza di DNA a causa di inserzioni o delezioni (Mills et al., 2007).

Le principali tecniche di fingerprinting che saranno di seguito descritte si differenziano in base al tipo di polimorfismo rilevato.

3.3.1 LH-PCR

La LH-PCR (Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di fingerprinting in grado di distinguere diversi organismi componenti una comunità microbica in base al naturale polimorfismo di lunghezza di sequenza dovuto ad inserzioni o delezioni di basi all'interno di geni od operoni.

La LH-PCR ha come target generalmente regioni ipervariabili del DNA dell'organismo da differenziare, generalmente l'ITS (internal transcribed spacers) o IGS (Intergenic spacers) o il 16S rDNA.

Il primo passo all'applicazione della LH-PCR è costituito dall'estrazione del DNA genomico totale secondo protocolli sviluppati per le diverse esigenze di analisi (Doyle and Doyle, 1990) Si procede quindi all'amplificazione del DNA metagenomico estratto mediante l'utilizzo di primers universali marcati con un fluoroforo generalmente in posizione 5' del

"Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine". Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte"

primer forward. I prodotti di PCR ottenuti sono separati in base alla lunghezza del frammento e la fluorescenza viene rilevata da un sequenziatore laser. La costituzione di un opportuno standard ed il suo caricamento all'interno di ogni corsa elettroforetica consente per confronto l'identificazione dei singoli organismi componenti la comunità microbica in esame.

3.3.2 T-RFLP

E' una tecnica di biologia molecolare impiegata per lo studio della composizione delle comunità microbiche, e delle dinamiche ad esse associate in funzione di alterazioni ambientali, frequentemente di origine antropica. Tecnica essenzialmente derivata dall'analisi RFLP, dalla quale si differenzia per l'utilizzo di primers forward e reverse marcati con uno o più fluorofori, e l'integrazione di un sequenziatore laser del DNA. Questa tecnica come la precedente rileva polimorfismi di lunghezza delle sequenze amplificate mediante reazione di PCR a partire da DNA genomico totale estratto dal campione. I prodotti ottenuti e purificati sono sottoposti a restrizione enzimatica mediante una o più endonucleasi di restrizione debitamente individuate. I frammenti ottenuti vengono separati mediante elettroforesi capillare e quelli legati ai fluorofori vengono rilevati dal sequenziatore laser che restituisce una serie di picchi (elettroferogramma) variabili in altezza (area) e numero. Il numero di picchi costituisce l'informazione relativa alla composizione della comunità microbica in termini qualitativi, l'altezza dei picchi dà invece un'informazione di tipo quantitativo. Entrambe le informazioni devono essere analizzate con attenzione in quanto prone ad errore causato dalla possibile amplificazione preferenziale di PCR di determinati target (Suzuki and Giovannoni, 1996). Un ulteriore dato che viene restituito dall'analisi T-RFLP è la lunghezza in basi dei frammenti rilevati, desunta mediante analisi software calibrata sugli standard di riferimento interni.

Anche questa tecnica è soggetta ad un limite di detection che è tecnologico e relativo alla sensibilità del sensore della fluorescenza e alla possibilità dello stesso di discernere il segnale dal rumore di fondo.

3.3.3 Single-strand conformational polymorphism (SSCP).

La single-strand conformational polymorphism (SSCP) è una tecnologia elettroforetica originariamente applicata alle analisi biomediche nel campo delle mutazioni genetiche puntiformi umane (Orita et al., 1989a,b), successivamente è stata applicata allo studio delle comunità microbiche associate al suolo (Schwieger and Tebbe, 1998), a patogeni virali delle piante (Kong et al., 2000), a nematodi (Clapp et al., 2000), a funghi (Moricca et al., 2000) e come tecnica complementare a PCR specie-specifica nella identificazione di marker genetici per la rapida identificazione di diverse specie di *Phytophthora* (Scott et al., 1998).

La tecnica prevede, l'estrazione del DNA genomico totale del campione da analizzare, l'amplificazione mediante PCR dello stesso mediante primers appositamente disegnati, ed una separazione del DNA a singola elica mediante elettroforesi in gel non denaturante di poliacrilammide (Sunnucks et al., 2000). In dettaglio la metodica si basa sul differente ripiegamento o conformazione tridimensionale che le molecole di DNA a singola elica sono in grado di assumere e che sono funzione della composizione nucleotidica (Sunnucks et al., 2000). Le strutture secondarie che vengono così a generarsi alterano la mobilità elettroforetica dei frammenti a singola elica prodotti dalla reazione di PCR consentendone la separazione differenziale e la visualizzazione in gel di acrilamide. La dimensione ottimale dei frammenti a singola elica per ottenere una risoluzione superiore al 99% è compresa tra le 100 e le 300 bp (Girman, 1996). Con questa tecnica possono essere analizzati con risoluzioni adeguate frammenti di dimensione non superiore alle 750 bp (Ortí et al., 1997a) e può essere proficuamente associata ad elettroforesi capillare ed analisi mediante sequenziatore laser.

3.3.4 DGGE – TGGE

Sia la DGGE (Muyzer et al., 1993) che la TGGE (Felske et al., 1997; Heuer et al., 1997) sono metodiche molecolari di recente sviluppo utilizzate in studi di comunità microbiche e di dinamica di popolazione in ecologia microbiologica.

Entrambe le tecniche necessitano di una preventiva amplificazione di PCR della regione genomica di interesse e sfruttano la differente mobilità elettroforetica del DNA a doppia elica non denaturato rispetto al DNA a doppia elica parzialmente denaturato. La

denaturazione del DNA è correlata alla temperatura di melting degli ampliconi e di conseguenza alla composizione nucleotidica degli stessi. Mutazioni puntiformi nella composizione nucleotidica di due frammenti della medesima lunghezza possono essere teoricamente evidenziate come differenza di mobilità dei frammenti in gel di poliacrilammide in gradiente denaturante (Myers et al., 1985b). La denaturazione dei frammenti può essere ottenuta mediante temperatura o mediante denaturanti chimici, queste due alternative, caratterizzano le tecniche elettroforetiche in esame, la TGGE sfrutta la denaturazione dei frammenti in gradiente termico, mentre la DGGE sfrutta la denaturazione degli stessi in gradiente chimico (Muyzer, 1999). Le mutazioni puntiformi possono essere rilevate solo se presenti nei domini dei frammenti di DNA a più bassa temperatura di melting (T_m) (Myers et al., 1987). Questo è dovuto al fatto che nella corsa elettroforetica in gel di acrilamide, gli ampliconi, raggiunto il gradiente denaturante chimico o termico corrispondente alla propria temperatura di melting più bassa arrestano la propria mobilità elettroforetica non potendo quindi di fatto essere sottoposti a gradienti più elevati. Diversamente, gli stessi ampliconi assoggettati ad un gradiente termico o chimico superiore alla temperatura di melting più alta sarebbero completamente denaturati con perdita della differenziale mobilità elettroforetica. Al fine di ovviare a questa problematica, all'estremità 5' del primer forward utilizzato nella reazione di PCR viene aggiunta una coda ricca in guanina e citosina definita GC-Clamp che, data la propria elevata forza di legame, impedisce di fatto la completa denaturazione dei frammenti amplificati, durante la corsa elettroforetica in gradiente denaturante.

Sia la DGGE che la TGGE furono originariamente descritte ed applicate allo studio delle comunità batteriche del suolo o delle acque. Muyzer (1993) descrisse l'applicazione della metodologia DGGE all'analisi di ampliconi derivati dalla regione variabile V₃ del gene 16S rDNA, regione questa prevalentemente utilizzata per lo studio delle comunità microbiche batteriche. Per quanto riguarda lo studio delle comunità microbiche fungine, la maggior parte delle pubblicazioni scientifiche, fanno riferimento alla regione genomica del 18S o alla regione interspaziatrice ITS compresa tra i geni 18S rDNA e 23S rDNA.

Nella tabella di seguito riportata (Valášková and Baldrian, 2009) sono riportati i principali lavori inerenti lo studio di comunità microbiche sia batteriche che fungine con le rispettive regioni genomiche adottate.

Tabella 2 Principali coppie di primers utilizzate in letteratura per lo studio di comunità microbiche.

Table 2. Overview of the common PCR-DGGE systems used for microbial community analysis in soils

Target group	PCR target sequence	Primer pair	Reference
Bacteria, general	bacterial 16S, V3	341f-gc/518r	Muyzer et al. (1993)
	bacterial 16S, V3-V4	341f-gc/U758	Phillips et al. (2008)
	bacterial 16S, V3-V5	341f/907r-gc	Muyzer et al. (2004)
	bacterial 16S, V6-V8	968-gc/1378	Kozdrój and van Elsas (2001), this paper
	bacterial 16S, V6-V8	968-gc/1401	Heuer and Smala (1997)
Bacteria, alpha-proteobacteria	bacterial 16S, V6-V8	203a f/1492r (or 1494) nested 968-gc/1378	Gelsomino and Cacco (2006)
Bacteria, beta-proteobacteria	bacterial 16S, V6-V8	948b f/1492r (or 1494) nested 968-gc/1378	Gelsomino and Cacco (2006)
	bacterial 16S, V6-V8	968 / 1492r (or 1494) nested 968-gc/1492	Gremion et al. (2004)
Bacteria, Actinobacteria	bacterial 16S, V3	243f/513-gc	Heuer et al. (1997)
	bacterial 16S, V3-V5	S-C-Act-0235-a-S-20-gc/ S-C-Act-0878-a-A-19	Jaatinen et al. (2008)
	bacterial 16S, V6-V8	243f/1492r (or 1494) nested 968-gc/1378	Gelsomino and Cacco (2006)
Bacteria, Pseudomonads	bacterial 16S, V3	Psf/1378 nested 341-gc/518r	Yao et al. (2006)
Bacteria, ammonia oxidizers	bacterial 16S, V2-V4	63f/1378r nested (CTO189fA/B-gc and CTO189fC-gc)/CTO654r	Ros et al. (2006)
	bacterial 16S, V2-V4	(CTO189fA/B-GC and CTO189fC-GC)/CTO654r	Kowalchuk et al. (1998)
Fungi, general	fungal 18S	NS1/Fung-gc	Möhlenhoff et al. (2001)
	fungal 18S	EF390/FR1-gc	Vainio and Hantula (2000)
	fungal 18S	NS1/FR1-gc	Vainio and Hantula (2000)
	fungal 18S	NS1/EF3 nested NS1/FR1-gc	Oros-Sichler et al. (2006)
	fungal 18S	EF4/EF3 nested EF4/Fung5-gc	van Elsas et al. (2000)
	fungal 18S	EF4/EF3 nested NS2/Fung5-gc	van Elsas et al. (2000)
	fungal 18S	EF4/EF3 nested EF4/NS2-gc	van Elsas et al. (2000)
	fungal 18S	EF4/EF3 nested nu-ssu0817/NS4-gc	Bastias et al. (2007)
	fungal 18S	EF4/EF3 nested EF4/NS3-gc	Smit et al. (1999)
	fungal 18S	NS1-gc/NS2	Kowalchuk et al. (1997)
	fungal 18S	EF4/Fung5 nested NS2/Fung5-gc	Clegg (2006)
	fungal 28S	403f/662r-gc	Diouf et al. (2006)
	fungal 28S	NL359/NL912-gc	Zuccaro et al. (2003)
	fungal ITS	ITS1f/ITS4 nested ITS1f-gc/ITS2	Anderson et al. (2003)
	fungal ITS	ITS1f-gc/ITS2	Bougoure and Cairney (2005)
	fungal ITS	ITS1/ITS2-gc	Yao et al. (2006)
	fungal ITS	ITS3/ITS4-gc	Arenz et al. (2006)
Fungi, Ascomycota	fungal ITS	ITS1/ITS4A nested ITS1/ITS2-gc	Larena et al. (1999), Yao et al. (2006)
Fungi, Basidiomycota	fungal ITS	ITS1f/ITS4B-gc	Kowalchuk and Smit (2004)
	fungal ITS	ITS1/ITS4B nested ITS1/ITS2-gc	White et al. (1990), Yao et al. (2006)
Fungi, Basidiomycota	fungal ITS	ITS1/ITS4B nested ITS1f-gc/ITS2	this paper
Fungi, arbuscular mycorrhiza	fungal 18S	AM1/NS31-gc	Kowalchuk et al. (2002)

“Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l’Università degli Studi di Udine”. Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell’Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte”

Questa tecnica è una delle più largamente utilizzate dalla sua introduzione in studi di fingerprinting in ecologia batterica, essa beneficia della capacità di analizzare e comparare numerosi campioni per un determinato target in un'unica corsa elettroforetica, consentendo una valutazione sia della posizione che della intensità delle bande ottenute. Mediante questa tecnica risulta possibile inoltre la excissione ed il sequenziamento delle bande di interesse. La tecnica tuttavia necessita della costituzione di uno standard interno che consenta la comparazione delle diverse corse elettroforetiche, oltre a necessitare di un'accurata standardizzazione delle fasi di preparazione del gel. Le criticità di questa tecnica sono ascrivibili alla difficoltà di visualizzazione in gel delle bande relative a membri della comunità poco rappresentati ovvero presenti in basse concentrazioni, tale criticità è dovuta in parte ai limiti delle tecniche di colorazione dei gel e in parte ai limiti di amplificazione in PCR (van Elsas and Boersma, 2011). Una seconda criticità è data dalla constatazione che singole bande nel gel possono essere generate dalla co-migrazione di ampliconi di organismi diversi. Parte di queste criticità sono comuni a diverse tecniche di fingerprinting, pertanto è richiesta una accurata ottimizzazione delle procedure di attuazione della tecnica e di valutazione dei risultati.

3.4 Approccio integrato

Recenti studi hanno comunque messo in evidenza che anche queste tecniche possono stimare in maniera non corretta la comunità endofitica fungina o per problemi inerenti alla scelta dei primers, o per la capacità intrinseca di risoluzione delle singole tecniche, per il diverso metodo di estrazione. Sempre più lavori propongono come miglior scelta possibile un approccio integrato che preveda l'utilizzo di diverse tecniche in successione al fine di compensare gli svantaggi di talune tecniche con i vantaggi di altre.

4. Vitis vinifera

4.1 Biologia

Il genere *Vitis L.* comprende 60-70 specie, prevalentemente originarie dell'America centrosettentrionale e dell'Asia orientale e sudorientale, l'unica specie europea coltivata è *Vitis vinifera L.* appartenente all'ordine delle *Rhamnales* famiglia *Vitaceae*

Vitis vinifera è una liana, possiede fusto legnoso, rampicante; rami bruno-rossastri, striati, con cirri prensili. Foglie alterne, circa 2 su 3 opposte ai cirri nella parte inferiore dei rami e alle infiorescenze nella parte superiore; lamina digitata, a contorno complessivamente cuoriforme o reniforme, con 3-5 lobi profondi e irregolarmente dentati; lamina quasi glabra superiormente, con pelosità più densa e spesso persistente inferiormente, ma mai formante uno strato ragnateloso continuo. Fiori in pannocchie dense; calice ridotto, corolla con 5 petali lunghi 5 mm, verdastri, che formano una cuffia che cade con lo schiudersi del fiore. Frutti a bacca ellissoidale o sferica di 6-22 mm (Pignatti, 1982).

Si distinguono tre sottospecie di *Vitis vinifera L.* (Pignatti, 1982;), due delle quali presenti in Italia:

Vitis vinifera* subsp. *sativa Hegi con fiori ermafroditi; bacche (acini) lunghi 6-35 mm, di colore variabile tra giallo-verdastro e blu-violetto, con polpa dolce; semi 0-4 per acino, grandi, allungati, piriformi, con becco lungo circa quanto il diametro trasversale; foglie tutte simili

Vitis vinifera* subsp. *sylvestris (Gmelin) Hegi Pianta dioica con fiori unisessuali; acini piccoli (6-8 mm), blu-violetti, con polpa acida, in grappoli irregolari e a maturazione scalare; semi 3, piccoli, arrotondati, con becco molto più breve del diametro trasversale; foglie dimorfe (nelle piante maschili più profondamente lobate che nelle femminili), con picciolo breve.

Vitis vinifera* subsp. *caucasica Vavilov, propria dell'Asia centrale, poco chiaramente distinta rispetto alla subsp. *sylvestris* ma forse alla base di alcune varietà coltivate di origine orientale.

4.2 Areale di distribuzione

L'origine della vite è molto più antica di quella della diffusione della viticoltura. La storia della pianta ha oltre 100 milioni di anni e si è evoluta sotto forma di molte specie la maggior

parte delle quali non è sopravvissuta alle ere preistoriche. Secondo molti studiosi la coltivazione della *Vitis vinifera* sativa per la vinificazione risale almeno a 4.000 anni prima di Cristo. Si può ipotizzare che il primo centro di coltivazione fu l'area situata intorno al monte Ararat nel Caucaso. La coltivazione della vite si sarebbe diffusa secondo tre percorsi; il più antico va dal Monte Ararat verso la Mesopotamia, l'Egitto e la Grecia sotto l'influenza di vari popoli; secondo alcuni la vite sarebbe invece arrivata in Grecia attraverso l'Anatolia. Il secondo percorso parte dalla Grecia e va verso la Magna Grecia (Sicilia, Italia del Sud), la Francia (Marsiglia) e la Spagna, sotto l'influenza dei Greci e dei Fenici. Il terzo percorso va dalla Francia verso il nord dell'Europa, principalmente attraverso il Rodano, il Reno ed il Danubio, sotto l'influenza romana (Buono & Vallariello.,2002).

4.3 Importanza economica

L'Italia è il primo produttore a livello mondiale di uva con 8,245 milioni di tonnellate (FAO 2009), in Friuli Venezia Giulia al 2010 la superficie totale investita a vite era di 19882 ettari, 75% in zone DOC, con una produzione totale di 1.351.965 q (ISTAT 2010), sono interessate circa 9.000 aziende, il comparto nel complesso contribuisce per quasi il 15 % alla PLV agricola regionale (ERSA).

Superfici vitate sono presenti in quasi tutta la pianura friulana, anche se la più forte concentrazione territoriale si registra nelle zone collinari sul confine orientale della regione. Sul piano commerciale, la produzione vinicola regionale ha un buon livello di diffusione su molti mercati, anche grazie al riconoscimento delle sue produzioni DOC e DOCG (soprattutto sui mercati europei) e può contare sulla presenza di enti e di affermate iniziative di promozione. Nella Regione Friuli Venezia Giulia sono riconosciute nove Denominazioni d'Origine Controllata, una delle quali, la zona DOC di Ramandolo in provincia di Udine, è anche Controllata e Garantita (DOCG). La produzione vivaistica viticola italiana inoltre è prima nel mondo, con 90 milioni di barbatelle innestate prodotte per la stragrande maggioranza nel distretto friulano di Rauscedo.

4.4 Principali avversità

La vite può essere colpita da numerose avversità fungine tra le quali annoveriamo peronospora, oidio, botrite, marciume acido, escoriosi, e da numerosi parassiti animali quali

“Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine”. Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte”

tignole, cicaline, tripidi, ragnetto rosso, ragnetto giallo. Tutte queste avversità, vengono generalmente tenute sotto controllo attraverso trattamenti ripetuti, durante il periodo vegeto-produttivo, con diversi prodotti chimici fitosanitari.

Di particolare pericolosità rimangono tuttavia le malattie causate da fitoplasmi, quali flavescenza dorata (FD) e legno nero (LN), per le quali ad oggi non esiste un intervento fitosanitario diretto, e per le quali le uniche alternative percorribili sono state, la lotta agli insetti vettori, l'espianto delle viti infette e lo studio del fenomeno del "recovery".

4.5 Fitoplasmi

I fitoplasmi, inizialmente chiamati micoplasmi, furono scoperti e descritti circa 40 anni fa da un gruppo di ricercatori giapponesi (Doi et al., 1967), sebbene la prima descrizione di una malattia da essi causata, il giallume dell'astro (*Aster yellows*), fu ad opera di Kunkel nel 1926. Questi fitopatogeni sono riconducibili alla classe *Mollicutes* ordine *Acholeplasmatales* famiglia *Acholeplasmataceae*. Sono organismi simili a batteri, di piccole dimensioni, delimitati da una membrana plasmatica, ma privi di parete cellulare (Lee et al., 2000). La mancanza di una parete cellulare consente loro di cambiare forma adattandosi all'ambiente circostante, potendo così passare di cellula in cellula attraverso i pori delle placche cribrose, colonizzando i vasi floematici dove vivono e si riproducono (Osler et al., 1996).

I mollicuti in generale vengono considerati come i più piccoli organismi autoreplicanti; in natura sono stati rinvenuti come parassiti dell'uomo, dei rettili, dei pesci, degli artropodi e delle piante (Razin et al., 1998). Essi esibiscono una stretta correlazione sia ospite-specifica che tessuto-specifica evidenziando uno spiccato adattamento alla vita da parassita obbligato; ciò giustifica il fatto che la maggior parte degli organismi appartenenti a questa classe, e in particolar modo i fitoplasmi, non sono coltivabili in vitro.

Dal punto di vista della sintomatologia, i fitoplasmi esercitano una duplice influenza sulla pianta infettata :

- interferiscono sul normale funzionamento dei tubi cribrosi del floema provocando il blocco o il rallentamento della circolazione della linfa elaborata;
- alterano l'equilibrio ormonale inducendo malformazioni e anomalie di sviluppo.

Tra i sintomi conseguenti al blocco linfatico vi sono (Osler et al., 1996):

- accumulo di amido nelle foglie, alterazioni cromatiche quali ingiallimenti o arrossamenti, alterazione delle lamine fogliari che si presentano spesse, fragili, pesanti, ripiegate sul picciolo, arrotolamenti e accartocciamenti fogliari, nanismo e deperimento generalizzato.

Per quanto riguarda l'interferenza sul sistema ormonale della pianta ritroviamo: virescenza sviluppo di fiori verdi a causa della perdita di pigmenti nelle cellule dei petali), fillodia (lo sviluppo di parti fiorali in strutture simili a foglie, aspetto cespuglioso e "scopazzato" a causa della perdita della dominanza apicale che comporta la proliferazione di germogli ascellari e la riduzione della lunghezza degli internodi, rosettatura, malformazioni ed aborti fiorali, ciclo vegetativo alterato, frutti piccoli e malformati (Osler et al., 1996).

Nelle piante affette da fitoplasmi la comparsa di sintomi visibili è preceduta da alterazioni ultracellulari accertabili al microscopio elettronico; tra di esse vi sono (Osler et al., 1996):

- depositi di callosio nella placca cribrosa;
- accumulo di amido nei cloroplasti e loro disorganizzazione;
- formazione di vescicole citoplasmatiche;
- necrosi cellulare.

In natura i fitoplasmi sono trasmessi da insetti vettori appartenenti all'ordine dei Rincoti Omotteri sottordine *Auchenorrhyncha* (superfamiglie dei Cixiidi, Cicadellidi) e sottordine *Sternorrhyncha* (Psillidi) (Conti e Vidano, 1988). Non si conoscono finora acari, afidi e nematodi vettori di fitoplasmi. La trasmissione è di tipo persistente-propagativo ed è caratterizzata da tre fasi distinte ma interdipendenti: acquisizione, latenza e inoculazione.

Tutti i fitoplasmi sono parassiti obbligati: possono moltiplicarsi nelle cellule degli organi dei vettori animali (garantendo la durata della carica dell'inoculo) e per questo si considerano agenti patogeni di piante e insetti. Quando lo stiletto dell'apparato boccale raggiunge le cellule floematiche, l'insetto può acquisire o inoculare i fitoplasmi. Nel vettore, il patogeno transita lungo l'intestino e da questo può, attraverso l'emolinfa, invadere le cellule di vari organi dell'insetto. Dopo il periodo di latenza, il fitoplasma può venire inoculato, attraverso la saliva, in piante sane. La capacità di acquisire fitoplasmi da piante infette è maggiore nelle forme giovanili (neanidi e ninfe) rispetto agli adulti dell'insetto; la ritenzione

dell'infettività non è influenzata da eventuali mute e il vettore può rimanere infettivo anche tutta la vita.

La diagnosi di questi organismi procariotici, vista l'impossibilità di crescita su substrati artificiali ed il loro elevato pleomorfismo, si sono basate, storicamente sulla osservazione dei sintomi, su studi di trasmissione alla pianta ospite e sulla osservazione di sezioni ultrasottili al microscopio elettronico a trasmissione.

Intorno agli anni 80' iniziarono ad essere sviluppate tecniche sierologiche ELISA ma la svolta avvenne successivamente negli anni 90 con l'avvento delle metodiche molecolari.

Lo schema di classificazione dei fitoplasmi si è basato su analisi RFLP degli amplificati di PCR R16F2n/R16R2 che si ottengono dal gene 16S rDNA (Lee *et al.*, 1998a; 2000). Questo approccio ha fornito uno strumento affidabile ed innovativo per rilevare variabilità all'interno dei fitoplasmi tale da consentirne la differenziazione e classificazione in 21 gruppi e circa 50 sottogruppi e di rendere tale metodo largamente accettato dalla comunità scientifica come sistema di classificazione dei fitoplasmi. (Zhao *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011;)

Negli ultimi anni la necessità di ottenere una più fine ed accurata identificazione tassonomica dei fitoplasmi ha portato alla adozione di nuovi marcatori genetici quali, i geni codificanti per le proteine ribosomiali, i geni *secY*, *secA*, *tuf* e le sequenze della regione interspaziatrice del 16S-23S rRNA (Lee *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda la lotta possiamo individuare due strade: la lotta diretta al patogeno e la lotta diretta al vettore.

La prima strada implicherebbe l'uso di antibiotici, tra i quali le tetracicline risultano essere le più efficaci; l'impiego però di antibiotici in natura è vietato da specifiche norme di legge e l'eventuale trattamento non avrebbe comunque effetti completi e duraturi sulla pianta. L'unica strada realisticamente percorribile risulta quindi essere la lotta al vettore (Osler *et al.*, 1996).

4.5.1 Fitoplasmi della vite

Le principali fitoplasmosi della vite, definite anche giallumi della vite (GY, grapevine yellows), sono malattie note da 50 anni; tra esse la flavescenza dorata (FD), descritta la prima volta nel sud ovest della Francia (Caudwell, 1957), e il legno nero (LN) descritto

sempre in Francia (Caudwell, 1961), sono le più importanti e diffuse in grado di causare ingenti danni economici.

4.5.1.1 Il legno nero (LN)

L'agente patogeno causale di LN è un fitoplasma appartenente al gruppo ribosomiale dello stolbur 16SrXII, sottogruppo -A (Seemüller *et al.*, 1994). Il legno nero è presente nel Friuli-Venezia Giulia dai primi anni '80 (Mutton *et al.*, 2004). La trasmissione risulta essere a carico del Cixiide *Hyalesthes obsoletus* Sign. (Maixner, 1994; Sforza *et al.*, 1998), il quale si infetta a partire da diverse piante erbacee spontanee presenti ai bordi dei vigneti e lungo i fossati (Credi *et al.*, 2001) quali *Urtica dioica*, *Convolvulus arvensis*, *Setaria viridis*, *Potentilla reptans*, *Cirsium arvense* e *Plantago lanceolata*. Tali piante giocano un ruolo chiave sia come serbatoio naturale del fitoplasma sia per lo svolgimento del ciclo biologico di *H. obsoletus* (Alma e Conti, 2002). Queste considerazioni spiegano la caratteristica endemicità di LN, nei confronti del quale, interventi di espianto e trattamenti insetticidi non risultano essere di alcuna utilità, in quanto il vettore raggiunge solo sporadicamente la vite. Legno nero e flavescenza dorata hanno sintomatologie indistinguibili tra loro e tendenzialmente aspecifiche in quanto sono la manifestazione del blocco della funzionalità floematica e dell'interferenza ormonale che sono il comune denominatore anche di altre malattie fitoplasmatiche della vite. Il quadro sintomatico, che può riguardare la chioma nella sua completezza o parti di essa, risulta tuttavia essere caratterizzato da:

uno sviluppo ridotto dei germogli

internodi raccorciati

necrosi e disarticolazione dell'apice;

andamento a zig-zag degli internodi;

colorazione dei tessuti del germoglio più scura rispetto alla caratteristica varietale;

presenza di pustole scure alla base del germoglio.

Con il progredire della stagione vegetativa i tralci acquisiscono una consistenza gommosa, e rimangono verdi, nella stagione invernale i tralci non lignificati tendono ad assumere una colorazione più scura rispetto alla normale varietale e tendono a disseccare.

A carico dell'apparato fogliare si riscontrano, in funzione della varietà

ispessimento della lamina a causa del mancato deflusso della linfa elaborata;

bollosità;
ripiegamento della lamina verso il basso fino al raggiungimento di una forma triangolare;
ingiallimenti o arrossamenti, in funzione di varietà a bacca bianca o a bacca rossa
rispettivamente. Le decolorazioni possono interessare tutta la superficie fogliare o solo
una parte, la nervatura è comunque la prima ad essere interessata. In taluni casi la lamina
fogliare può distaccarsi mentre il picciolo rimane attaccato al germoglio. A carico dei
grappoli possono presentarsi necrosi già prima della fioritura, con conseguente caduta
dell'infiorescenza. In infezioni più tardive si ha uno stentato accrescimento del grappolo,
un progressivo avvizzimento fino a disseccamento e necrosi (Governatori et al., 2005).
Una strategia di controllo può essere rappresentata dal mantenimento del vigneto libero
da infestanti, evitando lo sfalcio dei fossati per limitare lo spostamento del vettore su vite
e inerbendo il vigneto ove possibile con graminacee note per non essere ospiti né del
vettore né del fitoplasma (Maixner et al., 1995; Sforza et al., 1998; Pavan e Stefanelli,
2000).

4.5.1.2 Flavescenza dorata (FD)

L'agente patogeno causale di FD, è un fitoplasma appartenente al gruppo ribosomiale del
giallume dell'olmo (elm yellows, EY) 16SrV, (Daire et al., 1992; Daire et al., 1993b; Seddas
et al., 1996; Daire et al., 1997b), e più precisamente a 2 diversi sottogruppi ribosomiali il
16SrV-C ed il 16SrV-D (Martini et al., 1999; Angelini et al., 2003).

L'areale di distribuzione della Flavescenza dorata presente in Italia si estende a partire dal
Veneto e Lombardia (Refatti et al., 1998), verso ovest in Piemonte e Liguria (Bianco et al.,
2002), verso est in Friuli Venezia Giulia (Frausin, 2002), verso nord raggiungendo il
Trentino (Bianco et al., 2002), a sud fino all'Emilia Romagna e le Marche (Credi et al., 2002),
fino a raggiungere la Toscana (Botti e Bertaccini, 2003). Questo areale coincide
essenzialmente con quello di diffusione dell'insetto vettore *Scaphoideus titanus* Ball.,
(RHYNCHOTA, Heteroptera, Cicadellidae). *Scaphoideus titanus* Ball., è specie monofaga
su genere *Vitis*, compie una sola generazione all'anno e in natura è l'unica sorgente
importante di inoculo del fitoplasma. L'infezione passa quindi di vite in vite senza
coinvolgere nessuna altra pianta erbacea o arborea. Un'ulteriore fonte di diffusione, anche

se in percentuale molto ridotta, è la propagazione da parte dell'uomo di materiale vegetativo infetto.

Da studi effettuati sulle cvs Perera, Prosecco e Chardonnay (Osler et al., 2002) di innesto al tavolo, utilizzando marze infette (viti sintomatiche nei 3 anni precedenti), si sono ottenute percentuali di infezione al massimo del 16% (Perera). Dal punto di vista legislativo, la Comunità Europea ha stabilito con la direttiva 2000/29/CE che la Flavescenza dorata è da considerarsi malattia da quarantena.

In Italia, con il decreto ministeriale DM 31/05/2000, è stata resa obbligatoria la lotta a FD ed al suo insetto vettore *Scaphoideus titanus* (Ball.) su tutto il territorio nazionale andando a definire le linee guida degli interventi da effettuare e demandando alle Regioni e ai servizi fitosanitari di competenza, la facoltà di adottare tutte le misure necessarie per il contenimento o l'eradicazione della malattia.

4.5.2 Metodi di diagnosi dei fitoplasmi della vite

La corretta e tempestiva diagnosi di una malattia è di importanza cruciale per prevedere e prevenire l'insorgenza di epidemie; ciò è particolarmente importante per quelle fitopatie per le quali non esistono validi strumenti di controllo diretto del patogeno responsabile.

Questa osservazione risulta particolarmente valida per tutte le fitoplasmosi, con particolare riguardo a FD, sia perché provoca gravi danni, sia perché risulta impossibile distinguerla dal punto di vista sintomatico da altri giallumi meno gravi.

In passato venivano utilizzati per la diagnosi di FD saggi biologici i quali risultavano spesso laboriosi, lenti e spesso inaffidabili.

Attualmente, grazie ai progressi compiuti nell'ultimo decennio dalla diagnostica fitopatologica sono disponibili, per una diagnosi affidabile e tempestiva, metodi sierologici e metodi di biologia molecolare. Tali metodologie consentono nell'arco di qualche ora di appurare la presenza di fitoplasmi e determinarne accuratamente l'identità. (Bianco et al., 2005)

Metodi sierologici

I metodi sierologici in diagnosi fitopatologica spesso implicano la disponibilità di antisieri specifici. Tali antisieri possono essere monoclonali e policlonali e si ottengono iniettando animali con antigeni purificati.

Nel caso del fitoplasma, agente causale di FD, sono stati prodotti dal 1982 ad oggi sia anticorpi policlonali che anticorpi monoclonali (Caudwell et al., 1982; Boudon-Padieu et al., 1989, Schwartz et al., 1989; Seddas et al., 1996). Attualmente la Serdiag s.a.s (Dijon, France) commercializza un Kit Das-ELISA ed un kit per l'immunofluorescenza per la diagnosi di FD (Bianco et al., 2005).

Metodi molecolari

Le tecniche di biologia molecolare sono caratterizzate dall'alta sensibilità, la specificità, l'affidabilità, la riproducibilità e sono in grado di fornire risultati attendibili anche quando vengono applicate a piante o insetti infettati da fitoplasmii in concentrazioni molto basse, al di sotto dei limiti di sensibilità di altre tecniche diagnostiche. L'avvento della PCR (Polymerase Chain Reaction), in grado di amplificare selettivamente sequenze genomiche del fitoplasma, ha aperto nuove prospettive di studio. Dopo la PCR, per verificare la specificità dei prodotti amplificati, è possibile applicare tecniche diverse come il sequenziamento, l'ibridazione molecolare o l'analisi RFLP. Una recente tecnica diagnostica, applicabile anch'essa sull'acido nucleico estratto, è la real-time PCR.

Ibridazione molecolare

L'ibridazione molecolare si basa sull'utilizzo di sonde, ovvero sequenze nucleotidiche marcate o con fosforo radioattivo (sonde calde) o con biotina o digossigenina (sonde fredde). La reazione di riconoscimento (ibridazione) da parte della sonda, di una sequenza omologa presente nell'estratto di DNA analizzato, indica la presenza di fitoplasmii nella vite dalla quale l'estratto è stato ottenuto. L'impiego di sonde è soddisfacente per l'individuazione di fitoplasmii in piante erbacee, ma meno adatto per il rilevamento di fitoplasmii che infettano le arboree e in particolare la vite.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'introduzione della tecnologia PCR ha portato notevoli vantaggi nell'individuazione di fitoplasmi su vite. Si tratta di una tecnica estremamente efficiente in grado di rilevare piccole quantità di DNA e di mettere in evidenza differenze nel genoma di diversi fitoplasmi. I geni target per la diagnosi e la caratterizzazione dei fitoplasmi della vite sono il 16S rDNA, i marcatori molecolari più variabili quali ad esempio i geni per le proteine ribosomiali (*rpl22-rpS3*), i geni *secY*, *map*, *degV* per i fitoplasmi di FD, i geni *tuf*, *vmp1*, *etc.* per i fitoplasmi di LN (Lee et al., 2004; Langer and Maixner, 2004; Arnaud et al., 2007; Cimerman *et al.*, 2009).

Per l'analisi delle fitoplasmosi soprattutto arboree (data la bassa concentrazione dei fitoplasmi nel floema) un'unica reazione di PCR risulta spesso insufficiente. Per aumentare sia la sensibilità che la specificità dell'analisi della PCR tradizionale è stata messa a punto una variante della PCR, la nested-PCR. Sul gene 16S rDNA per esempio si opera un'amplificazione preliminare usando primers generici (universali) per tutti i fitoplasmi e successivamente si sottopone il prodotto di PCR ottenuto ad un'ulteriore reazione di polimerizzazione usando primers specifici o universali. La accuratezza di tale diagnosi può essere ulteriormente migliorata combinandola con il sequenziamento o l'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP).

Real-time PCR

La Real-time PCR ad oggi, sta gradualmente sostituendo la classica PCR per la diagnosi dei fitoplasmi. La Real-time PCR rappresenta oggi un metodo sensibile rapido e quantitativo per la diagnosi dei fitoplasmi. Durante la reazione di Real-time PCR l'accumulo degli ampliconi di PCR generati ad ogni ciclo di reazione viene monitorato attraverso la rilevazione della fluorescenza. L'incremento della fluorescenza rilevata è proporzionale al logaritmo della concentrazione del DNA target di PCR per questo motivo la Real-time PCR risulta essere una tecnica molto potente.

Gli ampliconi di PCR sono visualizzabili attraverso diversi metodi di marcatura, alcuni dei quali si legano al DNA doppia elica altri al DNA singola elica. La sonda TaqMan® risulta

essere la più utilizzata nella diagnosi di questi fitopatogeni tuttavia altri "binding dye" come il SYBR Green I[®] sono frequentemente impiegati.

Recentemente diversi protocolli per la diagnosi universale diretta dei fitoplasmi in Real time PCR sono stati sviluppati (Christensen et al., 2004; Galetto et al., 2005; Hren et al., 2007) la maggior parte dei quali questi sono basati sulla chimica TaqMan[®]. Per quanto riguarda la diagnosi gruppo specifica dei fitoplasmi direttamente mediante Real time PCR diversi sono stati i protocolli diagnostici sviluppati negli ultimi anni (Bianco et al., 2004, Galetto et al., 2005, Angelini et al., 2007; Gori et al., 2007; Hren et al., 2007), prevalentemente basati sulla chimica del SYBR Green I[®] con gene target 16S rDNA. La chimica del SYBR Green I[®] risulta essere l'opzione maggiormente economica per la "detection" in real-time PCR tuttavia la specificità di reazione è estremamente importante e deve essere verificata accuratamente.

4.6 Il fenomeno del "recovery"

Il recovery è la remissione spontanea dei sintomi in piante malate e sintomatiche (Schmid, 1965, 1975).

Il risanamento della pianta non sempre è associato alla scomparsa del fitoplasma; spesso questo viene confinato nell'apparato radicale come riscontrato su melo con AP (Apple Proliferation), o può addirittura permanere nella chioma, come ESFY (European Stone Fruit Yellows) su albicocco (Musetti et al., 2005).

Per quanto riguarda la vite, fatte salve alcune eccezioni come la cv Perera che generalmente non risana e muore uno o due anni dopo l'infezione, e la cv Garganega che risana di regola, le altre cvs risanano con una frequenza che va dal 12 al 21%. Il risanamento risulta essere completo e permanente (Osler et al., 1999).

Le basi fisiologiche del "recovery" non sono del tutto note; tuttavia, il fatto che le piante risanate si re-infettino con minor probabilità rispetto a piante che non hanno mai mostrato sintomi di malattia, lascia presupporre che il "recovery" sia l'espressione di una specie di resistenza acquisita.

Oltre a ciò, evidenze sperimentali hanno dimostrato che il "recovery" è associato ad una sovrapproduzione e accumulo di H₂O₂ nei tessuti floematici e questo accade in vite (Musetti

et al., 2006; 2007) ma anche in melo (Musetti et al., 2004) e in albicocco (Musetti et al., 2005). Tale sovrapproduzione ricorre perciò peculiarmente in piante risanate, mentre piante sane e piante malate ne esibiscono valori moderati.

Ciò può essere spiegato con il fatto che le piante "recovered" dimostrano anche una ridotta attività dei sistemi di "scavenging", cioè di rimozione di H_2O_2 , (soprattutto risultano ridotte le attività di perossidasi e catalasi), per cui tale molecola si accumula nel floema, raggiungendo livelli sufficientemente elevati da contrastare il patogeno (Musetti et al., 2004, 2005, 2006). Se non opportunamente rimosse o mantenute a livelli controllati, H_2O_2 ed altre ROS, possono interagire con diversi componenti della cellula come lipidi, proteine, DNA, producendo danni diretti o generando altri composti chimici con effetti deleteri sulla cellula vivente, come aldeidi, lipossigenasi ecc..

Per tali motivi le piante dispongono di complessi sistemi di catalisi delle ROS come il ciclo dell'ascorbato-glutatione (AsA-GSH), o enzimi antiossidanti per la rimozione delle ROS, come la superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), idrogeno-perossidasi (HP), guaicol perossidasi (GPX) che, operando in maniera sinergica, permettono la regolazione dello stato ossidativo dei tessuti (Musetti et al., 2006).

Per quanto riguarda la vite, il sequenziamento del genoma ha certamente facilitato la messa a punto di metodiche molecolari sofisticate, basate sulla tecnologia Microarray e la costruzione di microchips, che hanno permesso di confrontare contemporaneamente lo stato di regolazione di numerosi geni e proteine in piante con diverso stato fitosanitario (Albertazzi et al., 2009; Hren et al., 2009a; 2009b; Punelli et al., 2010, Margaria e Palmano, 2011). Recentemente Landi e Romanazzi (2011) hanno analizzato una serie di geni legati al metabolismo dei fenilpropanoidi in due cultivars a diversa suscettibilità a Bois Noir, evidenziando l'esistenza di differenze tra le cultivars in relazione allo stato fitosanitario ma anche allo stadio fenologico delle piante. Da questo studio è emerso come il 'recovery' in vite possa essere legato a processi metabolici che portano alla sintesi e all'accumulo di fitoalessine.

4.7 Endofiti della vite

Gli endofiti della vite hanno negli ultimi anni assunto un sempre maggiore interesse dimostrato anche dal crescente numero di lavori in letteratura.

In Italia un interessante lavoro, riguardante lo studio degli endofiti fungini della vite mediante un approccio dipendente dalla coltivazione in relazione a diverse varietà coltivate e diversi tessuti vegetali, è stato condotto da Rodolfi nel 2006. In questo lavoro sono stati ottenuti 23 taxa fungini tra i quali *Acremonium spp.*, *Aspergillus niger*, *Beauveria brongniartii*, *Sepedonium sp.* e *Thielavia sp.*, *Melanospora zamiae*.

In un lavoro analogo (González V. & Tello M.L., 2010), è stata studiata la biodiversità fungina presente in vite, mediante approccio dipendente dalla coltivazione, sia in funzione dei diversi tessuti che in relazione a diversi modelli di conduzione agronomica di vigneti nella Spagna centrale (Madrid). È stato possibile rilevare la presenza di isolati fungini appartenenti a diversi generi quali *Acremonium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botryotinia*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Nectria*, *Penicillium*, *Phoma*, *Phomopsis* e *Trichoderma*.

Anche la componente endofitica batterica presente in vite sta assumendo un interesse sempre maggiore. In due recenti lavori (Bulgari et al., 2009; 2011), mediante l'utilizzo della tecnica di fingerprinting LH-PCR e unitamente agli approcci dipendenti ed indipendenti dalla coltivazione, è stata descritta la comunità endofitica batterica e la sua correlazione con il fenomeno del recovery da giallumi della vite (GY).

La presenza di *Epicoccum nigrum* è stata confermata in vite (Martini et al., 2009), tale endofita se inoculato artificialmente in piante di *C. roseus* è risultato essere in grado di indurre una risposta di difesa nei confronti di 'Candidatus Phytoplasma mali' fitoplasma associato all'apple proliferation (AP) nel melo (Musetti et al., 2010). Diversi ceppi di *Alternaria* sp. sono stati caratterizzati in vite su materiale proveniente da diverse regioni viticole Italiane mediante un approccio polifasico (Polizzotto et al., 2011) questo endofita in lavori precedenti ha dimostrato efficacia nel controllo di *Plasmopara viticola* attraverso la produzione di diketopiperazine (Musetti et al., 2006; 2007). Da tutte queste evidenze emerge quale importanza riveste lo studio delle interazioni intercorrenti tra gli endofiti, la vite e gli organismi patogeni, nell'ottica dell'individuazione di strategie innovative di controllo.

5. Scopo della tesi

Considerate le diverse tipologie di interazioni che gli organismi endofiti fungini sono in grado di mettere in atto sia nei confronti della pianta ospite che nei confronti di organismi patogeni e quindi una loro possibile implicazione o applicazione come organismi di biocontrollo si è voluto studiare e descrivere la biodiversità endofitica fungina secondo la metodologia più completa possibile di una coltura arborea di grande importanza per l'economia del Friuli Venezia Giulia quale la vite. Parlare brevemente dei due approcci: dipendente e indipendente da coltivazione.

Si è voluto, come secondo scopo, mettere a punto un metodo rapido e riproducibile per il fingerprinting della comunità fungina in vite quale la DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) al fine di poter monitorare la composizione endofitica della vite.

La tecnica DGGE, consente di separare frammenti di DNA di medesima lunghezza ma con differente composizione nucleotidica. Tali frammenti di DNA, infatti, sottoposti ad elettroforesi in gel di acrilamide in gradiente chimico lineare denaturante costituito da formamide-urea, arresteranno la propria mobilità elettroforetica al raggiungimento della propria temperatura di melting, ovvero al raggiungimento di una determinata concentrazione di denaturante del gel di acrilamide, che è correlata alla composizione nucleotidica. In tal modo, ampliconi di PCR, di una medesima regione genomica, di organismi fungini diversi tra loro, possono avere mobilità elettoretiche differenti, consentendone la differenziazione.

Come terzo scopo del presente lavoro di tesi si è voluto applicare la metodica molecolare DGGE su campioni derivanti da piante di vite sane, infette e recovered da legno nero (LN) al fine di ottenere risultati preliminari sulla composizione della comunità endofitica fungina in tali piante con condizioni fitosanitarie diverse.

Materiali e metodi

6. Studio della biodiversità degli endofiti fungini della vite

6.1 Campionamento in vigneti a conduzioni biologica del Friuli Venezia Giulia.

Al fine di esplorare la massima biodiversità fungina presente in *Vitis vinifera* alle condizioni ambientali del Friuli Venezia Giulia, sono stati presi in esame due vigneti a conduzione biologica situati nelle località di Brazzacco (UD) e Cormons (GO)

Nel vigneto di Brazzacco (UD) sono stati campionati tre tralci con foglie a random sulla chioma da 6 piante coltivate (var. Merlot). Le medesime piante sono state campionate nei mesi di luglio e settembre del 2009 ed il materiale raccolto è stato utilizzato sia per l'approccio dipendente da coltivazione sia per quello indipendente.

Nel vigneto di Cormons sono stati campionati 3 tralci per pianta a random sulla chioma da 9 piante coltivate (var Tocai) e da 3 piante "inselvaticite" di bordo vigneto. Anche in questa località, e sulle medesime piante, sono stati eseguiti i campionamenti nei mesi di luglio e settembre del 2009, il materiale raccolto è stato utilizzato sia per l'approccio dipendente da coltivazione che per quello indipendente.

6.2 Sterilizzazione del materiale vegetale campionato

Il materiale campionato descritto in precedenza, sia esso destinato all'isolamento micologico classico (approccio dipendente da coltivazione) che all'estrazione del DNA genomico totale (approccio indipendente da coltivazione), è stato sottoposto a sterilizzazione superficiale al fine di eliminare la componente microbica epifitica naturalmente presente sui tessuti vegetali.

Il protocollo di sterilizzazione utilizzato è stato modificato a partire da quanto descritto da Mostert, L. Crous P.W & Petrini O, nel 2000 ed ha previsto:

- un accurato lavaggio preliminare in acqua corrente dei campioni,
- l'immersione in NaOCl 1% per 2 minuti,
- l'immersione in etanolo 70% per 15 secondi,
- il risciacquo finale in H₂O sterile e asciugatura sotto cappa a flusso laminare su carta da filtro sterile.

Al fine di valutare l'avvenuta sterilizzazione superficiale dei campioni, porzioni superficiali dei tessuti sterilizzati sono state posizionate su substrato agarizzato per 30 secondi e

Materiali e metodi

successivamente rimosse. Le piastre contenenti il substrato sono state sigillate e poste in cella termostata a 25 °C, con fotoperiodo 8 ore luce, 16 ore buio. I risultati sono stati rilevati dopo 7 giorni.

6.3 Approccio dipendente dalla coltivazione

6.3.1 Isolamento

Il materiale vegetale campionato e sterilizzato come descritto nei paragrafi 6.1e 6.2 è stato sottoposto ad isolamento micologico classico. Il terreno di coltura scelto per l'isolamento è stato il PDA¹ (Potato Dextrose Agar) addizionato con ampicillina (150 µg/ml) e streptomicina (100 µg/ml) al fine di inibire la crescita di organismi batterici.

I tralci, sterilizzati, sono stati scortecciati mediante bisturi sterile, quindi, piccole porzioni di tessuto floematico di dimensioni approssimative di 3x5 mm sono state prelevate e poste in piastre Petri contenenti il substrato agarizzato (Tabella 3).

La lamina fogliare sterilizzata, è stata sezionata in porzioni di 5x5 mm mediante bisturi sterile, e le porzioni ottenute posizionate su substrato agarizzato come descritto per il tralcio (Tab. 3).

¹ PDA Conda® - 20 g/l Destrosio, 4 g/l da 200g di infuso di patate, 15 g/l di Agar Batteriologico.

“Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine”. Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte”

Materiali e metodi

Tabella 3. Tipologia e numero di isolamenti eseguiti a Luglio e Settembre del 2009 sulle medesime piante, site nei vigneti sperimentali in località Brazzacco (UD) e Cormons (GO).

Luglio 2009				
	Piante	Porzioni di tessuto vascolare di tralcio (3x5 mm)	Porzioni di lamina fogliare (3x5 mm)	Totale
Brazzacco (UD)	6 (var. Merlot)	60	60	120
Cormons (GO)	9 (var. Tocai)	60	60	120
	3 "inselvaticite" di bordo vigneto	60	60	120
				360
Settembre 2009				
	Piante	Porzioni di tessuto vascolare di tralcio 1 anno (3x5 mm)	Porzioni di tessuto vascolare di tralcio 2 anni (3x5 mm)	Totale
Brazzacco (UD)	6 varietà Merlot	30	30	60
Cormons (GO)	9 var Tocai coltivate	45	45	90
	3 "inselvaticite" bordo vigneto	15	15	30
				180

Le piastre, sigillate, sono state poste in cella termostata a 25 °C, con fotoperiodo di 8 ore luce, 16 ore buio, e monitorate a cadenza giornaliera per un periodo di 15 giorni. I miceli affioranti dai tessuti vegetali sono stati volta per volta prelevati e posizionati su nuove piastre agarizzate contenenti PCA² (Potato Carrot Agar).

6.3.2 Identificazione micologica degli isolati

I miceli, in attiva crescita sulle piastre contenenti il terreno nutritivo PCA, sono stati preliminarmente raggruppati in base all'osservazione allo stereo-microscopio delle loro caratteristiche macromorfologiche (colore, forma consistenza, margine e spessore della colonia, presenza e tipologia di strutture riproduttive). I miceli, in tal modo raggruppati sono stati quindi analizzati al microscopio ottico al fine di confrontare i caratteri tassonomici osservati con quelli descritti nelle chiavi dicotomiche e monografie (Watanabe T., 2002; Hanlin R.T., 2001; Ulloa M. and Hanlin R.T., 2001).

Da tutti gli isolati ottenuti sono stati prelevati 10 dischetti di micelio in attiva crescita su substrato agarizzato e sono stati posti in provette Eppendorf da 2 ml contenenti glicerolo 40%, per la conservazione a lungo termine a -20C. Altrettanti dischetti sono stati

² PCA – 20 g/l patate, 20 g/l carote, 20 g/l Agar Batteriologico.

"Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine". Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte"

Materiali e metodi

conservati in tubi Falcon da 10 ml contenenti H₂O distillata sterile per la conservazione a breve termine a 4°C.

6.3.3 Estrazione del DNA totale dagli isolati fungini.

Tutti i 231 isolati ottenuti sono stati sottoposti ad estrazione del DNA genomico totale utilizzando il protocollo proposto da Lecellier e Silar nel 1994 modificato in alcune sue parti.

Le colonie fungine sono state fatte crescere in purezza su una piastra Petri sterile da 90 mm di diametro contenente circa 20 ml di terreno di coltura PDA, inoculando un quadratino di micelio al centro di ogni piastra. Le piastre sono state incubate in cella termostata a 25 °C, con fotoperiodo di 8 ore luce, 16 ore buio.

Con l'ausilio di un bisturi sterile sono stati prelevati e trasferiti in mortai di ceramica sterili, 250 mg di micelio in attiva crescita ai quali sono stati aggiunti 1,75 ml di buffer di estrazione (10 mM Tris-HCl a pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% SDS). Si è proceduto alla omogeneizzazione del micelio con pestello, successivamente con una pipetta Pasteur sterile monouso si è prelevato 1 ml di ciascuna di queste soluzioni e lo si è inserito in provette Eppendorf da 2 ml. Le provette sono state agitate con il vortex, immerse per 30 secondi in azoto liquido, quindi lasciate a bagnomaria a 70°C fino allo scongelamento totale del buffer. Le provette sono state centrifugate a 10000 rpm per 10 minuti, ad una temperatura di 20°C, al fine di rimuovere le parti più grossolane, che si depositano sotto forma di pellet sul fondo. Dopo la centrifugazione, da ogni provetta, il surnatante è stato prelevato e trasferito in un'altra provetta Eppendorf da 2 ml, usando una pipetta Pasteur sterile monouso. Nelle provette si è quindi aggiunto un uguale volume di una soluzione di fenolo, cloroformio e alcool isoamilico in proporzione 25:24:1. Le provette sono state agitate accuratamente con il vortex, e centrifugate a 8000 rpm per 10 minuti a 20°C. Da ogni provetta è stato prelevato il surnatante, che è stato trasferito in un'altra provetta Eppendorf da 2 ml. A questo punto si è proceduto ad una nuova estrazione, usando un uguale volume di una soluzione di cloroformio e alcool isoamilico in proporzione 24:1 e ripetendo i passaggi sopra descritti. Completato il trasferimento della fase acquosa contenente gli acidi nucleici, questi ultimi sono stati fatti precipitare utilizzando 2/3 in volume di isopropanolo freddo (-20°C); le provette sono state invertite delicatamente e

Materiali e metodi

ripetutamente fino a vedere il DNA in precipitazione. I campioni sono stati centrifugati a 12000 rpm per 15 minuti ad una temperatura di 4°C. Dopo questa centrifuga, il DNA, precipitato come pellet, rimane adeso al fondo dei tubini: si è quindi eliminata la fase acquosa, e si è proceduto al lavaggio dei pellets con 0,5 ml di etanolo freddo (-20°C) al 70%, lasciandolo agire per 15 minuti. Le provette sono state centrifugate a 12000 rpm per 5 minuti a 4°C per far ben aderire al fondo della provetta il pellets ottenuto, prima dell'eliminazione della successiva eliminazione dell'etanolo. L'etanolo è stato eliminato svuotando le provette, ed i pellets sono stati asciugati per eliminare ogni traccia di alcool, utilizzando il liofilizzatore per circa 10 minuti.

I pellets di materiale nucleico sono stati risospesi in 400 µl di buffer TE (10 mM Tris-HCl a pH 8, 1 mM EDTA), attendendo circa 30 minuti perché risultasse completamente disciolto. Dopo una leggera agitazione con il vortex, si è proceduto ad una seconda precipitazione del materiale nucleico: sono stati aggiunti 1/10 di volume di acetato di sodio 3M, a pH 5,2, 2 volumi di etanolo freddo (-20°C) al 95% quindi le provette sono state invertite delicatamente e ripetutamente fino a vedere il DNA precipitare sotto forma di aggregato biancastro.

Le provette sono state centrifugate a 14000 rpm per 5 minuti, a 4°C, in modo da far depositare il DNA come pellet sul fondo. Si è scartata con attenzione la fase liquida, e si sono lavati i pellets utilizzando prima 0,5 ml di etanolo freddo al 70% e successivamente 0,5 ml di etanolo freddo all'80%, lasciando agire per 15 minuti e centrifugando in seguito a 12000 rpm per 5 minuti, a freddo. Dopo aver eliminato l'etanolo, si sono asciugati accuratamente i pellets nel liofilizzatore per circa 10 minuti, per rimuovere ogni traccia di alcool.

I pellets sono stati risospesi in 100 µl di buffer TE, e lasciati riposare a 4°C overnight oppure qualche ora a temperatura ambiente.

Al fine di rimuovere tacce di RNA dal campione estratto è stato eseguito un trattamento con 1 µl di RNAsi in concentrazione 10mg/ml, lasciando agire l'enzima per 1 ora a 37°C. Le provette contenenti il DNA estratto quindi sono state conservate in congelatore a -20°C.

La concentrazione e la qualità del DNA estratto è stata valutata mediante spettrofotometro Nanodrop, sono stati osservati in particolare i valori di assorbanza a 260 (assorbanza DNA), ed i rapporti 260/280 (purezza da proteine) e 260/230 (purezza da polisaccaridi).

Materiali e metodi

6.3.4 Amplificazione mediante PCR della regione ITS degli isolati endofitici fungini.

Il DNA genomico totale estratto come descritto in precedenza è stato sottoposto ad amplificazione genica tramite PCR con i primers universali per funghi ITS₁-ITS₄ (White et al., 1990) amplificanti una porzione dell'operone ribosomiale comprendente le regioni ITS₁, ITS₂ ed il gene 5,8S rDNA. I siti di annealing dei primers ITS₁/ITS₄ si trovano rispettivamente all'estremità 3' del gene 18S rDNA e all'estremità 5' del gene 28S rDNA.

Di seguito si riportano miscela di reazione e cicli di amplificazione adottati.

Tabella 4 Miscele di reazione e cicli di amplificazione adottati per i primers universali per funghi ITS₁-ITS₄ (White et al., 1990)

Miscela di reazione di PCR			Cicli di amplificazione		
	Volumi	[C] finale		T (°C)	t (s)
Acqua sterile	14,375 µl				
5X buffer (Promega, USA)	5 µl	1X			
MgCl ₂ (25 mM) (Promega, USA)	1,5 µl	1,5 mM			
dNTPs (2,5 mM) (Fermentas, LT)	2 µl	200 µM			
Primer forward (20 µM)	0,5 µl	0,4 µM			
Primer reverse (20 µM)	0,5 µl	0,4 µM			
Taq polimerasi (5 U/µl) (Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega, USA)	0,125 µl	0,625 U			
	24 µl				

38 Cicli	Denaturazione iniziale	94	120
	Denaturazione	94	60
	Annealing	55	60
	Extension	72	60
	Estensione finale	72	300

All'interno di ogni tubino contenente la miscela di reazione è stato inserito 1 µl di DNA genomico estratto da micelio alla concentrazione desiderata di 5 ng/ µl.

Ogni reazione di PCR ha previsto il caricamento oltre ai campioni da analizzare di un controllo negativo, sola miscela di reazione, e di un controllo positivo, DNA estratto da micelio, precedentemente validato.

Le reazioni di PCR sono state eseguite in Termociclature Euro Clone® One Advanced.

Per verificare i prodotti ottenuti dalla reazione di PCR, sono stati prelevati 5 µl di ciascun campione, e sono stati addizionati con 1 µl di colorante 6x loading dye Type1 (costituito da blu di bromofenolo 0.25% [W/V], xilene cianolo FF 0.25% [W/V] e 40% di saccarosio [W/V]). La miscela così ottenuta è stata sottoposta ad elettroforesi in gel di agarosio 1%, in tampone TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA ph 8.0) con una differenza di

Materiali e metodi

potenziale di 100 V per un'ora, in una cella elettroforetica orizzontale (Wide Mini-SubCell GT, BIO-RAD, USA).

Il gel d'agarosio è stato precedentemente preparato mediante discioglimento di 1 g di agarosio in polvere (Low EEO Pronadisa CONDA) in 100 ml di TAE 1X. Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato il Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Lituania) ed il gel è stato colorato aggiungendo direttamente 0,5 µl GelRed™ 10.000X (Biotium Inc., CA, USA) alla miscela di 100 ml di 1X TAE ed agarosio. Dopo, la corsa elettroforetica gli amplificati sono stati visualizzata con il transilluminatore (UVP) a raggi U.V. e l'immagine su transilluminatore è stata catturata grazie al sistema di acquisizione immagini DigiDoc-It (UVP). Tutti gli amplificati ottenuti dalla regione ITS degli isolati fungini sono stati sottoposti ad analisi RFLP (Cap. 6.5).

6.4 Approccio indipendente dalla coltivazione

Al fine di descrivere la comunità endofitica fungina non coltivabile o non coltivata mediante l'approccio micologico classico si è proceduto all'analisi della comunità endofitica a partire da DNA genomico totale estratto direttamente dai tessuti vegetali di vite (*Vitis vinifera L.*).

6.4.1 Estrazione DNA genomico totale da piante. (*Vitis vinifera L.*)

Il materiale vegetale da tralcio campionato nei mesi di Luglio e di Settembre 2009 nei vigneti di Brazzacco (UD) e Cormons (GO), descritto nel capitolo 6.1 è stato sottoposto ad estrazione del DNA genomico totale utilizzando il protocollo proposto da Doyle e Doyle (1990) modificato in alcune sue parti (Martini et al., 2009). I tralci sono stati campionati e sterilizzati come descritto nei paragrafi 6.1 e 6.2, dopo lo scortecciamento, 0.6 g di tessuto floematico è stato prelevato e stoccato immediatamente in congelatore a -20 °C al fine di limitare il più possibile alterazioni ossidative degradative. Il materiale così raccolto è stato utilizzato per la costituzione di "Pool" di tessuti floematici da tralcio come riportato in Tabella 5.

Materiali e metodi

Tabella 5 Composizione dei "Pool" di tessuti floematici da tralcio

Località	Tipologia di Piante	Pianta	"Pool"	Tessuto floematico da tralcio [g]	
Brazzacco	Coltivate, Var Merlot	1	1	0,6	
		2		0,6	
		3		0,6	
		4	2	0,6	
		5		0,6	
		6		0,6	
Cormons	Coltivate var. Tocai	1	3	0,6	
		2		0,6	
		3		0,6	
		4	4	0,6	
		5		0,6	
		6		0,6	
		7	5	0,6	
		8		0,6	
		9		0,6	
	"inselvatiche" di bordo vigneto.		1	6	0,6
			2		0,6
			3		0,6

Le tre aliquote da 0.6 g di tessuto vascolare da tralcio come descritte in tabella 5 sono state poste in mortai di ceramica sterile, frantumate fino a completa polverizzazione mediante pestello e con azoto liquido. Si sono aggiunti 10 ml di buffer di estrazione contenente CTAB al 2,5% (100 mM Tris-HCl a pH 8,0; 1,4 M NaCl; 50 mM EDTA a pH 8,0; 2,5% CTAB; 1% PVP-40; 0,2% 2-mercaptoethanol) preriscaldato a 65°C, e si è omogeneizzato il tessuto frantumato. Tre aliquote da 1 ml della soluzione così ottenuta sono state trasferite rispettivamente in 3 provette Eppendorf da 2 ml e incubate a bagnomaria a 65°C per 35 minuti, agitandolo con il vortex ogni 10 minuti. I tubini sono stati raffreddati a temperatura ambiente, e si è aggiunto un ugual volume di una soluzione di cloroformio : alcool isoamilico 24:1; i campioni sono stati agitati accuratamente con il vortex, poi centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C. La fase acquosa è stata prelevata e inserita in una nuova provetta Eppendorf da 2 ml, e gli acidi nucleici sono stati fatti precipitare utilizzando 2/3 in volume di isopropanolo freddo (-20°C). I campioni sono stati quindi centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti ad una temperatura di 4°C. Si è eliminata la fase acquosa, e si è proceduto al lavaggio del pellet con 0,5 ml di etanolo freddo (-20°C) al 70%, lasciandolo agire per 15 minuti, poi si è centrifugata la provetta a 12000 rpm per 5 minuti a 4°C. L'etanolo è stato eliminato svuotando la provetta, ed il pellet è stato asciugato per eliminare ogni traccia di alcool, utilizzando il liofilizzatore per circa 10 minuti.

Il pellet di DNA è stato risospeso in 400 µl di buffer TE (10 mM Tris-HCl a pH 8, 1 mM EDTA), attendendo circa 30 minuti perché risulti essere completamente disciolto.

Materiali e metodi

Dopo una leggera agitazione con il vortex, si è proceduto ad una nuova precipitazione del DNA: si sono aggiunti 1/10 di volume di NaOAc 3M, a pH 5,2, mescolando bene la soluzione, e 2 volumi di etanolo freddo (-20°C) al 95%: le provette sono state invertite delicatamente e ripetutamente fino a vedere il DNA precipitare a dare un aggregato biancastro.

Le provette sono state centrifugate a 14000 rpm per 3 minuti, a 18°C, in modo da far depositare il DNA come pellettato sul fondo. Si è scartata con attenzione la fase liquida, e si è lavato il pellet utilizzando 0,5 ml di etanolo freddo al 70% e successivamente 0,5 ml di etanolo freddo all'80%, lasciando agire ciascuna soluzione per 15 minuti e centrifugando in seguito a 12000 rpm per 5 minuti, a freddo. Dopo aver eliminato l'etanolo dell'ultimo lavaggio, si è asciugato accuratamente il pellet nel liofilizzatore per circa 10 minuti, per rimuovere ogni traccia di alcool.

Il pellet è stato risospeso in 100 µl di buffer TE, e lasciato riposare a 4°C overnight oppure qualche ora a temperatura ambiente. Infine è stato fatto un trattamento con 1 µl di RNAsi in concentrazione 10mg/ml, lasciando agire l'enzima per 1 ora a 37°C. Il DNA estratto è stato conservato in freezer a -20°C.

6.4.2 Scelta dei primers selettivi per il DNA fungino ed escludenti il DNA della pianta.

Dall'estrazione del DNA a partire da materiale vegetale si ottiene il DNA genomico della pianta unitamente al DNA di tutti gli organismi eventualmente presenti all'interno dei tessuti processati. Dopo l'estrazione del DNA si sono quindi rivelate necessarie la scelta e la verifica di primers in grado di amplificare selettivamente la regione genomica ITS del DNA fungino estratto escludendo l'amplificazione del DNA della pianta.

Le coppie di primers testate e le rispettive temperature di annealing sono riportate nella Tabella 6:

Tabella 6 Coppie di primers usate in PCR per amplificare selettivamente la regione ITS del genoma di organismi fungini, con le rispettive temperature di annealing adottate.

PCR		
Primer Forward	Primer reverse	Ta* (°C)
ITS1F	ITS4 <small>(White <i>et al.</i>, 1990).</small>	55

Materiali e metodi

(Gardes e Bruns, 1993).	NLC ₂ (Martin & Rygiewicz, 2005)	56
	NLB ₄ (Martin & Rygiewicz, 2005)	55
NSI ₁ (Martin & Rygiewicz, 2005)	ITS ₄ (White <i>et al.</i> , 1990).	55
	NLB ₄ (Martin & Rygiewicz, 2005)	52
NSA ₃ (Martin & Rygiewicz, 2005)	NLC ₂ (Martin & Rygiewicz, 2005)	58
	ITS ₄ (White <i>et al.</i> , 1990).	55
FF390 (Vainio E.J & Hantula J 1999)	ITS ₄ (White <i>et al.</i> , 1990).	56
	NLC ₂ (Martin & Rygiewicz, 2005)	56
	NLB ₄ (Martin & Rygiewicz, 2005)	56
	ITS ₂ (White <i>et al.</i> , 1990)	56

Tutte le coppie di primers precedentemente individuate, con le rispettive temperature di annealing sono state impiegate in reazioni di PCR utilizzando come ciclo di amplificazione 94°C di denaturazione iniziale per 2 minuti seguito da 35 cicli di denaturazione a 94°C per 5 min, annealing per 40 secondi, estensione a 72 °C per 40 secondi ed estensione finale a 72 °C per 10 minuti. La miscela di reazione utilizzata è stata costituita come indicato in Tabella 7.

Tabella 7 Miscela di reazione di PCR utilizzata per la verifica di specificità di reazione delle diverse coppie di primers.

Reagenti	Volumi	[C] finale
Acqua sterile	14,375 µl	
5X buffer (Promega, USA)	5 µl	1X
MgCl ₂ (25 mM) (Promega, USA)	1,5 µl	1,5 mM
dNTPs (2,5 mM) (Fermentas, LT)	2 µl	200 µM
Primer forward (20 µM)	0,5 µl	0,4 µM
Primer reverse (20 µM)	0,5 µl	0,4 µM
Taq polimerasi (5 U/µl) (Go Taq Flexi DNA	0,125 µl	0,625 U

“Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine”. Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte”

Materiali e metodi

Polymerase (Promega, USA)		
	24 μ l	

Ogni serie di reazioni di PCR per la verifica della specificità dei primers nei confronti del DNA fungino ha previsto il caricamento nei tubini contenenti la miscela di reazione di:

- 1 μ l di DNA genomico alla concentrazione di 5 ng/ μ l estratto da micelio puro di diversi isolati endofitici fungini come controllo positivo di reazione,
- 1 μ l DNA, estratto da viti micropropagate presumibilmente "endophyte free" alla concentrazione di 20 ng/ μ l come controllo di specificità per il DNA fungino
- un controllo negativo di reazione contenente esclusivamente la miscela di reazione.

Le reazioni di PCR sono state condotte in Termociclatore Euro Clone® One Advanced.

La verifica dei prodotti ottenuti dalla reazione di PCR è stata eseguita con la medesima procedura descritta nel paragrafo 6.3.4.

E' stata inoltre allestita una reazione di nested PCR al fine di incrementare la detection di endofiti fungini escludendo l'amplificazione del DNA della pianta, utilizzando per il primo step di amplificazione i primers NSA3 / NLC2 alle seguenti condizioni di reazione:

94°C di denaturazione iniziale per 2 minuti , 35 cicli di denaturazione a 94°C per 50 secondi, annealing per 40 secondi, estensione a 72 °C per 40 secondi ed estensione finale a 72 °C per 10 minuti.

- 1 μ l di prodotto amplificato ottenuto dal primo step, a seguito di diluizione 1:50, è stato caricato nella miscela di reazione contenente la seconda coppia di primers NSI1/NLB4 (Martin & Rygiewicz, 2005) alle stesse condizioni di PCR sopra riportate eccetto che per la temperatura di annealing modificata a 52 °C. La miscela di reazione per entrambe le reazioni è stata quella riportata in Tabella 7.

Le reazioni di PCR sono state condotte in Termociclatore Euro Clone® One Advanced e la verifica dei prodotti ottenuti dalla reazione di PCR è stata eseguita con la medesima procedura descritta nel paragrafo 6.3.4.

6.4.3 Amplificazione e clonaggio della regione ITS di specie fungine presenti in materiale vegetale

L'approccio indipendente dalla coltivazione, al fine di discriminare gli organismi fungini presenti all'interno del materiale vegetale di vite, utilizza il clonaggio molecolare.

Materiali e metodi

Al fine di rilevare la massima biodiversità possibile in vite i "Pool" di tessuto floematico da tralcio, costituiti secondo quanto riportato in Tabella 5 ed estratti secondo quanto descritto nel paragrafo 6.4.1 sono stati sottoposti ad amplificazione di PCR e clonaggio molecolare.

E stata allestita una reazione di PCR usando i primers universali per i funghi ITS1F (Gardes e Bruns, 1993) ITS4 (White *et al.*, 1990), utilizzando la miscela di reazione riportata in Tabella 8:

Tabella 8 Miscela di reazione di PCR impiegata in reazione con i primers universali per funghi ITS1-F/ITS4.

	Volumi	[C] finale
Acqua sterile	28.75 µl	
5X buffer (Promega, USA)	10 µl	1X
MgCl ₂ (25 mM) (Promega, USA)	3 µl	1,5 mM
dNTPs (2,5 mM) (Fermentas, LT)	4 µl	200 µM
Primer forward (20 µM)	1 µl	0,4 µM
Primer reverse (20 µM)	1 µl	0,4 µM
<i>Taq</i> polimerasi (5 U/µl) (Go <i>Taq</i> Flexi DNA Polymerase (Promega, USA)	0,25 µl	0,025 U/ µl
Volume finale	48 µl	

Alla miscela di reazione sono stati aggiunti

- a. 2 μl di DNA ottenuto miscelando 1 μl di DNA estratto dal "Pool 1 (Cap 6.4.1; Tabella 5) e 1 μl di DNA estratto dal "Pool" 2 (Cap 6.4.1; Tabella 5), diluiti alla concentrazione 20 ng/ μl ciascuno. I "Pool" sono stati miscelati insieme in quanto associati, e in rappresentanza di piante coltivate di varietà Merlot in Località Brazzacco (UD)
- b. 2 μl di DNA ottenuto miscelando 0.6 μl di DNA estratto dal "Pool" 3 (Cap 6.4.1; Tabella 5), 0.6 μl di DNA estratto dal "Pool" 4 (Cap 6.4.1; Tabella 5) e 0.6 μl di DNA estratto dal "Pool" 5 (Cap 6.4.1; Tabella 5) diluiti alla concentrazione 20 ng/ μl ciascuno. I "Pool" sono stati miscelati insieme in quanto associati, e in rappresentanza, di piante coltivate varietà Tocai in Località Cormons (GO).
- c. 2 μl di DNA estratto dal "Pool" 6 (Cap 6.4.1; Tabella 5), diluito alla concentrazione 20 ng/ μl in rappresentanza, di piante "inselvaticite" di bordo vigneto Località Cormons (GO).

Il ciclo approntato per la reazione di PCR è stato il seguente: 94°C di denaturazione iniziale per 2 minuti , 35 cicli di denaturazione a 94°C per 50 secondi, annealing a 55°C per 40 secondi, estensione a 72 °C per 40 secondi, seguiti da estensione finale a 72 °C per 10 minuti.

Alla reazione sono stati aggiunti inoltre un controllo negativo e un controllo positivo, consistente in DNA fungino puro già amplificato in precedenti reazioni.

I prodotti della PCR, dopo essere stati visualizzati in gel di agarosio 1%, sono stati purificati usando il kit commerciale Wizard® SV gel and PCR Clean-up System (Promega, Madison WI, USA), secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice. Il clonaggio molecolare è stato eseguito mediante il Kit pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison WI, USA). Il vettore di clonaggio, impiegato è stato quindi il plasmide pGEM®-T (Promega, Madison WI, USA), in cui sono stati inseriti i frammenti amplificati con la PCR attraverso una reazione di "ligation". Due reazioni di ligasi sono state approntate, utilizzando 2 μl di amplificato di PCR per ciascuna delle tre reazioni di PCR descritte in precedenza (Punti a , b, c) utilizzando la miscela di reazione descritta in (Tabella 9).

Tabella 9 Miscela di reazione indicata per la reazione di ligasi mediante Kit pGEM®-T Easy Vector Systems

2X Rapid Ligation buffer	5 µl
pGEM®-T Vector	1 µl
Prodotti di PCR	2 µl
T ₄ DNA Ligasi (3Weiss units/µl)	1 µl
Nuclease free Water	1 µl
Totale	10 µl

La miscela è stata lasciata incubare overnight a 4°C, per avere il massimo numero di plasmidi trasformati.

L'organismo ospite in cui sono stati inseriti i plasmidi è stato *Escherichia coli* JM109; si sono utilizzate cellule competenti ad alta efficienza (Promega, Madison, USA).

Per la trasformazione e selezione dei cloni ricombinanti si è seguito il protocollo della casa produttrice. Una volta ottenute le cellule competenti trasformate, 100 µl di sospensione delle stesse in terreno di coltura liquido SOC Medium³ sono state trasferite in piastre Petri contenenti il terreno di coltura selettivo LB medium addizionato con ampicillina, IPTG, X-Gal⁴. Per l'analisi dei cloni ricombinanti, 47 colonie per reazione di ligasi, 282 colonie in totale, individuate tra quelle di colore bianco, sono state trasferite con un'ansa sterile su nuove piastre Petri contenenti il terreno di crescita selettivo LB/ampicillina/IPTG/X-Gal. Le piastre sono state poste in incubatore a 37°C per 16 ore e alla fine del periodo di incubazione. Le 282 colonie bianche ottenute sono state sottoposte a colony-PCR prelevandole e trasferendole con un'ansa sterile in plastica in provette Eppendorf da 500 µl contenenti 100 µl di acqua sterile. La soluzioni così ottenute sono state sottoposta a bollitura a 99°C per 10 minuti, successivamente 1 µl della sospensione, è stato utilizzato come DNA stampo per una reazione di PCR. La miscela di reazione è stata preparata come indicato in precedenza, e come primers è stata utilizzata la coppia ITS1F (Gardes e Bruns, 1993) ITS4 (White *et al.*, 1990). I prodotti di PCR sono stati visualizzati in gel di agarosio 1%.

³ SOC medium (100ml) 2.0g Bacto®-tryptone; 0.5g Bacto®-yeast extract; 1ml 1M NaCl 0.25ml 1M KCl; 1ml 2M Mg₂; 1ml 2M glucose,

⁴ 100mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside in 2ml N,N-dimethyl-formamide

Materiali e metodi

Le colonie batteriche ottenute sono state inoltre inoculate in provette contenenti in terreno di coltura liquido LB, poste in incubatore a 37°C per 16 ore. Alla fine del periodo di incubazione 300 µl di sospensione di cellule competenti in attiva moltiplicazione sono state poste in un volume di 600 µl di glicerolo (60%) in criotubi da 1.2 ml e conservate in congelatore a -80°C.

6.5 Analisi RFLP dei prodotti di PCR delle regioni ITS ottenute dai due approcci dipendente e indipendente dalla coltivazione ottenute e generazione di OTU's.

I frammenti di DNA amplificati mediante reazione di PCR, con i primers ITS₁-ITS₄ a partire da DNA estratto da micelio fungino (Par. 6.3.3), sono stati sottoposti ad analisi RFLP utilizzando l'enzima *Tru1* (10 U/µl, Fermentas, Lituania) avente come sito di restrizione la sequenza (...T[▼]TAA...; ...AAT[▲]T...).

Parallelamente, anche i frammenti di DNA amplificati mediante reazione di PCR con i primers ITS_{1F}-ITS₄ a partire da cloni (Par 6.4.3) sono stati sottoposti a restrizione enzimatica, utilizzando in questo caso due endonucleasi restrizione; *Tru1* (10 U/µl, Fermentas, Lituania) avente come sito di restrizione la sequenza (...T[▼]TAA...; ...AAT[▲]T...) e *HpaII* (10 U/µl, Fermentas, Lituania, che riconosce la sequenza di taglio 5'... C[▼]CGG...3' 3'...GGC[▼]C...5' per ottenere una maggiore precisione nella generazione dei raggruppamenti molecolari.

La miscela di reazione utilizzata per tutte le reazioni enzimatiche è stata la seguente: H₂O sterile 12,75 µl, 10x Buffer 2 µl, endonucleasi di restrizione 0,25 µl, per un volume totale di 15µl, a cui sono stati aggiunti 5 µl di DNA amplificato. L'incubazione è avvenuta overnight, in bagnetto termostato a 65°C per l'endonucleasi *Tru1* e a 37 °C per l'endonucleasi *Hpa2*. Allo scopo di impedire l'evaporazione della miscela di reazione, in particolar modo per l'enzima *Tru1*, prima dell'incubazione in bagnetto termostato (PID System M418-BM MPM Instrument, IT) è stata aggiunta una goccia di olio minerale ad ogni tubino di reazione. Al termine del periodo di incubazione, i campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi orizzontale, in cella elettroforetica (Wide Mini-SubCell GT, BIO-RAD, USA).

È stato utilizzato gel di agarosio al 2%, preparato aggiungendo 2 g di agarosio a 100 ml di tampone TBE 1X (45 mM Tris-borate, 1mM EDTA pH 8.0) e addizionandovi 1,3 µl di GelRed. La differenza di potenziale applicata è stata di 100 V per 1.40 ore. Alla fine della corsa, il gel è stato visualizzato tramite il transilluminatore U.V. e l'immagine è stata catturata grazie al sistema di acquisizione immagini DigiDoc-It (UVP).

Materiali e metodi

I profili RFLP ottenuti a partire da DNA estratto da micelio fungino sono stati generati mediante i primers ITS₁-ITS₄, universali per funghi e quindi particolarmente adatti allo studio di colonie fungine pure. I profili RFLP ottenuti a partire da DNA genomico totale estratto da pianta e sottoposto a clonaggio molecolare, sono stati generati utilizzando i primers ITS_{1F}-ITS₄ selettivi per i funghi e scelti previa prove di specificità (Par. 6.4.2). Al fine di operare gli opportuni confronti, è stato necessario uniformare i dati amplificando i rappresentanti dei diversi raggruppamenti micologico-molecolari con la coppia di primers ITS_{1F}-ITS₄ alle medesime condizioni descritte nel Paragrafo 6.4.3 e sottoponendoli a restrizione enzimatica con entrambe le endonucleasi di restrizione *Tru1* e *Hpa1*.

Tutti i profili di restrizione generati hanno reso possibile:

- la conferma dei raggruppamenti morfologici eseguiti sugli isolati fungini (approccio dipendente da coltivazione), e l'associazione degli stessi ad un profilo di restrizione
- l'individuazione di variabilità genetica utile ad operare una più fine differenziazione all'interno dei raggruppamenti morfologici eseguiti sugli isolati fungini, generando dei nuovi raggruppamenti in questo caso molecolari
- la generazione di ulteriori raggruppamenti molecolari analizzando i cloni ricombinanti provenienti dall'approccio indipendente da coltivazione.

Tutti i raggruppamenti molecolari citati, possono essere definiti come OTU's (operational taxonomic unit) e rappresentano una proposta di classificazione degli organismi in nostro possesso in funzione del marcatore tassonomico esaminato, nella fattispecie la regione ITS amplificata tramite PCR e analizzata mediante RFLP.

6.6 Sequenziamento delle regioni ITS ottenute da isolamento micologico classico (approccio dipendente da coltivazione), clonaggio molecolare (approccio indipendente da coltivazione) e analisi BLAST delle sequenze.

Un isolato endofitico fungino rappresentativo di ogni OTU's ottenuta mediante approccio dipendente dalla coltivazione e uno, due o più (dove possibile) cloni rappresentativi di ogni OTU's ottenuta mediante approccio indipendente dalla coltivazione, sono stati scelti per procedere al sequenziamento della regione ITS. I DNA così individuati sono stati sottoposti a reazione di PCR con primers ITS₁/ITS₄ (isolati fungini) e con primers ITS_{1F}-ITS₄ (cloni) utilizzando in entrambi i casi un volume totale di 50 µl come descritto nel paragrafo 6.4.3, in Tabella 8. I cicli di PCR sono stati quelli descritti nel paragrafo 6.3.4 Tabella 4 per la coppia di

Materiali e metodi

primers ITS₁-ITS₄ e nel paragrafo 6.4.3 Tabella 8 per la coppia ITS₁F-ITS₄. I prodotti amplificati sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di agarosio 1%. La purificazione è stata effettuata con l'utilizzo del kit commerciale Wizard SV gel and PCR Clean-up System (Promega, USA), seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. I prodotti della purificazione sono stati sottoposti ad una corsa elettroforetica su gel di agarosio, con 4 µl di DNA e 1 µl di colorante e successiva visualizzazione al transilluminatore U.V., per verificare la buona riuscita del procedimento. La concentrazione del DNA purificato è stata determinata con nanodrop; sapendo che per il sequenziamento è necessaria una quantità di DNA pari a 9 ng ogni 100 paia di basi (bp), sono state eseguite le opportune diluizioni.

I prodotti di PCR, così preparati, sono stati inviati al laboratorio Ylichron (c/o ENEA Casaccia, Roma, IT).

Il primer usato per entrambe le reazioni di sequenziamento è stato ITS₄ (9 pmol/µl).

Il sequenziamento è avvenuto tramite BigDye Terminators, in cui è prevista la marcatura fluorescente di ciascun ddNTP, e polimerasi; lo strumento utilizzato è stato il sequenziatore ABI 3730, (Applied Biosystems, USA).

Per l'analisi delle sequenze si è utilizzato il software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) della NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), in grado di individuare similarità tra la sequenza del campione analizzato e le sequenze di DNA presenti nella banca dati GenBank.

Le sequenze ottenute sono state analizzate mediante software Bioedit al fine di individuare mutazioni a singolo nucleotide tra OTU's strettamente correlate.

6.7 Analisi filogenetica sulla base della regione ITS degli endofiti fungini ottenuti dai due approcci, dipendente e indipendente dalla coltivazione.

Al fine di mettere in luce le relazioni filogenetiche tra gli endofiti fungini ottenuti mediante i due approcci dipendente e indipendente dalla coltivazione, tutte le sequenze, sono state sottoposte ad analisi filogenetica. Sono state utilizzate inoltre sequenze ricavate da GenBank selezionate tra quelle aventi elevata similarità di sequenza con quelle in nostro possesso e rappresentati quindi organismi strettamente correlati provenienti possibilmente da collezioni di culture pure ben identificate (Tabella 10) quali CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*), ATCC (*American Type Culture Collection*), BCCM /MUCL (*Mycoteque de*

Materiali e metodi

l'Universite Catholique de Louvain), MUT (Mycotheca Universitatis Taurinensis), NRRL (Agricultural Research Service Culture Collection).

Materiali e metodi

Tabella 10 Elenco delle sequenze ITS di tutti i ceppi endofitici fungini ottenuti mediante approccio dipendente e indipendente dalla coltivazione nonché di quelle ottenute da GenBank relative ad organismi fungini strettamente correlati, utilizzate per l'analisi filogenetica.

Codice Sequenza ITS	Organismo	Accession number	Colture collection
1a	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	HQ607815.1	
1b	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JF440584.1	
1bcl	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JF440584.1	
1acl	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JF440584.1	
1fcl	<i>Aureobasidium proteae</i>	JN712490.1	CPC 13701
1gcl	<i>Aureobasidium proteae</i>	JN712490.1	CPC 13701
2e	<i>Aureobasidium proteae</i>	JN712490.1	CPC 13701
1c	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	FJ614639.1	ATCC MYA-3965
1ccl	<i>Camarosporium brabeji</i>	EU552105.1	CBS 123026
1d	<i>Camarosporium brabeji</i>	EU552105.1	CBS 123026
5gcl	<i>Camarosporium brabeji</i>	EU552105.1	CBS 123026
1e	<i>Diaporthe rhusicola</i>	JF951146.1	CPC:18191
1f	<i>Pleospora herbarum</i> var. <i>herbarum</i>	EF452449.1	CBS 191.86
1g	<i>Nemania chestersii</i>	AJ390430.1	
1h	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	JF439492.1	
1dcl	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	HQ999974.1	ATCC MYA-4697
2a	<i>Chalastospora ellipsoidea</i>	FJ839608.1	CBS 121331
4d	<i>Drechslera siccans</i>	AY004797.1	DAOM 115701
2b	<i>Didymella phacae</i>	EU167570.1	CBS 184.55
2c	<i>Pilidium concavum</i>	GU126750.1	ATCC 90142
2d	<i>Sordaria fimicola</i>	GU966520.1	
4e	Uncultured <i>Hypocreales</i>	JF449870.1	
2f	<i>Phoma herbarum</i>	AB470886.1	
2g	<i>Sordariomycete</i>	EU680529.1	
2h	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	FJ459945.1	
2bcl	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	FJ459945.1	
2ecl	<i>Epicoccum nigrum</i>	JF440590.1	
3a	<i>Epicoccum nigrum</i>	JF440590.1	
2dcl	<i>Epicoccum nigrum</i>	JN689342.1	
2acl	<i>Morinia pestalozzioides</i>	AY929325.1	
2fcl	<i>Morinia pestalozzioides</i>	AY929325.1	
2gcl	<i>Morinia pestalozzioides</i>	AY929325.1	
3b	<i>Morinia pestalozzioides</i>	AY929325.1	
3acl	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	HM008931.1	
2hcl	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	JF499839.1	CPC 18224
3c	<i>Cladosporium</i> sp.	FJ176478.1	
3bcl	<i>Epicoccum nigrum</i> strain	FJ424241.1	ATCC 62191
3d	<i>Epicoccum nigrum</i> strain	FJ424241.1	ATCC 62191
3ccl	<i>Alternaria alternata</i>	HQ263343.1	ATCC MYA-4642
3e	<i>Alternaria alternata</i>	HQ263343.1	ATCC MYA-4642
3f	<i>Sclerostagonospora opuntiae</i>	FJ605260.1	
3f	Uncultured <i>Pleosporales</i> clone	JF449858.1	
3ecl	<i>Phoma</i> sp.	JN578625.1	
3g	<i>Phoma</i> sp.	JN578625.1	
3fcl	<i>Phoma</i> sp.	HE608801.1	
3h	<i>Peyronellaea glomerata</i>	HQ380779.1	
4a	<i>Peyronellaea glomerata</i>	HQ380779.1	
4b	<i>Arthrinium</i> sp.	AB470892.1	
4c	<i>Camarosporium leucadendri</i>	EU552106.1	CBS 123027

"Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine". Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte"

Materiali e metodi

4bcl	<i>Uncultured fungus clone</i>	GU721780.1	
4ccl	<i>Uncultured fungus clone</i>	GU721780.1	
4dcl	<i>Lophiostoma sp.</i>	FJ372389.1	CBS 123543
4ecl	<i>Neofabraea alba</i>	AF141190.1	CBS452.64
4fcl	<i>Neofabraea alba</i>	AF141190.1	CBS452.64
4hcl	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	HM008931.1	
7dcl	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	HM008931.1	
4gcl	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	HM148072.1	CBS 171.52
5acl	<i>Neofabraea alba strain</i>	AF141190.1	CBS452.64
5ccl	<i>Alternaria triticina strain</i>	AY714476.1	MUCL 44210
5bcl	<i>Fungal sp.</i>	HQ166323.1	
5dcl	<i>Rhodotorula sp.</i>	AF444615.1	NRRL Y-17502
5hcl	<i>Uncultured Pezizomycotina</i>	JF449459.1	
6acl	<i>Uncultured Pezizomycotina</i>	JF449459.1	
6ccl	<i>Leptosphaeria sp.</i>	HQ914824.1	
6dcl	<i>Kabatina thujae</i>	AF013226.1	
6ecl	<i>Kabatina thujae</i>	AF013226.1	
6gcl	<i>Morinia pestalozzioides</i>	AY929325.1	
6fcl	<i>Malassezia restricta</i>	EU400587.1	
7acl	<i>Eutypella scoparia</i>	AF373064.1	MUT 485
6hcl	<i>Eutypella scoparia</i>	AF373064.1	MUT 485
7bcl	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JF440584.1	
7ccl	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JF440584.1	
7fcl	<i>Botryosphaeria sp.</i>	EU330628.1	
7gcl	<i>Articulospora proliferata</i>	FJ000395.1	
7hcl	<i>Articulospora proliferata</i>	FJ000395.1	
8acl	<i>Cyphellopsis anomala</i>	AY571036.1	
8bcl	<i>Cyphellopsis anomala</i>	AY571036.1	
8ccl	<i>Uncultured Phaeosphaeria clone</i>	FN868448.1	
8dcl	<i>Uncultured Phaeosphaeria clone</i>	JF449769.1	
5ecl	<i>Uncultured fungus clone</i>	GU817159.1	
8eis	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	HM849615.1	
8eis	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	FJ810516.1	ATCC MYA-4521

Le sequenze nucleotidiche, di lunghezza pari a 462-466 paia di basi, sono state allineate usando CLUSTAL, versione 5, ed il software DNASTAR's Laser Gene (DNASTAR, Madison, WI, USA). L'analisi filogenetica è stata condotta con Mega5 (Tamura *et al.*, 2011).

L'analisi è stata svolta con il metodo Neighbour joining, usando come out-groups un ceppo di *Phytophthora infestans* Oomycetes L'analisi di confidenza (Bootstrap 1000) è servita per stimare la stabilità dei gruppi filogenetici ottenuti.

7. Sviluppo di un metodo molecolare per il fingerprinting della comunità endofitica fungina di viti sane infette o recovered da Legno nero (LN)

"Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine". Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte"

Materiali e metodi

7.1 Messa a punto protocollo DGGE

Al fine di eseguire il fingerprinting della comunità endofitica fungina presente in viti sane infette o recovered da legno nero si è scelto di utilizzare la tecnica di fingerprinting DGGE (Denaturant Gradient Electrophoresis). Tale metodo consente la discriminazione degli ampliconi di PCR di medesima lunghezza ma di differente composizione in basi.

7.1.1 Scelta dei primers e delle condizioni di PCR.

Sono state valutate due coppie di primers, proposte in letteratura in lavori riguardanti analisi di fingerprinting DGGE, aventi come sito di annealing le regioni conservate del gene 18S rDNA, 5.8S rDNA e 28S rDNA ed amplificanti le regioni interspaziatrici ITS1 e ITS2 (Tabella 11).

Tabella 11 Sequenze nucleotidiche dei primers di PCR impiegati nella messa a punto dell'analisi di fingerprinting DGGE.

	Primer	Direzione primer	Sequenza Primer (5'-3')	Regione amplificata
1	ITS1F- <u>GC</u>	Forward	<u>CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG</u> <u>G</u> CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS ₁
	ITS2	Reverse	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	
2	ITS3	Forward	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ITS ₂
	ITS4- <u>GC</u>	Reverse	<u>CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG</u> <u>G</u> TCCTCCGCTTATTGATATGC	
La sequenza sottolineata rappresenta la GC-clamp incorporata nel primer				

Le coppie di primers riportate in tabella sono state testate in una gradient-PCR al fine di individuare la temperatura ottimale di annealing, utilizzando le seguenti condizioni di amplificazione (Tabella 12):

Tabella 12: Condizioni di amplificazione impiegate in gradient PCR per le copie di primers ITS₁F-GC/ITS₂ ITS₃/ITS₄-GC

Ciclo di amplificazione		ITS ₁ F-GC/ITS ₂		ITS ₃ /ITS ₄ -GC	
		T (°C)	t	T (°C)	t
Denaturazione iniziale		94	2 min	94	2 min
35 Cicli	Denaturazione	94	50 s	94	50 s
	Annealing	52-55-57-60		52-55-57-60	
	Extension	72	40 s	72	40 s
Estensione finale		72	20 min	72	20 min

La reazione di gradient-PCR, per ogni temperatura testata, è stata condotta, adottando la miscela di reazione descritta in Tabella 13 su aliquote da 1 µl di DNA, alla concentrazione di 5 ng/µl estratte da 4 diversi miceli fungini, impiegando inoltre un controllo negativo di reazione contenente la sola miscela di reazione.

Tabella 13: Miscela di reazione impiegata nell'analisi gradient PCR.

Miscela di reazione di PCR		
	Volumi	[C] finale
Acqua sterile	14,375 µl	
5X buffer (Promega, USA)	5 µl	1X
MgCl ₂ (25 mM) (Promega, USA)	1,5 µl	1,5 mM
dNTPs (2,5 mM) (Fermentas, LT)	2 µl	200 µM
Primer forward (20 µM)	0,5 µl	0,4 µM
Primer reverse (20 µM)	0,5 µl	0,4 µM
Taq polimerasi (5 U/µl) (Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega, USA)	0,125 µl	0,625 U
Volume finale	24 µl	

Le temperature ottimali di annealing individuate per entrambe le coppie di primers, ITS₁F-GC/ITS₂ e ITS₃/ITS₄-GC, sono state così utilizzate nell'allestimento di una nuova reazione di PCR secondo quanto riportato in Tabella 14 al fine di valutare l'amplificazione selettiva da parte dei primers della regione genomica ITS del DNA fungino escludendo l'amplificazione del DNA della pianta.

Tabella 14: Condizioni di amplificazione impiegate in PCR per le copie di primers ITS₁F-GC/ITS₂ ITS₃/ITS₄-GC

		ITS ₁ -F-GC/ITS ₂		ITS ₃ /ITS ₄ -GC	
Ciclo di amplificazione		T (°C)	t	T (°C)	t
Denaturazione iniziale		94	2 min	94	2 min
Denaturazione	38 Cicli	94	45 s	94	50 s
Annealing		55	30 s	57	40 s
Extension		72	1 min	72	40 s
Estensione finale		72	20 min	72	20 min

La reazione di PCR è stata condotta, adottando la miscela di reazione riportata in Tabella 13 su aliquote da 1 µl di DNA, alla concentrazione di 5 ng/µl estratte da 29 diversi miceli fungini, su aliquote di 1µl di DNA estratte da tessuto floematico di 6 viti presumibilmente "endophyte free" alla concentrazione di 20 ng/µl, e su un controllo negativo di reazione contenente la sola la miscela di reazione.

7.1.2 Analisi PCR con i primers ITS₁F-GC/ITS₂ su DNA di endofiti fungini ottenuti mediante i due approcci dipendente ed indipendente dalla coltivazione.

La coppia di primers ITS₁F-GC/ITS₂ alle condizioni descritte al capitolo 7.1.1 è stata scelta per le analisi DGGE basate sulla regione ITS₁ degli endofiti fungini ottenuti precedentemente con i due approcci dipendente e indipendente da coltivazione. I prodotti di PCR ottenuti con tale coppia di primers a partire da DNA rappresentante di ciascuna OTU's e di eventuali altri ceppi fungini molecularmente diversi sulla base dell'analisi delle sequenze della regione ITS, sono stati corsi singolarmente in DGGE al fine di valutare la mobilità elettroforetica caratteristica di ciascun organismo.

A 16 µl di prodotto di PCR amplificato sono stati aggiunti 4 µl di 6x loading dye Type1.

I 20 µl della miscela così ottenuta sono stati caricati nel gel di poliacrilammide in gradiente denaturante descritto nel Paragrafo 7.1.3.

Si è proceduto quindi alla costituzione di un marker molecolare provvisorio costituito dalla regione ITS₁ di 20 organismi fungini rappresentativi di diverse OTU's scelti su base filogenetica (Par 6.7; Par 8.7 Fig 16). Tali organismi sono stati amplificati con la coppia di primers ITS₁F-GC/ITS₂. Un'aliquota di 2 µl di ciascun amplificato ottenuto sono stati miscelati insieme e 20 µl **sono stati** caricati in DGGE.

7.1.3 DGGE

L'analisi DGGE prevede la preparazione di un gel a concentrazione predeterminata di poliacrilammide e la generazione di un gradiente denaturante chimico formato da urea e formamide. Tre coppie di gradienti denaturanti sono stati testati nella fase di messa a punto del metodo, il primo a 25-45%, il secondo a 30-45% e il terzo a 30-60%.

Sono stati costituiti due gel di poliacrilamide per corsa elettroforetica utilizzando (8% [p/v] acrilamide : bisacrilamide 37,5:1) in gradiente denaturante urea formamide alle tre percentuali descritte in tabella. L'apparato elettroforetico utilizzato è stato il Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia). Questo apparato consente la corsa contemporanea di due gel di poliacrilamide, a temperatura costante di 60 °C monitorata da una centralina dedicata. La cella elettroforetica è stata preventivamente caricata con 6 L di buffer di corsa 1.25xTAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8.0). Sono stati quindi assemblati i vetri con gli appositi spaziatori da 1mm utilizzando il supporto di assemblaggio le pinze di bloccaggio in dotazione all'apparato.

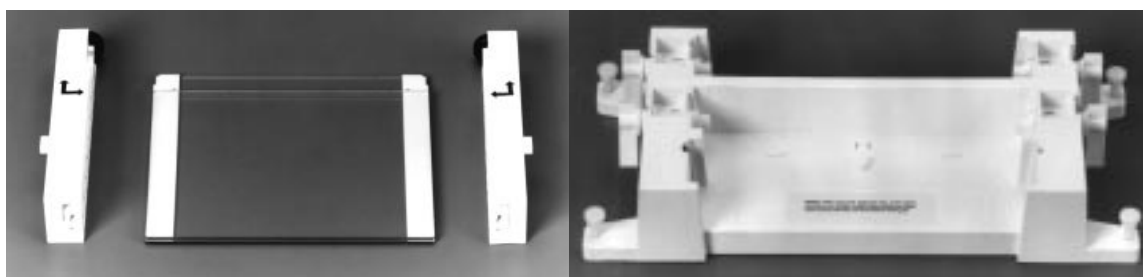


Figura 3 Pinze, vetri, spaziatori e "Casting stand" in dotazione all'apparato DCode universal mutation detection system.

Le soluzioni denaturanti sono state quindi preparate come riportato in Tabella 15:

Tabella 15 Reagenti impiegati per la costituzione di gel di poliacrilamide 8% (p/v) con gradienti denaturanti urea/formamide 25-45%, 30-45% e 30-60%.

Reagente	Soluzione denaturante al 25%	Soluzione denaturante al 30%	Soluzione denaturante al 45%	Soluzione denaturante al 60%
40% Acrylamide/Bisacrilamide (37,5:1)	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
50x TAE buffer	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Formamide (deionized)	10	12 ml	18 ml	24

Materiali e metodi

Urea	10,5	12,6 g	18,9 g	25,2
Volume finale	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

In due Becker sterili sono stati aggiunti rispettivamente 15 ml delle soluzioni LOW DENATURANT e HIGH DENATURANT. In entrambe le soluzioni sono quindi stati aggiunti immediatamente prima dell'utilizzo 150 μ l di una soluzione di ammonio persolfato 10%(p/v) e 15 μ l di Tetrametiletildiammina (TEMED) (SIGMA). Le due soluzioni così ottenute sono state mescolate tramite vortex, prelevate mediante due siringhe in dotazione all'apparato e caricate all'interno dei vetri precedentemente assemblati. Il caricamento e quindi la generazione del gradiente denaturante lineare è stato eseguito utilizzando il D-CODE Gradient Delivery System riportato in figura.

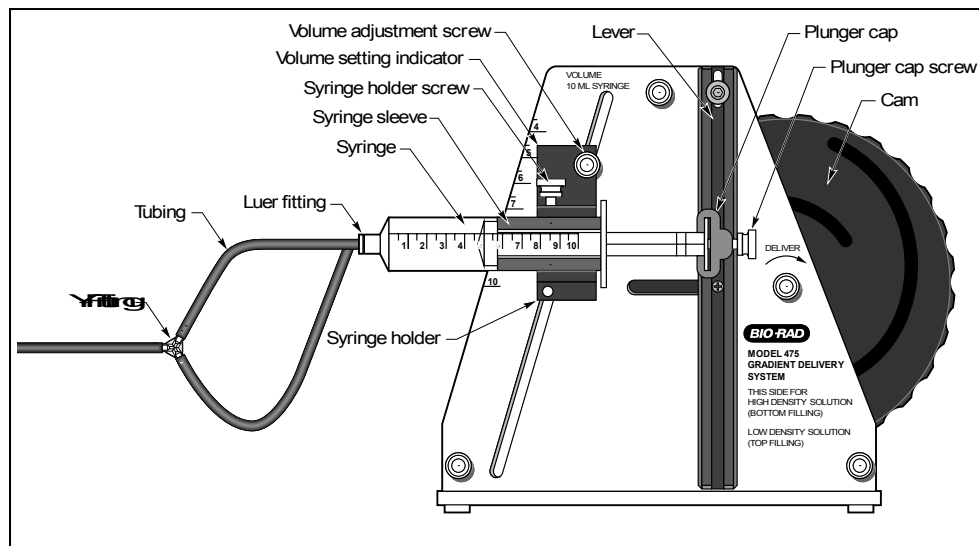


Figura 4 DCode Gradient delivery system.

I passaggi sono stati eseguiti rapidamente e con precisione al fine di evitare polimerizzazioni indesiderate all'interno delle siringhe o dei tubini di caricamento. La medesima procedura è stata eseguita per entrambe le coppie di vetri.

I gel sono stati quindi lasciati polimerizzare per un'ora a temperatura ambiente, quindi rimossi dal supporto di assemblaggio, fissati in un core di caricamento, e inseriti in cella elettroforetica Dcode™.

La corsa elettroforetica è stata condotta a condizioni omogenee per i diversi prodotti amplificati, è stata applicata una differenza di potenziale pari a 80 V per 15 h.

I gel sono stati colorati in etidio bromuro (concentrato 0,5 μ g/ml) per 10 minuti, seguito da decolorazione in acqua per altri 10 minuti. Dopo la colorazione, la corsa degli amplificati è stata visualizzata con il transilluminatore (UVP) a raggi U.V..

"Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine". Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte"

Materiali e metodi

transilluminatore è stata ottenuta grazie al sistema di acquisizione immagini DigiDoc-It (UVP).

7.2 Prove preliminari di Fingerprinting delle comunità endofitiche fungine in viti sane, infette o recovered da Legno nero (LN)

La tecnica DGGE messa a punto e descritta nei paragrafi precedenti è stata applicata in una prova preliminare su piante sane malate o recovered da legno nero per il perseguimento di un duplice scopo:

- verificare l'applicabilità della tecnica al fingerprinting della comunità endofitica fungina della vite;
- stabilire eventuali correlazioni tra comunità endofitica fungina rilevata con il fenomeno del "recovery".

7.2.1 Campionamento di viti sane, infette e recovered da fitoplasmi del Legno nero per fingerprinting della comunità endofitica fungina associata.

Sono stati individuati due vigneti a conduzione agronomica convenzionale in località Cormons (GO) e Lucinico (GO), monitorati da diversi anni dai ricercatori della sezione di Patologia Vegetale ed Entomologia Agraria del Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali dell'Università degli Studi di Udine. Tali vigneti sono caratterizzati dalla coesistenza di piante affette da Legno nero, piante sane, e piante "recovered". In entrambi questi vigneti, nel mese di settembre sia del 2010 che del 2011 sono state selezionate 15 piante sane, 15 piante "recovered" e 15 piante malate dalle quali sono stati prelevati 3 tralci con foglie campionati a random nella chioma. Dal materiale vegetale raccolto nei due vigneti sia nel 2010 che nel 2011 sono stati prelevati 1g di tessuto vascolare da tralcio. Nel vigneto di Cormons nel 2010 è stato prelevato anche 1g di nervatura fogliare.

7.2.2 Estrazione del DNA Genomico Totale

I campioni vegetali prelevati nei due vigneti a conduzione agronomica convenzionale in località Cormons (GO) e Lucinico (GO) descritti nel paragrafo 7.2.1 sono stati sottoposti ad estrazione del DNA genomico totale secondo due procedimenti modificati a partire dal protocollo Doyle e Doyle (1990):

- a. Sia la nervatura fogliare che il tessuto vascolare da tralcio prelevati nel 2010 come descritto nel paragrafo 7.2.1 sono stati processati allo stesso modo. 1 g di tessuto

Materiali e metodi

vegetale è stato posto in mortai di ceramica sterile e frantumato fino a completa polverizzazione mediante pestello e con azoto liquido. Sono stati quindi aggiunti 5 ml di buffer di estrazione contenente CTAB al 2,5% (100 mM Tris-HCl a pH 8,0; 1,4 M NaCl; 50 mM EDTA a pH 8,0; 2,5% CTAB; 1% PVP-40; 0,2% 2-mercaptoethanol) preriscaldato a 65°C, e si è omogeneizzato il tessuto frantumato. 1 ml della sospensione così ottenuta è stato trasferito in provetta Eppendorf da 2 ml, incubato a bagnomaria a 65°C per 35 minuti, e agitato con vortex ogni 10 minuti. I passaggi successivi sono quelli descritti al (Par.6.4.1)

- b. Il tessuto vascolare da tralcio prelevato nel 2011 come descritto nel paragrafo 7.2.1 è stato estratto, apportando una modifica rispetto a quanto descritto al punto (a) Un grammo di materiale vegetale è stato posto in mortai di ceramica sterile e frantumato fino a completa polverizzazione mediante pestello e con azoto liquido. Sono stati quindi aggiunti 6 ml di buffer di estrazione contenente CTAB al 2,5% (100 mM Tris-HCl a pH 8,0; 1,4 M NaCl; 50 mM EDTA a pH 8,0; 2,5% CTAB; 1% PVP-40; 0,2% 2-mercaptoethanol) preriscaldato a 65°C, e si è omogeneizzato il tessuto frantumato. Sono state a questo punto trasferite tre aliquote da 1 ml della sospensione così ottenuta in tre provette Eppendorf da 2 ml, incubate a bagnomaria a 65°C per 35 minuti e agitate con il vortex ogni 10 minuti. Le tre provette sono state quindi processate come descritto al punto a fino alla prima asciugatura del pellet. I pellet ottenuti sono stati risospesi in 133 µl di buffer TE (10 mM Tris-HCl a pH 8, 1 mM EDTA), attendendo circa 30 minuti perché risultassero completamente disciolti. Le tre aliquote di DNA risospese in TE, sono state quindi unite nuovamente in un'unica aliquota da 400 µl, mescolata con il vortex e successivamente sottoposta ad una seconda precipitazione degli acidi nucleici seguendo gli stessi passaggi descritti al punto (a).

7.2.3 SYBR[®] Green I real-time PCR per la determinazione della presenza del fitoplasma dello stolbur.

Le piante prese in esame nei vigneti di Cormons (GO) e Lucinico (GO) (Par 7.2.1) sono state selezionate in base a dati storici relativi a monitoraggi visivi ed in base ad analisi molecolari di PCR convenzionale precedentemente condotte dai ricercatori della sezione di Patologia Vegetale ed Entomologia Agraria del Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali dell'Università degli Studi di Udine nonché da valutazione visiva dei sintomi condotta in

Materiali e metodi

loco al momento del campionamento. Al fine di confermare molecularmente lo stato fitosanitario delle piante campionate e, nello specifico, la presenza del fitoplasma del Legno nero (16SrXII-A) è stata condotta, un'analisi molecolare basata su SYBR[®] Green I real-time PCR utilizzando i primers specifici per lo stolbur 16Sstol(RT)-f2 /16Sstol(RT)-r3 (Martini, unpublished) disegnati in regioni variabili del gene ribosomiale 16S rDNA.

Si è voluto inoltre confrontare la diagnosi di LN a partire da tralcio (materiale che a noi più interessava per il fingerprinting della comunità endofitica fungina) con la diagnosi di LN a partire da nervatura fogliare che è maggiormente utilizzata in letteratura per la diagnosi di fitoplasmi. Il DNA genomico estratto secondo quanto descritto al paragrafo (7.2.2) è stato opportunamente diluito alle seguenti concentrazioni:

- 20 ng/μl per il DNA estratto da nervatura fogliare (Punto a; Par 7.2.2)
- 20 ng/μl per il DNA estratto da tessuto floematico da tralcio (Punto a; Par 7.2.2)
- 60 ng/μl per il DNA estratto da tessuto floematico da tralcio descritto sia al punto (a) e (b) del paragrafo 7.2.2

Un'aliquota di 2 μl di DNA è stata quindi introdotta nella seguente miscela di reazione per un volume finale di reazione di 25 μl.

Tabella 16 Miscela di reazione impiegata in SYBR[®] Green I real-time PCR per la determinazione della presenza del fitoplasma dello stolbur.

	Volumi	[C] finale
Acqua sterile	14,725 μl	
10 X buffer (Applied Biosystems, USA)	2,5 μl	1X
MgCl ₂ (25 mM) (Applied Biosystems, USA)	2.5 μl	2,5 mM
dNTPs (2,5 mM) (Fermentas, LT)	2 μl	200 μM
Primer forward (20 μM)	0,375 μl	0,3 μM
Primer reverse (20 μM)	0,375 μl	0,3 μM
10 x SYBR [®] Green I (Molecular Probes, Invitrogen, USA)	0,375	0,15 X
Taq polimerasi (5 U/μl) AmpliTaq Gold DNA polymerase 5U/μl (Applied Biosystems, USA)	0,15 μl	0,75 U
Volume finale	23 μl	

La real-time PCR è stata condotta su termociclatore DNA Engine Opticon[®] 2 System (MJ Research). Il ciclo di amplificazione ha previsto una denaturazione iniziale a 95°C per 11

Materiali e metodi

minuti, seguita da 40 cicli di 15 s a 94°C, 15 s a 55°C, 20 s a 72°C, seguiti da estensione finale a 72°C per 8 minuti. Al termine della reazione di amplificazione è stata inoltre programmata un'analisi della curva di melting, che ha previsto un aumento graduale della temperatura da 65°C fino a 95°C con lettura della fluorescenza ogni incremento di 0,2°C per 1 secondo, al fine di valutare la specificità degli ampliconi ottenuti.

7.3 Analisi DGGE delle viti di Lucinico

Il DNA estratto da materiale vegetale descritto nel capitolo 7.2.2 è stato amplificato con la coppia di primers ITS1F-GC ITS2, descritta nel capitolo 7.1.1 utilizzando la seguente miscela di reazione .

Tabella 17 Miscela di reazione impiegata nella reazione di PCR con i primers ITS1F-GC –ITS2.

Miscela di reazione di PCR		
	Volumi	[C] finale
Acqua sterile	14,02 µl	
5X buffer (Promega, USA)	5 µl	1X
MgCl ₂ (25 mM) (Promega, USA)	1,8 µl	1,5 mM
dNTPs (2,5 mM) (Fermentas, LT)	2 µl	200 µM
Primer forward (20 µM)	0,5 µl	0,4 µM
Primer reverse (20 µM)	0,5 µl	0,4 µM
Taq polimerasi (5 U/µl) (Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega, USA)	0,180 µl	0,625 U
	24 µl	

A 16 µl di prodotto di PCR amplificato sono stati aggiunti 4 µl di 6x loading dye Type1 e la miscela ottenuta è stata caricata in gel di poliacrilamide in gradiente denaturante 30 45% come descritto nel paragrafo 7.1.3. Un secondo marker molecolare è stato costituito utilizzando prodotti di PCR amplificati di 15 organismi fungini individuati tra i più rappresentativi e aventi diversa mobilità elettroforetica. Gli ampliconi sono stati quindi purificati mediante il kit commerciale Wizard SV gel and PCR Clean-up System Promega, (USA) e quantificati allo spettrofotometro (NanoDrop 1000 ThermoScientific USA). Successivamente 50 ng di DNA di ciascun amplificato sono stati miscelati in un unico tubino. Della miscela ottenuta, sono stati prelevati 16 µl ai quali sono stati addizionati 4 µl di 6x loading dye Type1 (costituito da blu di bromofenolo 0.25% [W/V], xilene cianolo FF 0.25% [W/V] e 40% di saccarosio [W/V]). I 20 µl della miscela così ottenuta sono stati caricati nel gel di poliacrilamide in gradiente denaturante con le modalità descritte al paragrafo 7.1.3. La miscela così generata ha rappresentato un marker molecolare di riferimento, che,

Materiali e metodi

caricato nelle diverse corse elettroforetiche ne ha permesso la comparazione. L'analisi dei risultati è stata eseguita mediante l'utilizzo del software di analisi Gel Compar II (Applied Maths NV)

Risultati

“Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l’Università degli Studi di Udine”. Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell’Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte”

8. Approccio dipendente dalla coltivazione

8.1 Sterilizzazione del materiale vegetale

Nessun micelio o batterio derivante da contaminazione epifitica è stato rilevato in piastra con terreno di coltura pertanto il protocollo di sterilizzazione descritto nel paragrafo 6.2, è risultato idoneo all'impiego nel metodo dipendente dalla coltivazione

8.2 Isolamento

Gli isolamenti sono stati condotti a partire da piante coltivate in due località del Friuli Venezia Giulia, Brazzacco (UD) e Cormons (GO), in vigneti a conduzione biologica impiegando il protocollo di isolamento descritto al Par. 6.3.1. I tessuti vegetali utilizzati sono stati lamina fogliare e tessuto floematico da tralcio nelle porzioni di nodo ed internodo, in due epoche di indagine, Luglio e Settembre del 2009. Sono stati quindi ottenuti complessivamente di 236 isolati da un totale di 540 isolamenti pari ad una , percentuale di isolamento del 44%.

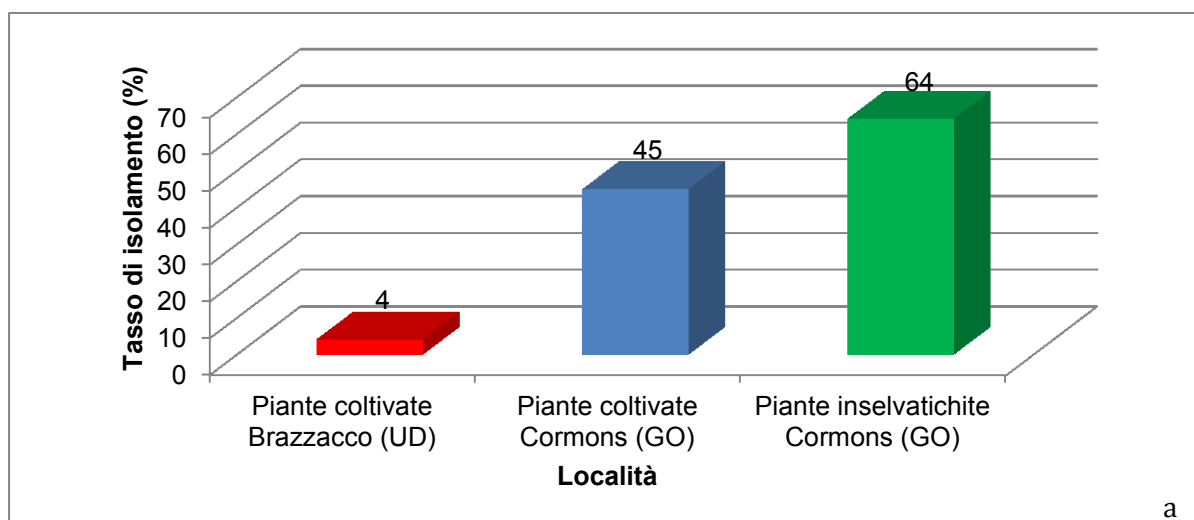


Figura 5 Tasso di isolamento ottenuto a Luglio 2009 in relazione alle località di campionamento e alle tipologie di piante.

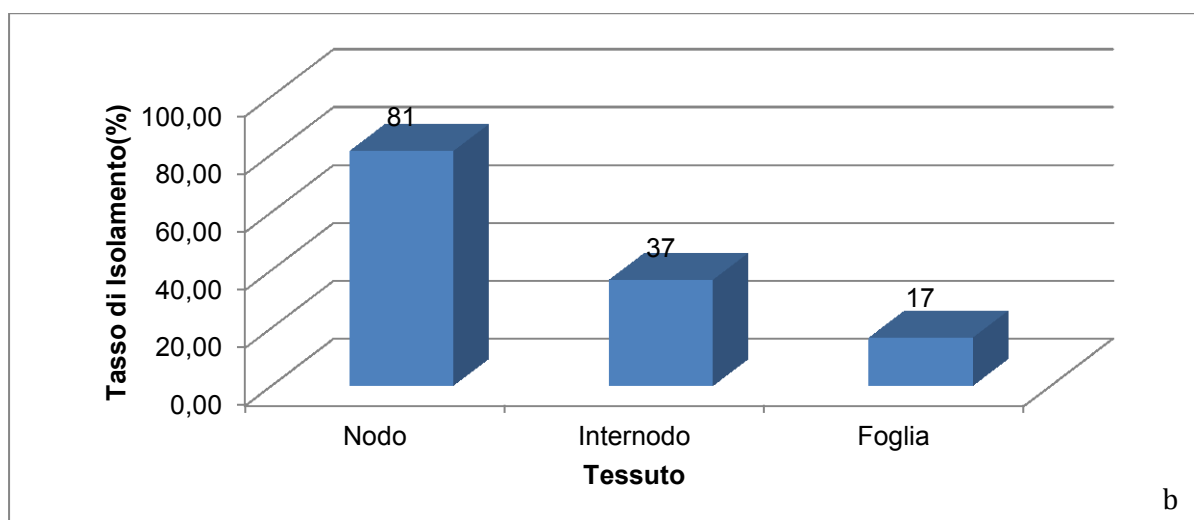


Figura 6 Tasso di isolamento ottenuto a Luglio 2009 in relazione ai tessuti vegetali campionati.

Dall'analisi del tasso d'isolamento nel mese di Luglio, è emerso come tessuti sottoposti ad isolamento micologico, provenienti da piante coltivate in località Cormons ed in località Brazzacco siano stati in grado di generare percentuali di isolamento del 45% e 4% rispettivamente. Le piante "inselvatichite" di bordo vigneto presenti nella località Cormons manifestano il tasso maggiore di isolamento pari al 64%.

È emerso inoltre come dal tessuto floematico da nodo è stato possibile ottenere una percentuale di isolamento pari al 81% rispetto al 37% dell'internodo ed al 17% da lamina fogliare.

Risultati

Nel mese di Settembre, la focalizzazione dello studio al tessuto floematico proveniente da nodo, ed in particolare da nodo dell'anno e nodo di 2 anni, ha permesso l'ottenimento di tassi di isolamento pari a 10% e 101% rispettivamente (Fig.7).

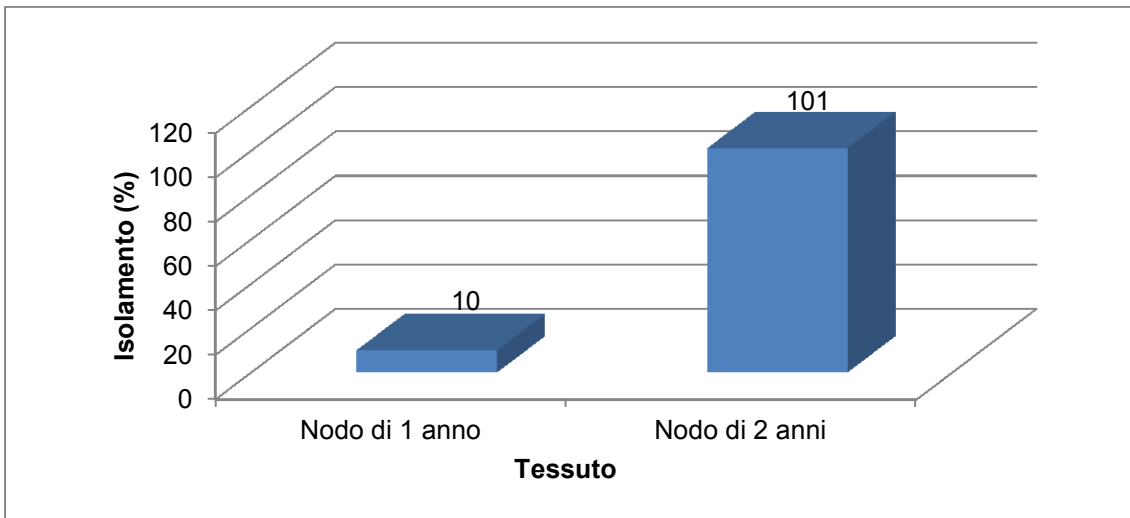


Figura 7 Tasso di isolamento ottenuto a Settembre 2009 in relazione ai tessuti vegetali campionati

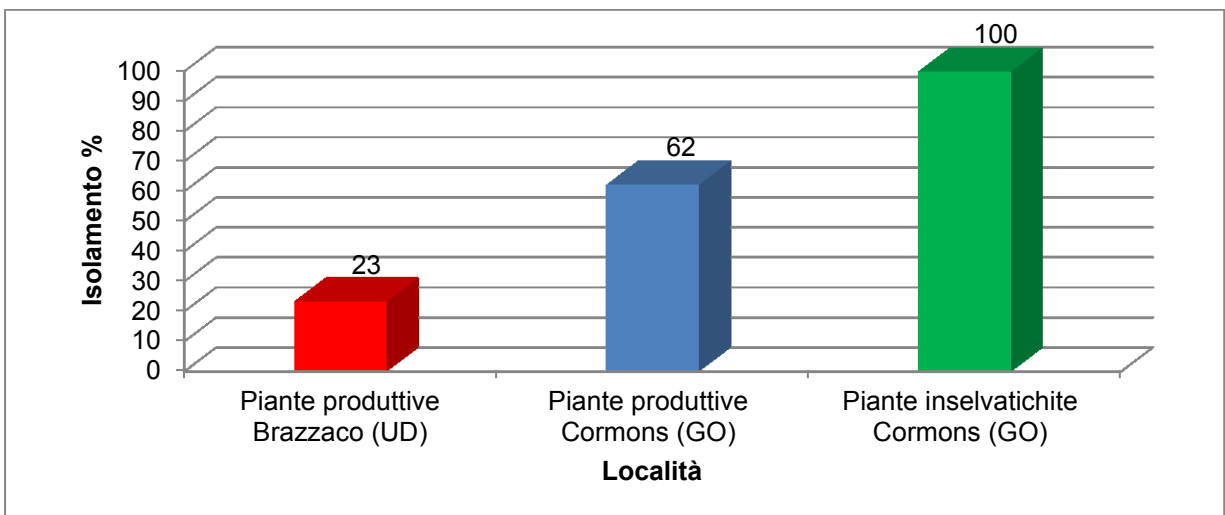


Figura 8 Tasso di isolamento ottenuto a Settembre 2009 in relazione alle località di campionamento e alle tipologie di piante.

Nel mese di Settembre, emerge nuovamente come il materiale vegetale prelevato dalle piante coltivate presenti nel vigneto di Cormons manifestino tassi di isolamento più elevati rispetto a quelle coltivate nel vigneto in località Brazzacco, con valori pari a 62 e 23% rispettivamente. Nuovamente, si rileva come nel mese di Settembre le piante inselvatichte di bordo vigneto presenti nel vigneto in località Cormons abbiano i tassi di isolamento più elevati pari al 100%.

8.3 Identificazione micologica degli isolati fungini

I 236 isolati fungini isolati descritti in precedenza sono stati raggruppati in 22 morfospecie delle quali 10, sono state identificate grazie alla presenza di strutture riproduttive utili all'identificazione. I generi identificati morfologicamente sono i stati seguenti: *Alternaria sp*, *Phoma sp*, *Epicoccum sp*, *Aureobasidium sp*, *Cladosporium sp*, *Pestalotiopsis sp*, *Pestalotia.sp*, *Fusarium sp*, *Phomopsis sp*, *Sordaria sp*. (Figura 9). Si può notare come dall' analisi delle frequenze di isolamento i generi più rappresentativi sono *Alternaria sp*, *Phoma sp*, *Epicoccum sp* e *Aureobasidium sp*.

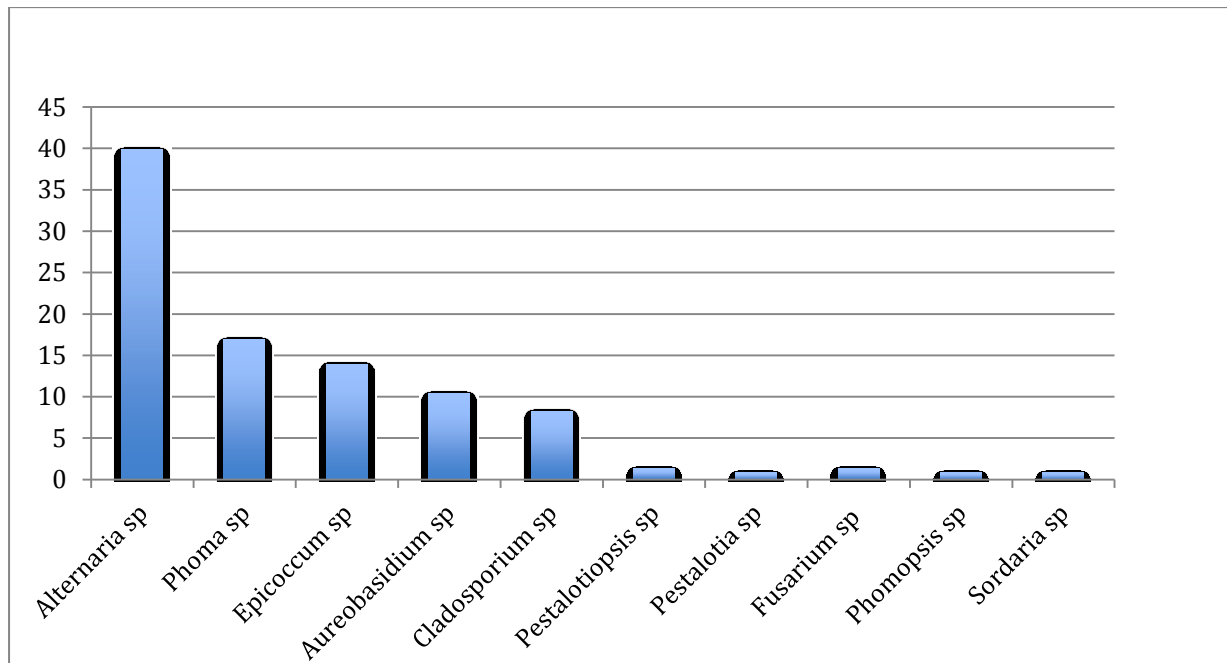


Figura 9 Percentuali di isolamento relative agli isolati fungini identificati mediante caratteri morfologici.

8.3.1 Estrazione del DNA dagli isolati fungini.

Il protocollo di estrazione impiegato nel paragrafo 6.3.3 ha consentito di ottenere un DNA ad una concentrazione media di 500 ng/ml con un rapporto tra le letture di assorbanza A_{260}/A_{280} A_{260}/A_{230} intorno a 2 indicando quindi un'ottima qualità del DNA estratto privo di contaminazione da proteine e carboidrati.

8.3.2 Amplificazione mediante PCR della regione ITS degli isolati endofitici fungini.

L'utilizzo della coppia di primers universali per funghi ITS₁/ITS₄ ha consentito l'amplificazione della regione ITS dal DNA genomico totale estratto come descritto al paragrafo 6.3.3, della totalità degli isolati fungini ottenuti con il metodo dipendente dalla coltivazione. Il prodotto di amplificazione tuttavia non è stato della medesima entità per tutti gli isolati analizzati, la dimensione del frammento amplificato in PCR variava da 450 a 550 paia di basi (Figura 10) Si rileva inoltre come gli amplificati ottenuti siano di buona intensità quindi utilizzabili nelle digestioni enzimatiche successive.

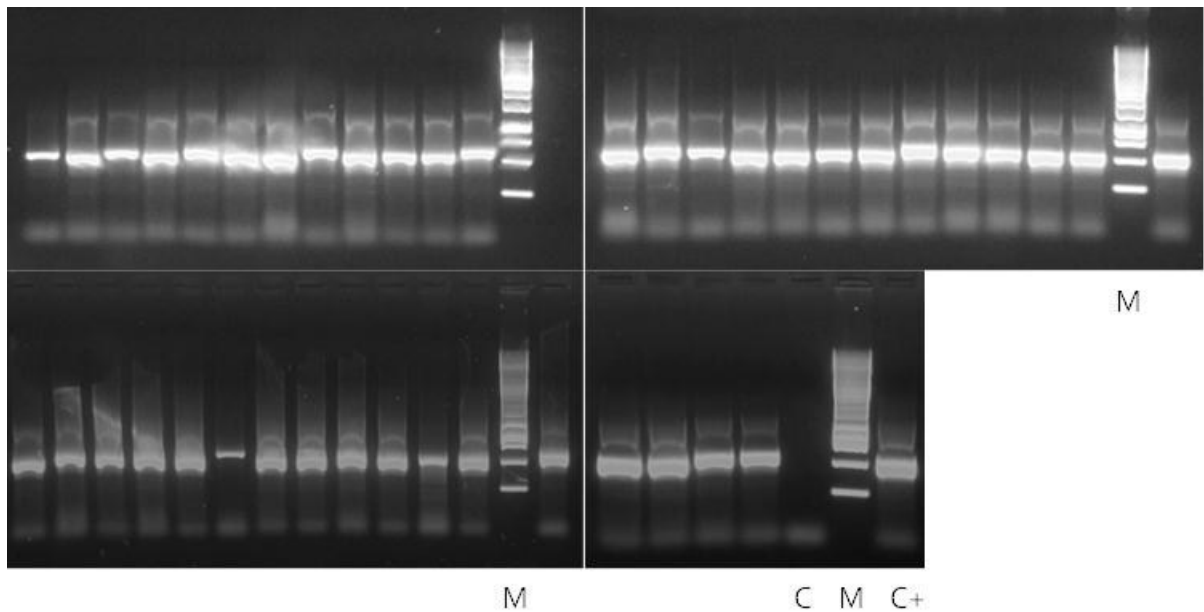


Figura 10 Gel di agarosio 1% degli amplificati di PCR della regione ITS degli isolati fungini ottenuti con il metodo dipendente dalla coltivazione, utilizzando i primers universali per i funghi ITS₁/ITS₄. M: Marker Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas, Lituania)

8.4 Approccio indipendente dalla coltivazione

8.4.1 Scelta dei primers selettivi per il DNA fungino ed escludenti il DNA della pianta.

Le diverse coppie di primers testate per l'amplificazione selettiva della regione genomica ITS del DNA fungino estratto, hanno evidenziato un diverso grado di specificità. L'utilizzo delle coppie ITS₁F/NLB₄, ITS₁/NLB₄ in reazione di PCR non hanno consentito l'amplificazione del DNA di tutti gli isolati fungini utilizzati nella prova (Figura 11). Il DNA della vite micropropagata ha dato invece amplificazione con i primers ITS₁F/NLB₄ come si può vedere nella medesima Figura 11.

“Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine”. Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte”

Risultati

Le coppie di primers ITS₁F/NLC₂, NSA₃/NLC₂, NSI₁/ITS₄ E NSA₃/ITS₄ alle condizioni di PCR adottate, hanno amplificato tutti i DNA estratti da miceli fungini impiegati nella prova generando un amplificato, anche se debole, da DNA di vite micropropagata.

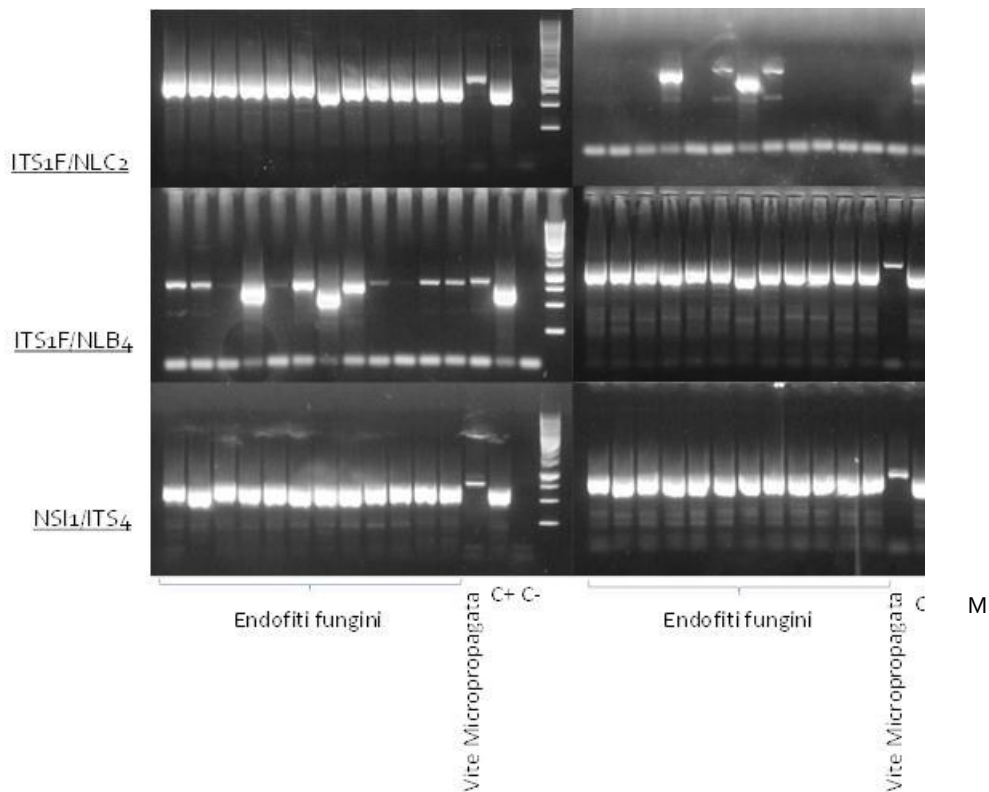


Figura 11 Amplificati di PCR della regione ITS di 12 isolati fungini provenienti da approccio dipendente dalla coltivazione e di un amplificato da DNA di vite micropropagata, ottenuti utilizzando diverse coppie di primers universali per i funghi. M: Marker Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas, Lituania)

La nested PCR allestita con le modalità descritte nel Paragrafo 6.4.2 mediante le coppie di primers NSA₃/NLC₂ e NSI₁/NLB₄ ha consentito l'amplificazione del DNA estratto da tutti gli isolati fungini impiegati nella prova andando ad amplificare anche la vite micropropagata (risultati non mostrati).

La coppia ITS₁-F/ITS₄ ha consentito l'amplificazione del DNA estratto da tutti gli isolati fungini impiegati nella prova, andando ad escludere l'amplificazione del DNA della vite micropropagata (Figura 12).

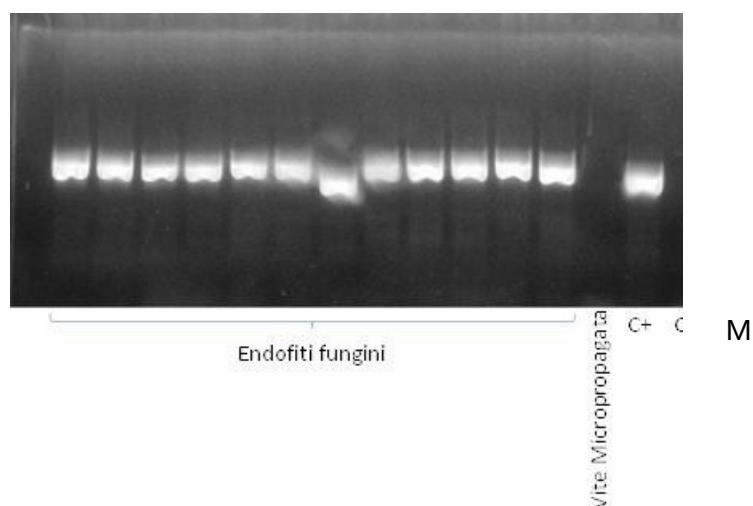


Figura 12 Amplificati di PCR della regione ITS di 12 isolati fungini provenienti da approccio dipendente dalla coltivazione e di un amplificato da DNA di vite micropropagata, ottenuti impiegando la coppia di primers ITS₁F-ITS₄. M: Marker Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas, Lituania)

8.4.2 Amplificazione e clonaggio della regione ITS di specie fungine presenti in materiale vegetale

L'amplificazione del DNA totale estratto da materiale vegetale con i primers universali ITS₁F-ITS₄ e successivo clonaggio della regione ITS amplificata come descritto al paragrafo 6.4.3 ha consentito l'ottenimento di 282 cloni ricombinanti sottoposti in seguito a colony-PCR. L'amplificazione dei cloni ricombinanti secondo le modalità descritte al paragrafo 6.4.3 ha dato esito positivo, consentendo di sottoporre gli ampliconi ottenuti ad analisi RFLP.

8.5 Analisi RFLP dei prodotti di PCR delle regioni ITS ottenute dai due approcci dipendente ed indipendente dalla coltivazione e generazione di OTU'S

Gli ampliconi della regione ITS di tutti i 231 endofiti fungini isolati (Par. 6.3.1) e dai quali è stato estratto il DNA (Par. 6.3.3), sono stati sottoposti ad analisi RFLP (Par. 6.5). Dall'analisi RFLP dei prodotti ITS₁F/ITS₄ con gli enzimi *Tru1* e *HpaII* è stato possibile ottenere 29 diversi gruppi RFLP (OTU's), evidenza molecolare della presenza di ulteriore biodiversità all'interno dei raggruppamenti macromorfologici ottenuti. (Cap. 8.3).

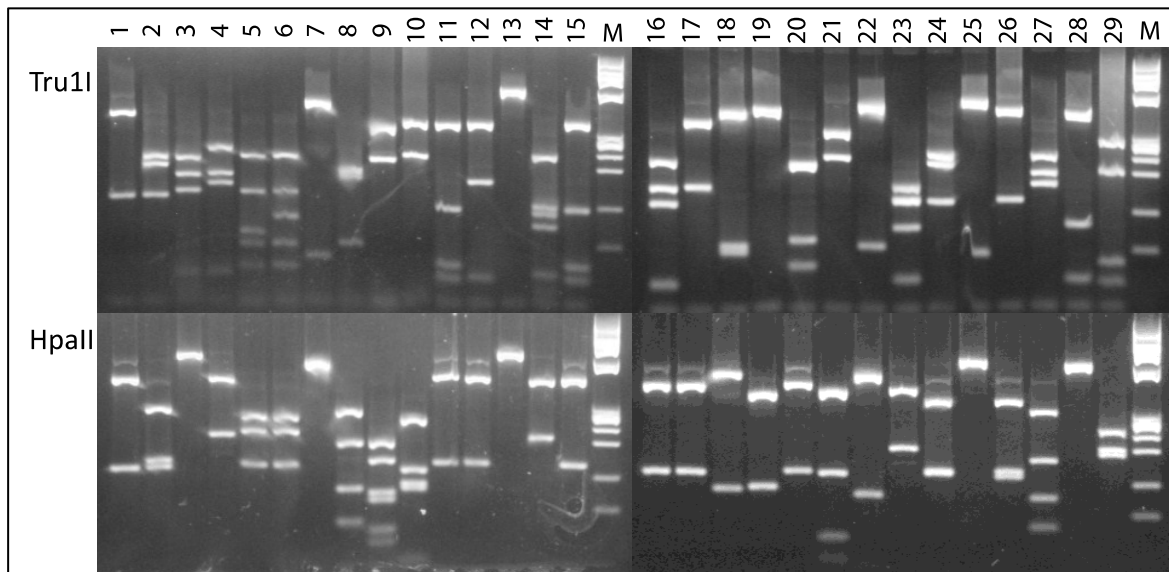
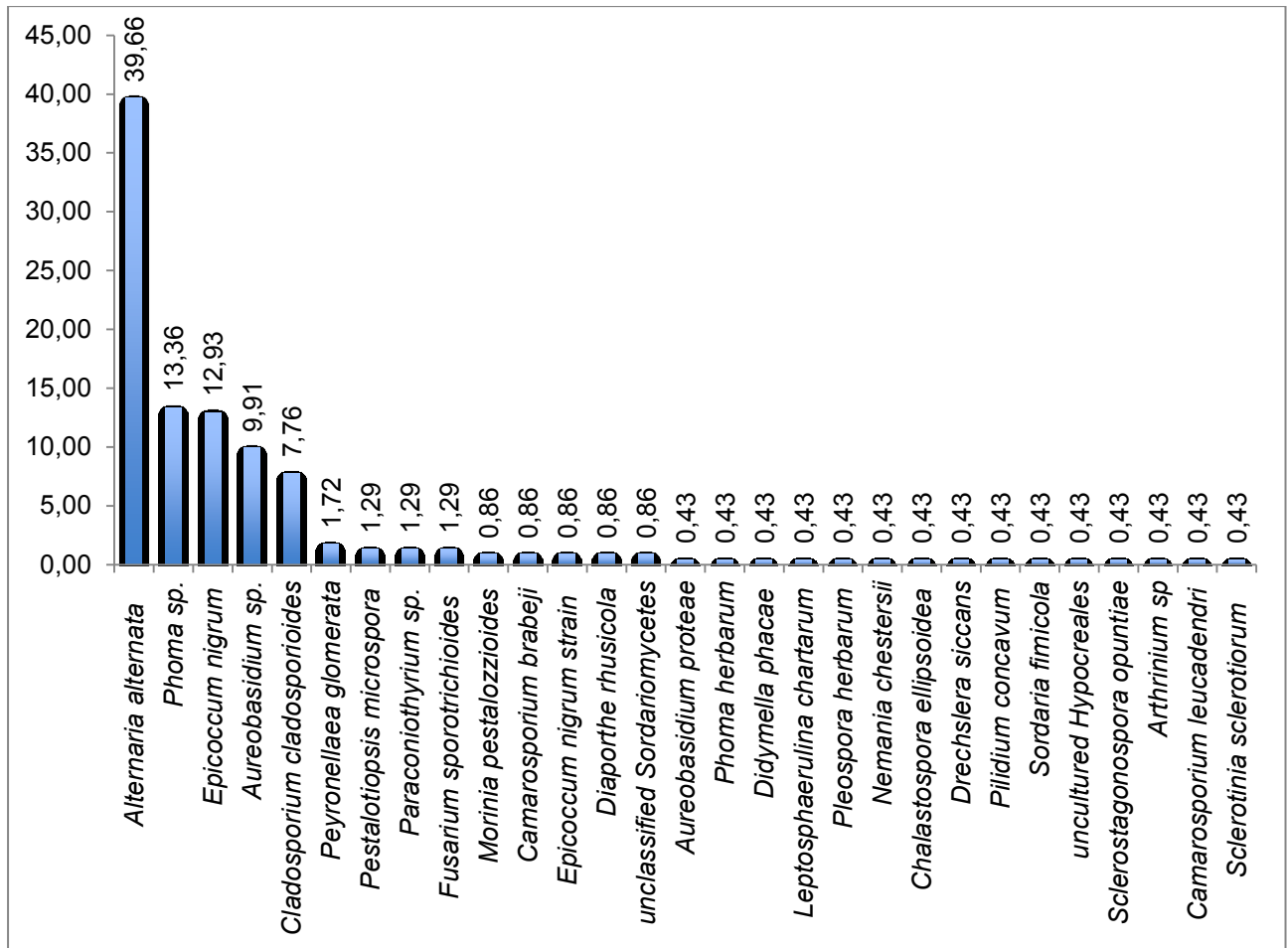


Figura 13 Profili RFLP (OTU's) ottenuti da digestione enzimatica della regione ITS mediante endonucleasi di restrizione *TruI* e *HpaII* su isolati fungini ottenuti da approccio dipendente dalla coltivazione. Linee: 1-2 *Epicoccum nigrum*; 3 *Morinia pestalozzioides*; 4 *Pestalotiopsis microspora*; 5 *Aureobasidium pullulans*; 5 *Aureobasidium proteae*; 7 *Fusarium sporotrichioides*; 8 *Sordariomycete* sp; 9 *Cladosporium cladosporioides*; 10 Uncultured *Hypocreales*; 11 *Peyronellaea glomerata*; 12 *Phoma* sp.; 13 *Paraconiothyrium* sp.; 14 *Sclerostagonospora opuntiae*; 15 *Phoma* sp.; 16 *Phoma herbarum*; 17 *Didymella phacae*; 18 *Camarosporium leucadendri*; 19 *Pilidium concavum*; 20 *Alternaria alternata*; 21 *Sordaria fimicola*; 22 *Camarosporium brabeji*, 23 *Arthrinium*; 24 *Chalastospora ellipsoidea*; 25 *Leptosphaerulina chartarum* 26 *Drechslera siccans*; 27 *Nemania chestersii*; 28 *Pleospora herbarum* var *Herbarum*; 29 *Diaporthe rhusicola*; M Marker ϕ X174 DNA-HaeIII Digest (New England BioLabs, USA).

L'analisi BLAST delle sequenze (Par.6.7) ha permesso di associare l'identificazione dell'organismo fungino rappresentativo di ogni OTU generata tramite analisi RFLP. La frequenza delle diverse OTU's ottenute da approccio dipendente dalla coltivazione è riportata in Figura 14

Figura 14. Frequenze relative delle principali OTU's ottenute tramite analisi PCR/RFLP da approccio dipendente dalla coltivazione.



Analogamente gli ampliconi della regione ITS di tutti i 282 cloni ottenuti da approccio indipendente da coltivazione (Par. 6.4.3) sono stati sottoposti ad analisi RFLP (Par. 6.5). Dall'analisi RFLP dei prodotti ITS_{1F}/ITS₄ con gli enzimi *Tru1* e *HpaII* è stato possibile ottenere 41 diversi gruppi RFLP (OTU's). Le frequenze relative delle OTU's ottenute sono state riportate in Figura 15.

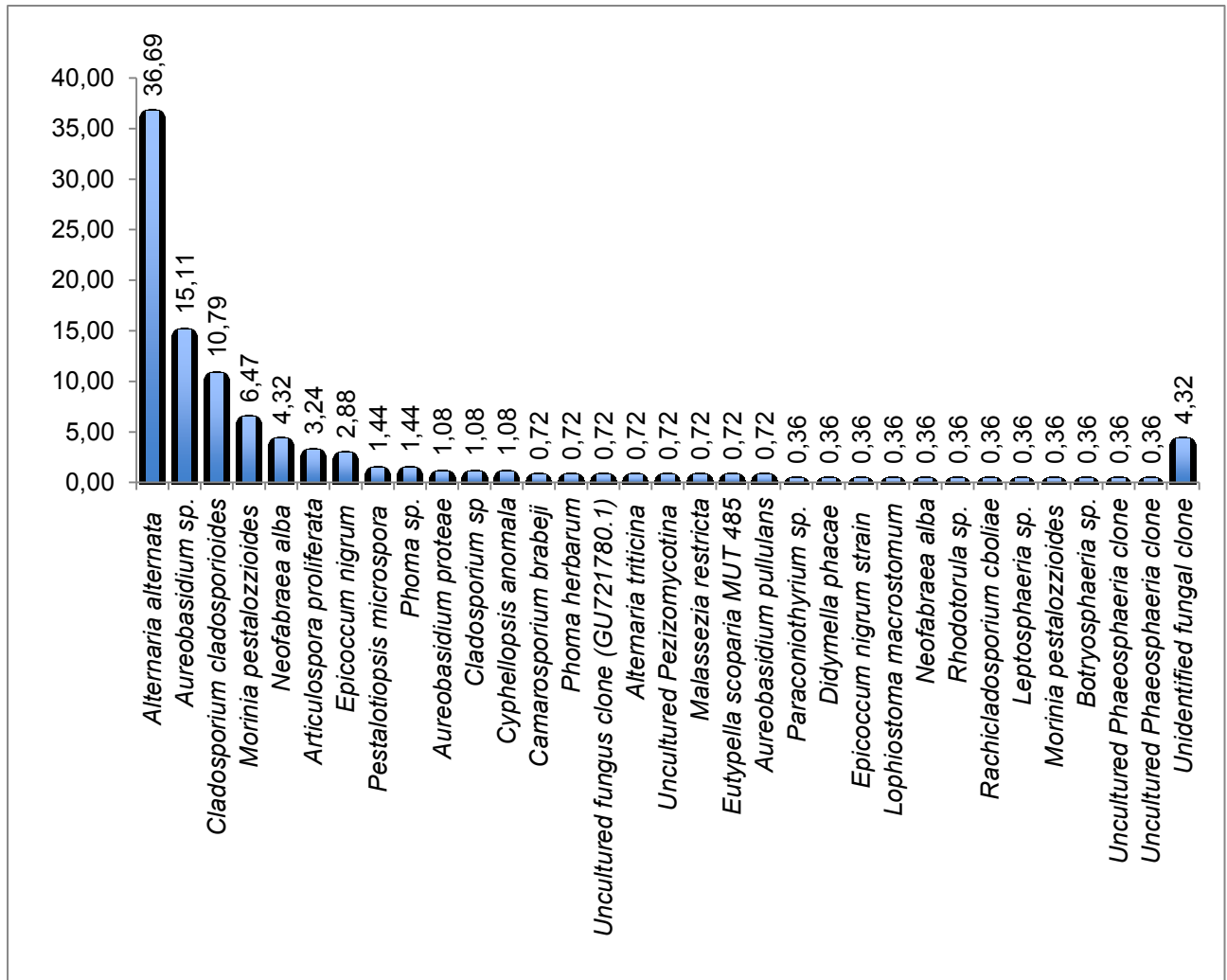


Figura 15 Frequenze relative delle principali OTU's RFLP ottenute da approccio indipendente dalla coltivazione.

Dai dati raccolti emerge come più del 89% degli isolati ottenuti dal metodo dipendente dalla coltivazione appartengono a 7 generi principali. Similmente gli stessi sette generi rappresentano il 79% delle OTU's totali ottenute dal metodo indipendente dalla coltivazione (Tabella 18)

Tabella 18 Frequenza dei 7 principali generi fungini ottenuti dai due approcci dipendente e indipendente dalla coltivazione

Genus	Isolation	ITS library
<i>Alternaria</i> sp.	40%	36%
<i>Phoma</i> sp.	15%	2%
<i>Epicoccum</i> sp.	14%	4%
<i>Aureobasidium</i> sp.	10%	16%
<i>Cladosporium</i> sp.	8%	12%
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1%	7%
<i>Pestalotia</i> sp.	1%	1%

Dall'approccio dipendente dalla coltivazione è stato possibile discriminare 29 OTU's delle quali 15, sono state riscontrate esclusivamente mediante questo approccio, e rappresentano nel complesso il 10% degli isolati ottenuti mediante tale approccio. Tra di esse si riportano *Peyronellaea glomerata* (1,72%), *Diaporthe rhusicola* (0.86%), *Fusarium sporotrichioides* (1,29%), *Leptosphaerulina chartarum* (0.43%)

Dall'approccio indipendente dalla coltivazione è stato possibile ottenere 41 OTU's delle quali 27, sono state riscontrate esclusivamente mediante questo approccio e rappresentano il 20% dei cloni ottenuti mediante questo approccio. Tra queste OTU's annoveriamo *Neofabraea alba* (4,32%), *Articulospora proliferata* (3,24%), *Cyphellopsis anomala* (1,08%), *Eutypella scoparia* (0.72%), *Lophiostoma macrostomum* (0.36%), *Botryosphaeria* sp (0,36%).

Dall'uso congiunto dei due approcci è stato possibile ottenere 56 diverse OTU's le quali rappresentano la miglior stima della comunità endofitica reale ottenibile alle condizioni applicate per i due approcci. (Tabella 19)

Tabella 19 Distribuzione delle OTU's in funzione degli approcci dipendente ed indipendente dalla coltivazione.

Method	Total OTUs	Unique OTUs	Shared OTUs	Total OTUs
Coltivazione-dipendente	29 (52%)	15 (27%)	14 (25%)	56 (100%)
Coltivazione-indipendente	41 (73%)	27 (48%)		

8.6 Sequenziamento delle regioni ITS ottenute da approccio dipendente ed indipendente dalla coltivazione, clonaggio molecolare e analisi BLAST delle sequenze.

Le sequenze ricavate dai ceppi endofitici fungini ottenuti con approccio dipendente dalla coltivazione e dai cloni ottenuti mediante approccio indipendente dalla coltivazione, sono state sottoposte ad analisi blast ottenendo in tal modo sequenze ad elevata similarità utilizzate per l'identificazione dell'organismo e per le analisi filogenetiche (Tabella 20).

Tabella 20 Risultato dell'analisi Blast condotta sulle sequenze della regione ITS ottenute mediante gli approcci dipendenti ed indipendenti dalla coltivazione.

OTU's RFLP	OTU's ITS	Codice Sequenza ITS	Organismo	Seq Genbank	Culture collection	Similarità	Copertura
1	1	1a	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	HQ607815.1		100%	100%
2	2	1b	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JF440584.1		100%	99%
2	3	1bcl	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JF440584.1		100%	99%
2	4	1acl	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JF440584.1		99%	99%
3	5	1fcl	<i>Aureobasidium proteae</i>	JN712490.1	CPC 13701	99%	100%
3	5	1gcl	<i>Aureobasidium proteae</i>	JN712490.1	CPC 13701	99%	100%
3	5	2e	<i>Aureobasidium proteae</i>	JN712490.1	CPC 13701	99%	100%
4	6	1c	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	FJ614639.1	ATCC MYA-3965	99%	97%
5	7	1ccl	<i>Camarosporium brabeji</i>	EU552105.1	CBS 123026	99%	100%
5	7	1d	<i>Camarosporium brabeji</i>	EU552105.1	CBS 123026	99%	100%
5	7	5gcl	<i>Camarosporium brabeji</i>	EU552105.1	CBS 123026	99%	100%
6	8	1e	<i>Diaporthe rhusicola</i>	JF951146.1	CPC:18191	99%	100%
7	9	1f	<i>Pleospora herbarum</i> var. <i>herbarum</i>	EF452449.1	CBS 191.86	99%	100%
8	10	1g	<i>Nemania chestersii</i>	AJ390430.1		99%	95%
9	11	1h	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	JF439492.1		99%	100%
9	12	1dcl	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	HQ999974.1	ATCC MYA-4697	99%	100%
10	13	2a	<i>Chalastospora ellipsoidea</i>	FJ839608.1	CBS 121331	98%	100%
11	14	4d	<i>Drechslera siccans</i>	AY004797.1	DAOM 115701	100%	99%
12	15	2b	<i>Didymella phacae</i>	EU167570.1	CBS 184.55	99%	100%
13	16	2c	<i>Pilidium concavum</i>	GU126750.1	ATCC 90142	100%	100%
14	17	2d	<i>Sordaria fimicola</i>	GU966520.1		99%	100%
15	18	4e	<i>Uncultured Hypocreales</i>	JF449870.1		99%	100%
16	19	2f	<i>Phoma herbarum</i>	AB470886.1		100%	100%
17	20	2g	<i>Sordariomycete</i>	EU680529.1		99%	100%
18	21	2h	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	FJ459945.1		99%	100%
18	21	2bcl	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	FJ459945.1		99%	100%
19	22	2ecl	<i>Epicoccum nigrum</i>	JF440590.1		99%	100%
19	23	3a	<i>Epicoccum nigrum</i>	JF440590.1		99%	100%
19	22	2dcl	<i>Epicoccum nigrum</i>	JN689342.1		100%	100%
20	24	2acl	<i>Morinia pestalozzioides</i>	AY929325.1		99%	91%
20	25	2fcl	<i>Morinia pestalozzioides</i>	AY929325.1		99%	92%
20	26	2gcl	<i>Morinia pestalozzioides</i>	AY929325.1		98%	91%
20	24	3b	<i>Morinia pestalozzioides</i>	AY929325.1		99%	91%
21	27	3acl	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	HM008931.1		100%	100%
21	28	2hcl	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	JF499839.1	CPC 18224	99%	100%
21	29	3c	<i>Cladosporium</i> sp.	FJ176478.1		100%	100%
22	30	3bcl	<i>Epicoccum nigrum</i> strain	FJ424241.1	ATCC 62191	99%	100%
22	31	3d	<i>Epicoccum nigrum</i> strain	FJ424241.1	ATCC 62191	100%	100%
23	32	3ccl	<i>Alternaria alternata</i>	HQ263343.1	ATCC MYA-	99%	100%

"Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine". Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte"

					4642			
23	33	3e	<i>Alternaria alternata</i>	HQ263343.1	ATCC MYA-4642	99%	100%	
24	34	3f	<i>Sclerostagonospora opuntiae</i>	FJ605260.1		95%	100%	
24	35	3f	Uncultured Pleosporales clone	JF449858.1		99%	96%	
25	36	3ecl	<i>Phoma</i> sp.	JN578625.1		99%	100%	
25	36	3g	<i>Phoma</i> sp.	JN578625.1		99%	100%	
25	37	3fcl	<i>Phoma</i> sp.	HE608801.1		99%	100%	
26	38	3h	<i>Peyronellaea glomerata</i>	HQ380779.1		100%	100%	
26	38	4a	<i>Peyronellaea glomerata</i>	HQ380779.1		100%	100%	
27	39	4b	<i>Arthrinium</i> sp.	AB470892.1		100%	100%	
28	40	4c	<i>Camarosporium leucadendri</i>	EU552106.1	CBS 123027	99%	100%	
29	41	4bcl	Uncultured fungus clone	GU721780.1		99%	100%	
29	42	4ccl	Uncultured fungus clone	GU721780.1		99%	100%	
30	43	4dcl	<i>Lophiostoma</i> sp.	FJ372389.1	CBS 123543	99%	99%	
31	44	4ecl	<i>Neofabraea alba</i>	AF141190.1	CBS452.64	99%	100%	
31	45	4fcl	<i>Neofabraea alba</i>	AF141190.1	CBS452.64	99%	100%	
32	46	4hcl	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	HM008931.1		99%	100%	
32	46	7dcl	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	HM008931.1		99%	100%	
33	47	4gcl	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	HM148072.1	CBS 171.52	99%	100%	
34	48	5acl	<i>Neofabraea alba</i> strain	AF141190.1	CBS452.64	99%	100%	
35	49	5ccl	<i>Alternaria triticina</i> strain	AY714476.1	MUCL 44210	97%	100%	
35	50	5bcl	Fungal sp.	HQ166323.1		99%	95%	
36	51	5dcl	<i>Rhodotorula</i> sp.	AF444615.1	NRRL Y-17502	99%	100%	
37	52	5hcl	Uncultured Pezizomycotina	JF449459.1		89%	62%	
37	53	6acl	Uncultured Pezizomycotina	JF449459.1		89%	62%	
38	54	6ccl	<i>Leptosphaeria</i> sp.	HQ914824.1		96%	81%	
39	55	6dcl	<i>Kabatina thujae</i>	AF013226.1		85%	79%	
39	55	6ecl	<i>Kabatina thujae</i>	AF013226.1		85%	79%	
40	56	6gcl	<i>Morinia pestalozzioides</i>	AY929325.1		99%	92%	
41	57	6fcl	<i>Malassezia restricta</i>	EU400587.1		99%	100%	
42	58	7acl	<i>Eutypella scoparia</i>	AF373064.1	MUT 485	99%	98%	
42	59	6hcl	<i>Eutypella scoparia</i>	AF373064.1	MUT 485	99%	98%	
43	60	7bcl	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JF440584.1		99%	99%	
43	61	7ccl	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JF440584.1		99%	99%	
44	62	7fcl	<i>Botryosphaeria</i> sp.	EU330628.1		99%	100%	
45	63	7gcl	<i>Articulospora proliferata</i>	FJ000395.1		94%	91%	
45	64	7hcl	<i>Articulospora proliferata</i>	FJ000395.1		94%	91%	
46	65	8acl	<i>Cyphellopsis anomala</i>	AY571036.1		82%	96%	
46	66	8bcl	<i>Cyphellopsis anomala</i>	AY571036.1		82%	96%	
47	67	8ccl	Uncultured Phaeosphaeria clone	FN868448.1		99%	100%	
48	68	8dcl	Uncultured Phaeosphaeria clone	JF449769.1		99%	100%	
49	69	5ecl	Uncultured fungus clone	GU817159.1		99%	100%	
50	70	8eis	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	HM849615.1		100%	100%	
50	71	8eis	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	FJ810516.1	ATCC MYA-4521	99%	100%	
50 - 56			Unidentified fungal clone					
CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures); BCCM /MUCL (Mycoteque de l'Universite Catholique de Louvain); MUT (Mycoteca Universitatis Taurinensis); NRRL (Agricultural Research Service Culture Collection); CPC Culture collection of Pedro Crous (housed at CBS-KNAW)								

“Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine”. Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte”

Risultati

L'analisi Blast delle sequenze della regione ITS, ottenute mediante metodi dipendente ed indipendente dalla coltivazione, ha portato all'identificazione di 50 delle 56 OTU's RFLP. Dall'analisi di queste sequenze eseguita mediante software Bioedit, è risultato altresì, come sia possibile evidenziare variabilità puntiformi di sequenza, in grado, di indicare la presenza di 71 diversi genotipi ITS (Tab 20).

L'analisi delle sequenze ITS interno delle principali OTU's associabili ai generi più rappresentativi quali *Aureobasidium*, *Epicoccum* e *Phoma* e *Cladosporium*, conferma la ampia presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (Tab 21).

Tabella 21 Variabilità di sequenza rilevata all'interno delle principali OTU's ottenute mediante approccio dipendente ed indipendente dalla coltivazione.

Cladosporium sp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	35	36	37	38	44	45	48	50	51	54	57	59	192	226	241	262	374	401	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	
Cladosporium sp FJ176478.1	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	G	G	T	G	A	C	T	C	A	C	A	G	A	G	T	A	A	T	T	A	C	T	C	G	G	A	T	C	A	G	3'
3c 154																																										3'						
Cladosporium cladosporioides HM008931.1																															A											3'						
3acl 154																															A											3'						
4hcl 154e																															A											3'						
7dcl 154e																															A											3'						
Cladosporium ramotenellum CPC18224 JF499839.1																															A											3'						
2hcl 154																															A											3'						
Cladosporium cucumerinum CBS 171.52 HM148072.1																															A											3'						
4gcl 154e																															A											3'						

Aureobasidium sp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	134	231	271	287	304	420	527	578	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538					
Aureobasidium proteae strain CPC 13701 JN712490.1	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	G	G	C	T	G	G	G	T	A	C	C	T	C	G	G	A	T	C	A	G	3'				
1gcl 130																																										3'
1fcl 130																																										3'
2e 130																																										3'
Aureobasidium pullulans JF440584.1																																										3'
1b 11																																										3'
1bcd 11																																										3'
1acl 11																																										3'
7ccl nc07																																										3'
7bcd nc07																																										3'

Phoma sp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	39	43	53	56	72	75	77	80	83	85	89	103	109	120	122	130	143	163	164	315	319	392	430	424	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	
Peyronellaea glomerata HQ380779.1	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	G	G	T	A	T	T	C	T	A	T	C	T	C	C	G	A	T	A	C	C	T	T	T	C	C	T	C	T	C	G	G	A	T	C	A	G	3'
4a 204																																										3'												
3h 204																																										3'												
Phoma sp. HE608801.1																															G											3'												
3fcl 173																															T											3'												
Phoma sp JN578625.1																															G											3'												
3ecl 173																															G											3'												
3g 173																															G											3'												
Phoma herbarum AB470824.1																															G											3'												
2f 140																															G											3'												

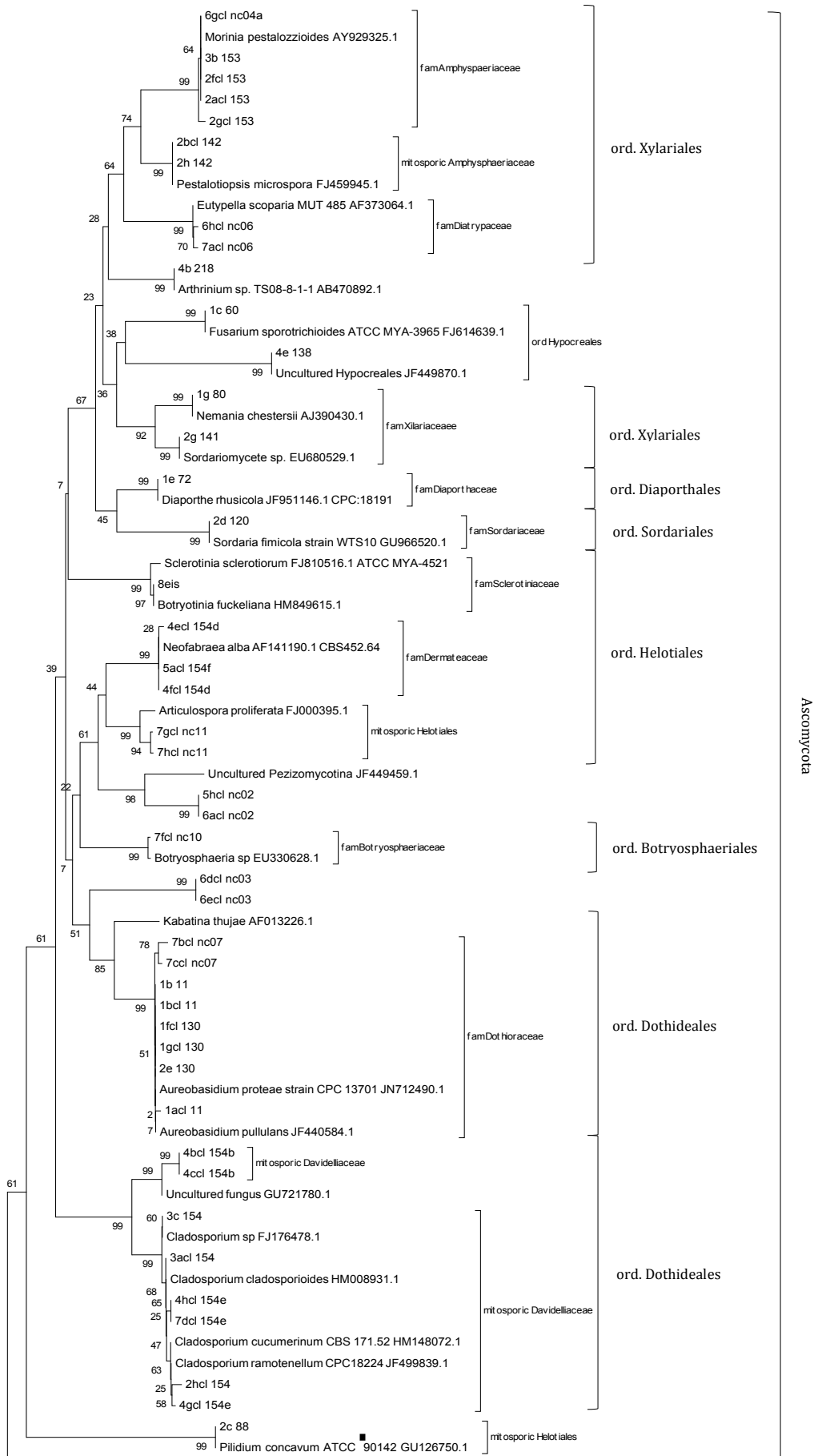
Epicoccum sp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	43	113	125	156	163	363	375	379	381	488	492	493	494	495	496	498	499	500	501	502			
Epicoccum nigrum JF440590.1	T	C	C	G	T	A	G	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	G	G	A	A	T	A	A	T	T	T	T	C	C	C	T	C	G	A	T	C	A	G	3'		
3a 152																																										3'
2ecl 152																															C											3'
Epicoccum nigrum JN689342.1																																										3'
2dcl 152																																										3'
Epicoccum nigrum ATCC 62191 FJ424241.1																																										3'
3d 157																																										3'
3bcd 157																																										3'

“Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l’Università degli Studi di Udine”. Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell’Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte”

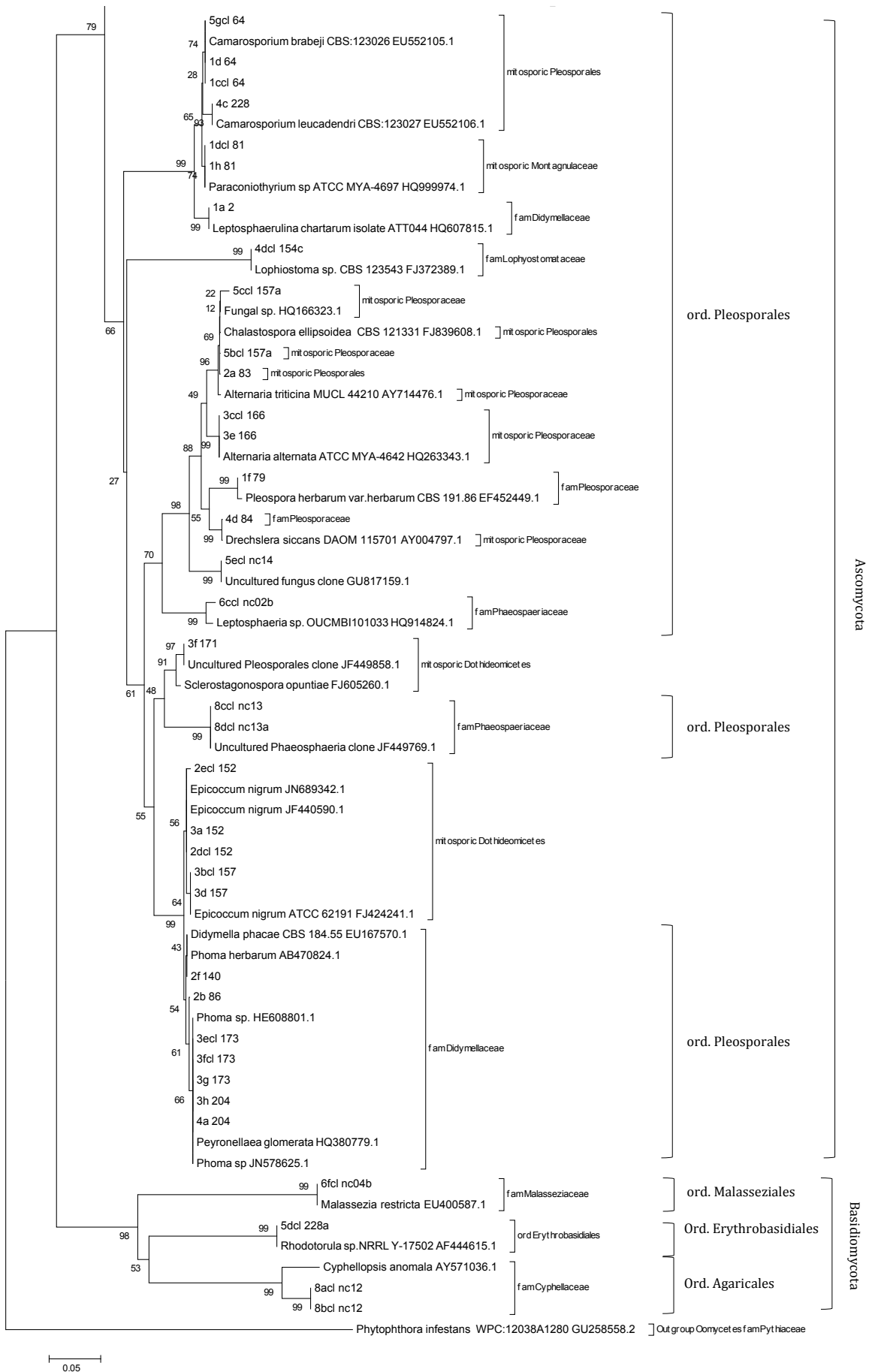
8.7 Analisi filogenetica sulla base della regione ITS degli endofiti fungini ottenuti dai due approcci dipendente e indipendente dalla coltivazione.

Le sequenze descritte al paragrafo 8.6. sono state sottoposte ad analisi filogenetica dalla quale è emerso come vi sia una netta separazione tra organismi fungini appartenenti al phylum Ascomycota e quelli appartenenti al phylum Basidiomycota. Questa distinzione si rimarca anche in termini di numerosità di isolati appartenenti ai due phylum, con una netta preponderanza degli appartenenti agli Ascomycota rispetto ai Basidiomycota. È emerso altresì come sequenze di endofiti fungini strettamente correlati ottenuti sia da metodo dipendente dalla coltivazione che indipendente dalla coltivazione vengano a disporsi correttamente nell'albero filogenetico ottenendo elevati valori di bootstrap.



“Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l’Università degli Studi di Udine”. Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell’Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte”

Risultati



“Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine”. Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte”

Figura 16 Albero filogenetico ottenuto dall'analisi Neighbour joining sulla regione ITS di ceppi endofitici fungini ottenuti mediante metodo dipendente ed indipendente dalla coltivazione. (Bootstrap 1000, Software Mega5)

Combinando i dati ottenuti dall'analisi di sequenza con quelli ottenuti dai metodi dipendente ed indipendente dalla coltivazione (Par 8.3, 8.5) emerge come gli organismi endofiti fungini si distribuiscano in 12 ordini principali quali, Pleosporales, Dothideales, Xylariales, Helotiales, Hypocreales, Agaricales, Diaporthales, Malasseziales, Sordariales, Botryosphaerales, Erythrobasidiales ed in un raggruppamento relativo ai "mitosporic Dothideomycetes"(Figura 17).

Gli ordini Pleosporales, Dothideales, Capnodiales, Xylariales, Helotiales ed il raggruppamento dei "mitosporic Dothideomycetes" rappresentano congiuntamente il 96.54% degli endofiti fungini ottenuti con il metodo dipendente dalla coltivazione ed il 94% degli endofiti fungini ottenuti con il metodo indipendente dalla coltivazione.

L'ordine delle Pleosporales con 18 OTU's raggruppate in 7 famiglie, rappresenta da solo il 33% della variabilità in termini di OTU's totali ottenibili con i metodi dipendente ed indipendente dalla coltivazione ed il suo posizionamento all' interno dell' albero filogenetico viene supportato da elevati valori di Bootstrap. Considerando, gli ordini delle Xylariales comprendenti 6 OTU's (10 % del totale OTU's) raggruppate in 4 famiglie, e delle Helotiales comprendente 6 OTU's (10% del totale OTU's) raggruppate in 4 famiglie si ottiene il 50% della variabilità totale rilevata in vite.

Ordini come Hypocreales, Diaporthales, e Sordariales sono costituiti esclusivamente organismi endofitici fungini rilevati mediante il metodo dipendente dalla coltivazione, e rappresentano nel complesso il 3% degli organismi rilevati mediante tale metodo.

Analogamente gli ordini Agaricales, Malasseziales, Botryosphaerales, Erythrobasidiales sono annoverano organismi endofitici fungini rilevati mediante il metodo indipendente dalla coltivazione, e rappresentano nel complesso il 2,5 % degli organismi rilevati mediante tale metodo.

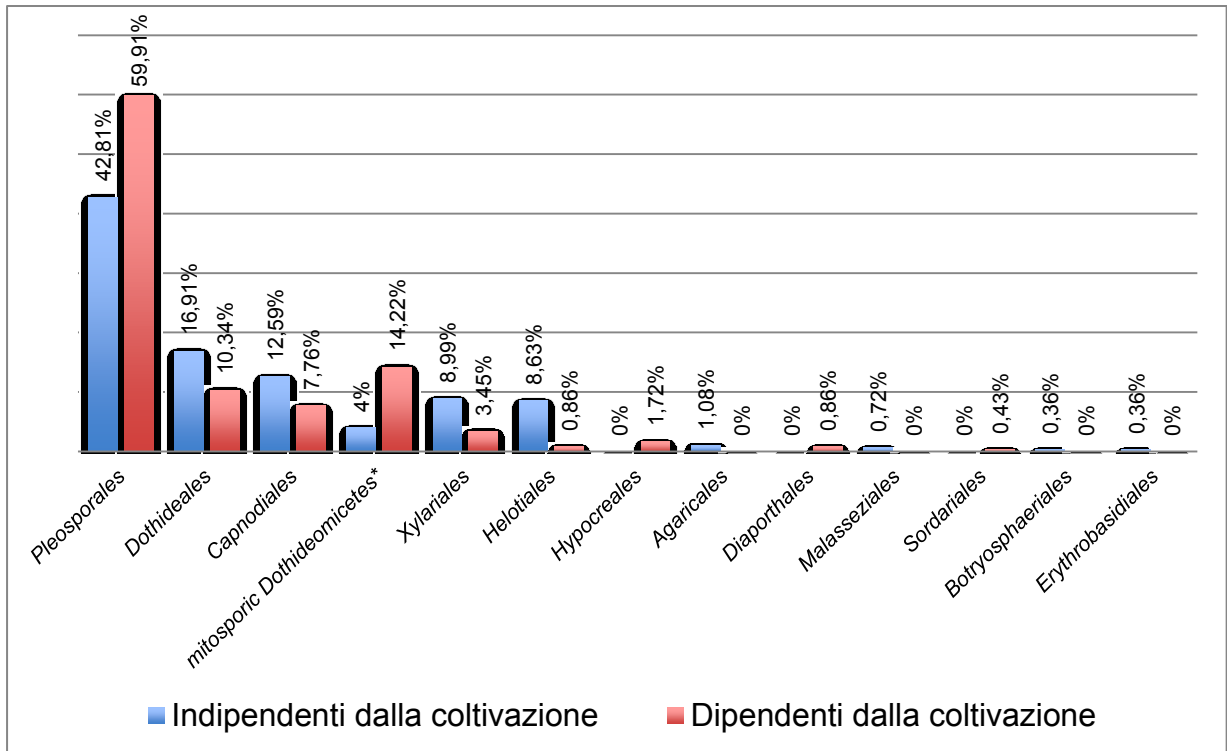


Figura 17 Consistenza percentuale degli ordini individuati dall'analisi di sequenza su organismi ottenuti con il metodo dipendente ed indipendente dalla coltivazione.

9. Sviluppo di un metodo molecolare per il fingerprinting della comunità endofitica fungina di viti sane infette e recovered da Legno nero (LN)

9.1 Messa a punto di un protocollo DGGE

9.1.1 Scelta dei primers e delle condizioni di PCR

Le temperature ottimali di annealing individuate mediante gradient PCR per le coppie ITS1F-GC/ITS2 e ITS3/ITS4-GC risultano essere 55°C e 57 °C rispettivamente. Entrambe le coppie di primers sono state testate nei confronti di DNA estratti 29 isolati fungini e da viti micropropagate. Come si può vedere in Figura 18 la coppia di primers ITS1F-GC/ITS2 ha dato risultati migliori perché ha permesso l'amplificazione della regione ITS1 da DNA fungino escludendo l'amplificazione del DNA proveniente da vite micropropagata. La coppia ITS3/ITS4-GC invece ha dato origine ad ampliconi sia a partire da DNA estratto da isolati fungini che da DNA estratto da piante di vite micropropagate.

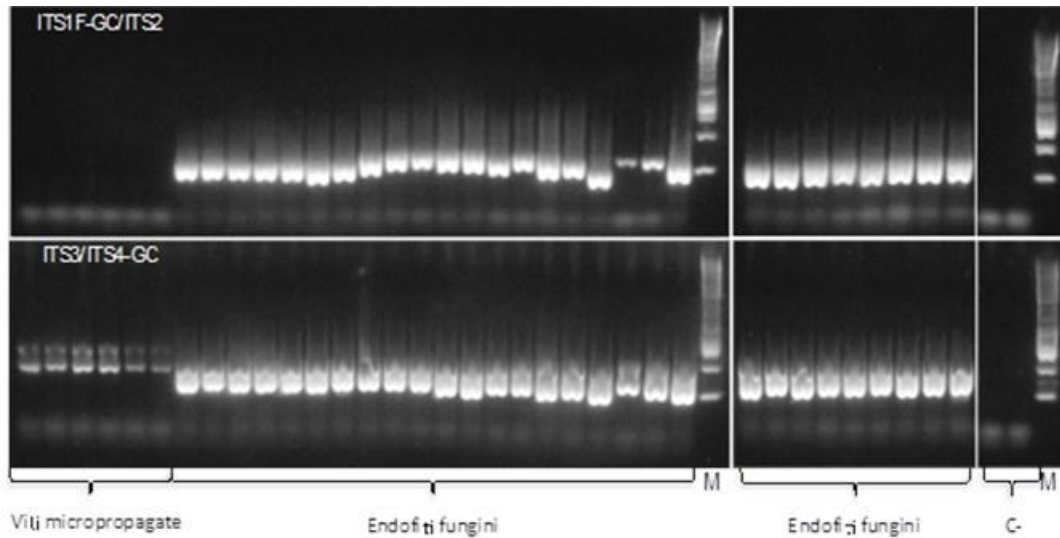


Figura 18 Amplificati di PCR di DNA fungini e viti micropropagate mediante le coppie di primers ITS1F-GC/ITS2 e ITS3/ITS4-GC. M: Marker Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas, Lituania).

9.1.2 Analisi PCR con i primers ITS1F-GC/ITS2 SU DNA di endofiti fungini ottenuti mediante i due approcci dipendente ed indipendente dalla coltivazione.

La coppia di primers ITS1F-GC/ITS2 è stata impiegata nell'analisi di PCR su DNA di endofiti fungini ottenuti con approccio dipendente ed indipendente dalla coltivazione rappresentativi di ciascuna OTU's individuata e di eventuali diversi genotipi ITS trovati all'interno di OTU's più rappresentate.

I risultati riportati in Figura 19 hanno evidenziato come sia stato possibile ottenere il prodotto di PCR, corrispondente alla regione ITS1, da tutti gli endofiti fungini utilizzati, rendendo la coppia di primers selezionata idonea all'applicazione in DGGE.

Risultati

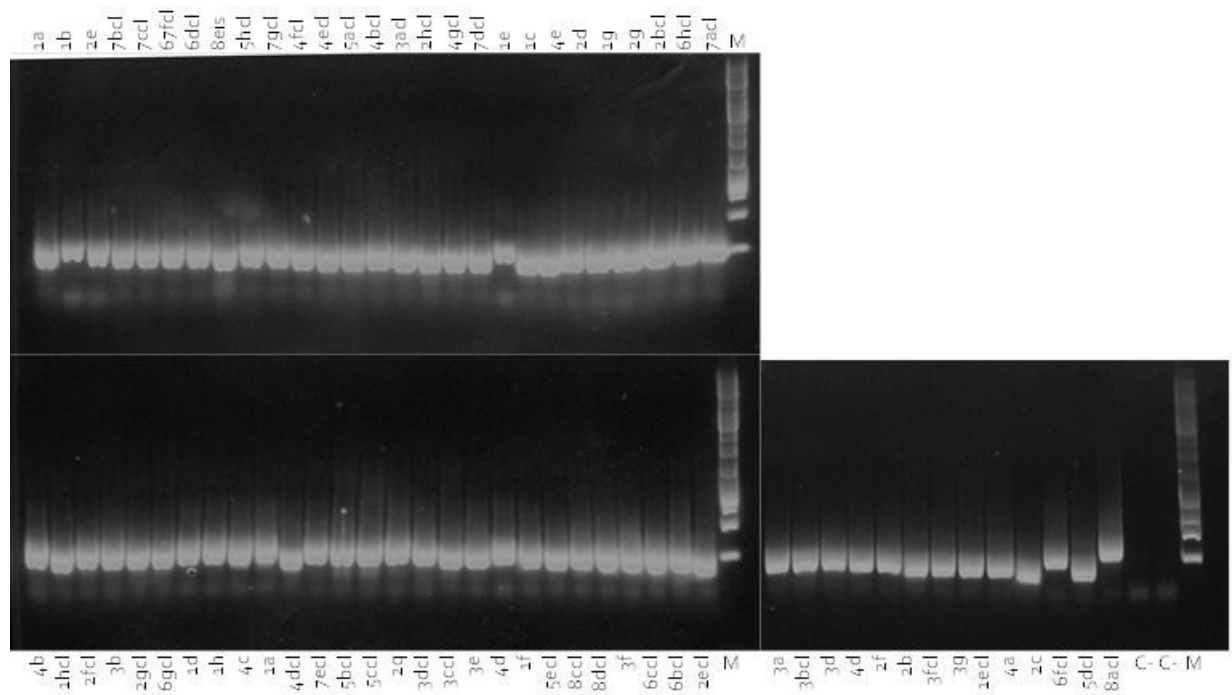


Figura 19 Amplificati di PCR con i primers ITS₁F-GC/ITS₂ di endofiti fungini ottenuti mediante approccio dipendente ed indipendente dalla coltivazione ed impiegati nell'analisi DGGE. I nomi indicati nelle Lane si riferiscono ai codici Sequenza ITS riportati in tabella 20. M: Marker Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas, Lituania)

9.1.3 DGGE

Gli amplificati di PCR ottenuti mediante approccio dipendente ed indipendente della coltivazione, riportati in Figura 19, sono stati impiegati nella messa a punto del protocollo DGGE. Il gradiente denaturante 30-45% urea-formamide si è dimostrato essere ottimale per la discriminazione degli isolati fungini ottenuti, la mobilità elettroforetica degli amplificati della regione ITS₁ è risultata adeguatamente variabile da consentire la discriminazione di organismi anche strettamente correlati.

Alla luce di questi risultati la tecnica è stata impiegata al fine di caratterizzare la comunità endofitica fungina in viti sane infette o recovered da Legno nero (BN).

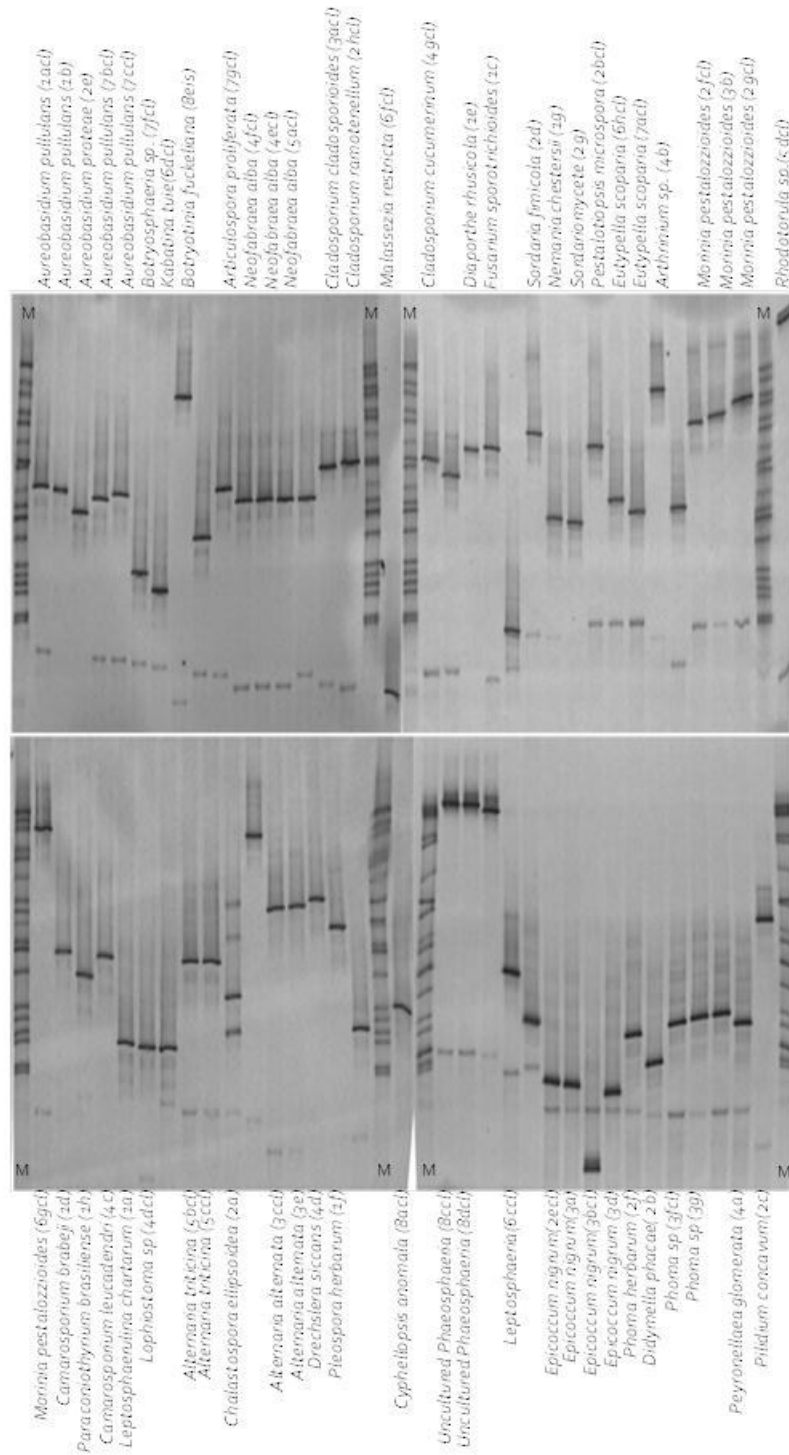


Figura 20 Corsa elettroforetica DGGE delle principali OTU's ottenute con i metodi dipendente ed indipendente dalla coltivazione. Nelle lane è indicato l'organismo e ed il codice sequenza ITS riportato in Tabella 20. M marker costituito da amplificati di PCR della regione ITS₁ ottenuti con primers ITS₁F-GC/ITS₂ dei seguenti organismi: *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Diaporthe rhusicola*, *Sordaria fimicola*, *Nemania chestersii*, *Pestalotiopsis microspora*, *Arthrinium sp*, *Morinia pestalozzioides*, *Camarosporium brabeji*, *Paraconiothyrium brasiliense*, *Camarosporium leucadendri*, *Leptosphaerulina chartarum*, *Alternaria triticina*, *Drechslera siccans*, *Sclerostagonospora opuntiae*, *Epicoccum nigrum*, *Alternaria alternata*, *Didymella phacae*, *Phoma sp Peyronellaea glomerata*.

9.2 Prove preliminari di fingerprinting delle comunità endofitiche fungine in viti sane infette o recovered da Legno nero (LN)

9.2.1 Conferma dello stato fitosanitario delle piante mediante real-time PCR

I risultati dell'analisi real-time PCR su piante sintomatiche di vite (Tabella 22) campionate nel 2010 dal vigneto di Cormons (GO) hanno consentito di confermare la presenza del fitoplasma stolbur (16SrXII-A) associato alla malattia del Legno nero. Hanno inoltre permesso di evidenziare come il DNA estratto da nervatura fogliare alla concentrazione di 20 ng/μl abbia fornito i risultati migliori in termini di "detection" del fitoplasma del Legno nero (16SrXII-A) sulla base dei valori di C(t). Il DNA estratto da tessuto floematico di tralcio alla concentrazione di 60 ng/μl ha fornito risultati comparabili a quelli ottenuti dal DNA estratto da nervatura fogliare in termini di numero di piante risultate positive, mentre alla concentrazione di 20 ng/μl si è potuto verificare come in due piante la presenza del fitoplasma non sia risultata rilevabile.

Tutte le piante sane e "recovered" all'osservazione dei sintomi in campo sono risultate uniformemente negative alla presenza del fitoplasma in tutte le combinazioni di tessuti e concentrazioni di DNA utilizzate.

Tabella 22 Risultato dell'analisi real-time PCR su piante sintomatiche affette dal fitoplasma del Legno nero (16SrXII-A) campionate nel 2010 dal vigneto di Cormons (GO) in funzione del tessuto vegetale utilizzato e concentrazione del DNA impiegato.

			Nervatura 20 ng/μl		Tralcio 20 ng/μl		Tralcio 60 ng/μl	
Filare	Palo	Vite	C (t)	Esito	C (t)	Esito	C (t)	Esito
1	12	2	24,584	+	37,211	+	30,145	+
1	21	4	24,765	+	35,215	+	31,228	+
1	27	2	23,951	+	36,112	+	32,128	+
1	38	4	27,413	+	36,305	+	34,999	+
1	46	3	23,025	+	35,806	+	32,055	+
1	71	1	22,743	+	35,643	+	30,234	+
2	19	3	23,556	+	33,983	+	31,625	+
2	20	4	24,418	+	36,252	+	35,549	+
2	24	4	25,526	+	32,435	+	30,711	+
2	25	2	24,178	+	34,142	+	31,12	+
2	54	1	24,349	+	38,715	+	31,155	+
2	66	4	25,933	+		-	33,39	+
2	68	2	23,385	+	37,939	+	31,538	+
2	76	2	23,232	+	36,948	+	34,314	+
2	81	3	25.119	+		-	32,616	+
2	94	3	23.747	+	35,300	+	30,328	+

I risultati dell'analisi real-time PCR su piante sintomatiche all'osservazione dei sintomi in campo e campionate nel 2011 dal vigneto di Cormons (GO) affette dal fitoplasma del Legno nero (16SrXII-A) (Tabella 23) hanno dimostrato come tre piante siano risultate negative alla presenza del fitoplasma. Le piante sintomatiche campionate nel 2011 non erano le stesse dell'anno prima perché queste ultime sono state nel frattempo espianate. Tutte le piante asintomatiche o "recovered" all'osservazione dei sintomi in campo sono risultate uniformemente negative alla presenza del fitoplasma.

Tabella 23 Risultati dell'analisi real-time PCR su piante sintomatiche affette dal fitoplasma del Legno nero (16SrXII-A) campionate nel 2011 dal vigneto di Cormons (GO) D5: Pianta sintomatica da 5 anni di osservazione.

Filare	Palo	Vite	Stato Fitosanitario 2011	C (t)	ESITO
3	38	3	D 5	36,986	+
3	38	4	D 5	31,325	+
3	47	3	D 5	31,709	+
3	50	2	D 5		-
3	57	1	D 5	34,631	+
3	92	2	D 5	33,512	+
4	7	4	D 5	34,642	+
4	9	4	D 5	35,012	+
4	11	4	D 5	31,575	+
4	12	4	D 5		-
4	59	4	D 5	29,515	+
4	76	4	D 5	32,66	+
4	79	4	D 5	35,405	+
4	81	4	D 5	33,026	+
5	10	3	D 5		-

Il risultato dell'analisi RT-PCR su piante sintomatiche (Tabella 24) campionate nel 2010 e nel 2011 dal vigneto di Cormons (GO) ha consentito di confermare la presenza del fitoplasma del Legno nero (16SrXII-A) nella maggior parte delle piante analizzate in entrambi gli anni.

Tabella 24 Risultato dell'analisi Real-time PCR eseguita su DNA estratto da tessuto floematico di tralcio di piante sintomatiche affette dal fitoplasma del Legno nero (16SrXII-A) campionate nel 2011 nel vigneto di Lucinico (GO). D: Pianta sintomatica; NR: Pianta con remissione dei sintomi nell'anno 2011.

Filar e	Vite	Tralcio 2010			Tralcio 2011		
		Stato fitosanitario 2010	C (t)	Esito	Stato fitosanitario 2011	C (t)	Esito
7	39	D	32,852	+	D	36,779	+
7	40	D	38,098	+	D		-
7	42	D	30,298	+	D	32,337	+
7	48	D	30,088	+	NR		-
7	55	D	28,763	+	D	35,496	+
7	100	D	33,016	+	NR		-
8	83	D		-	NR		-
8	130	D	32,14	+	D	35,23	+
8	135	D	31,314	+	D	32,8	+
9	38	D	30,575	+	NR		-
9	55	D	34,902	+	D	34,518	+
9	77	D	35,989	+	D	34,651	+
10	59	D	28,249	+	D	37,499	+
10	120	D	29,222	+	NR		-
10	130	D	31,553	+	D	33,372	+

In tabella 14 si può notare come 4 piante sintomatiche all'osservazione dei sintomi nel 2010 (7-48; 7-100; 9-38; 10-120) e positive alla RT-PCR, siano risultate asintomatiche e quindi "recovered" nel 2011, stato peraltro confermato dai risultati di real-time PCR.

Una pianta (8-83) sintomatica all'osservazione dei sintomi nel 2010 ma non confermata in RT-PCR si è dimostrata asintomatica nel 2011 confermata da analisi RT-PCR.

Anche nel caso delle piante di vite di Lucinico, Tutte le piante sane e recovered all'osservazione dei sintomi nel 2010 e nel 2011 sono risultate negative alla presenza del fitoplasma in Real-time PCR.

9.3 Analisi DGGE delle viti campionate a nelle località di Lucinico e Cormons.

La regione ITS degli organismi endofitici fungini è stata amplificata con i primers ITS1F-GC-ITS2 (Par 6.4.3) a partire dal DNA genomico totale estratto (Par.7.2.2) dalle viti campionate nei vigneti a conduzione convenzionale nelle località di Lucinico e Cormons. Tutte le viti analizzate testate hanno evidenziato una buona amplificazione di PCR.

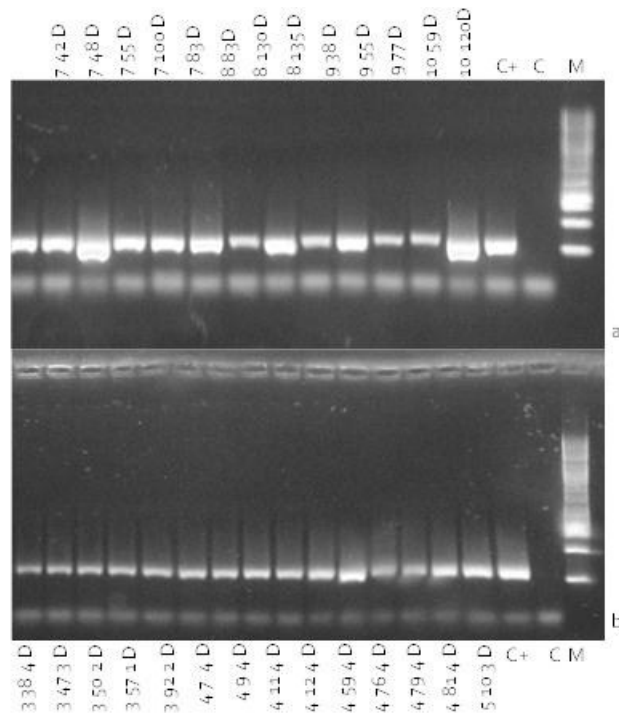


Figura 21 Amplificati di PCR con i primers ITS₁F-GC-ITS₂ del DNA genomico estratto da viti campionate nei vigneti di Lucinico (GO) e Cormons (GO) M: Marker Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas, Lituania)

La corsa elettroforetica DGGE, di degli ampliconi così prodotti, ha consentito di evidenziare una serie di profili associabili a diverse OTU's endofitiche fungine presenti all'interno di ciascun campione. In particolar modo si evidenziano i profili ricorrenti con mobilità elettroforetica corrispondente a quella di *Alternaria alternata* (3e), *Drechslera siccans* (4d), e *Cladosporium cladosporioides* (Figura 22). Dall'altro lato sono evidenziabili profili con mobilità elettroforetica associabile ad organismi quali *Paraconiothyrium brasiliense* (1h), *Fusarium sporotrichioides* (1c) *Camarosporium brabeji* (1d) che si presentano con minore frequenza (Figura 22).

L'analisi preliminare dei profili ottenuti condotta utilizzando il software GelCompar II (Applied Maths NV) su tutti i profili DGGE ottenuti dalle piante analizzate, non ha tuttavia consentito la determinazione di una correlazione univoca tra composizione della comunità endofitica e stato fitosanitario delle piante. La tecnica adottata è risultata essere in grado di evidenziare biodiversità presente in vite consentendo di appurare come esistano delle marcate differenze in termini di composizione endofitica sia tra piante diverse presenti in uno stesso vigneto. Si rileva inoltre come le viti presenti nei due vigneti a conduzione convenzionale, mostrino biodiversità differenti.

"Tesi di dottorato di Simone Grisan, discussa presso l'Università degli Studi di Udine". Soggetta alle licenze *creative commons* (<http://creativecommons.org/choose/>) – Sono comunque fatti salvi i diritti dell'Università degli Studi di Udine di riproduzione per scopi di ricerca e didattici, con citazione della fonte"

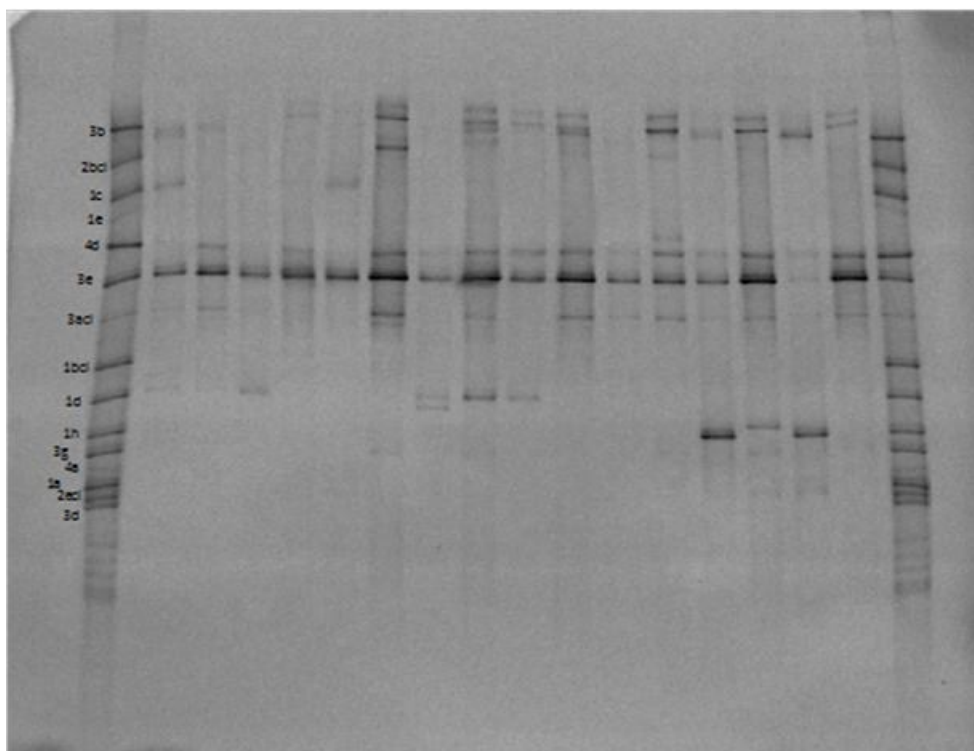


Figura 22 Profili DGGE ottenuti da Amplificati di PCR con i primers ITS1F-GC-ITS2 del DNA estratto da viti campionate nei vigneti di Lucinico (GO) e Cormons (GO) nel 2011.

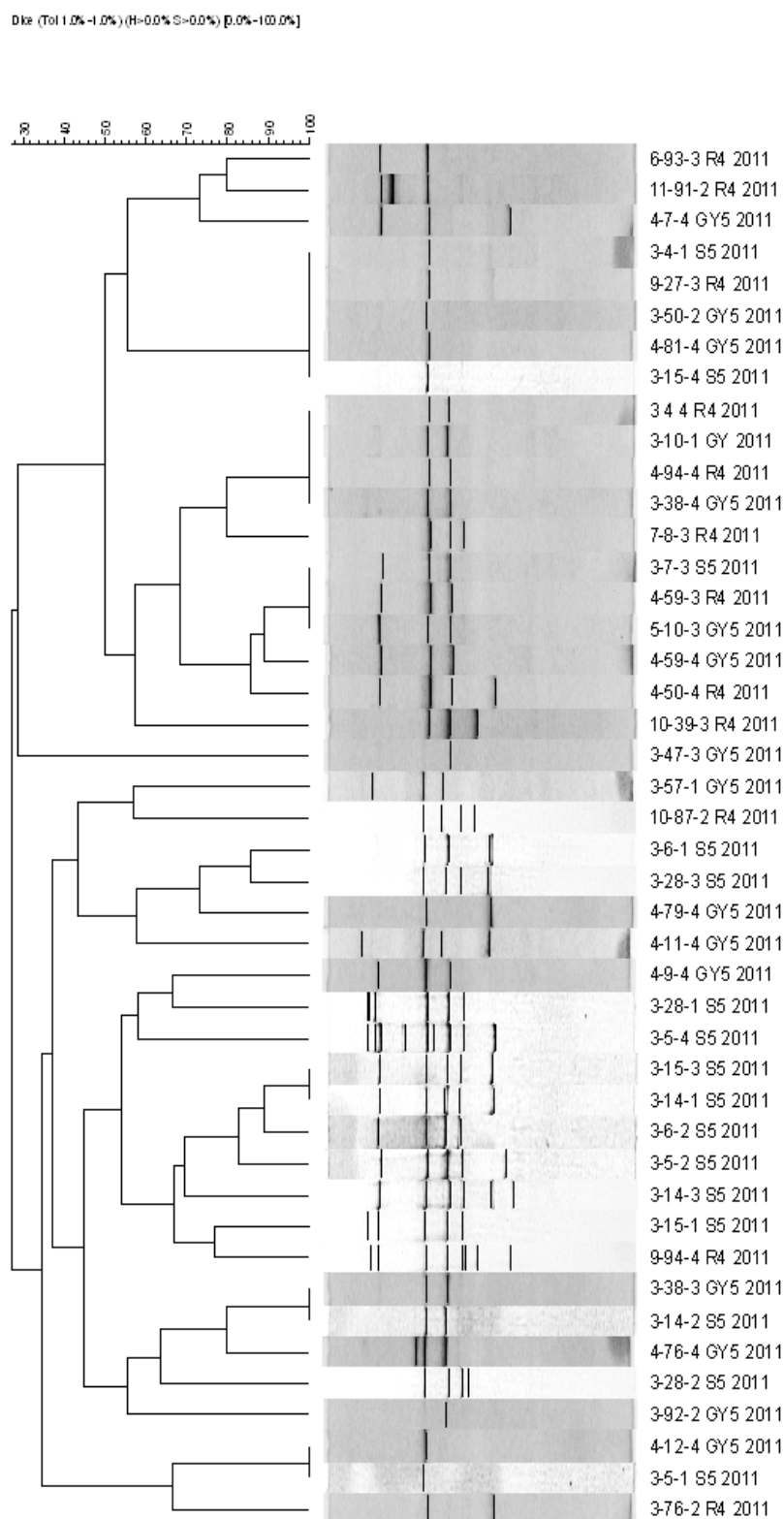


Figura 23 Dendrogramma dei profili DGGE ottenuti da piante sane (G) recovery (R) e disease (GY) campionate nel 2011 in località Cormons. Coefficiente di similarità Dyce, Cluster analysis UPGMA(Software GelComparII)

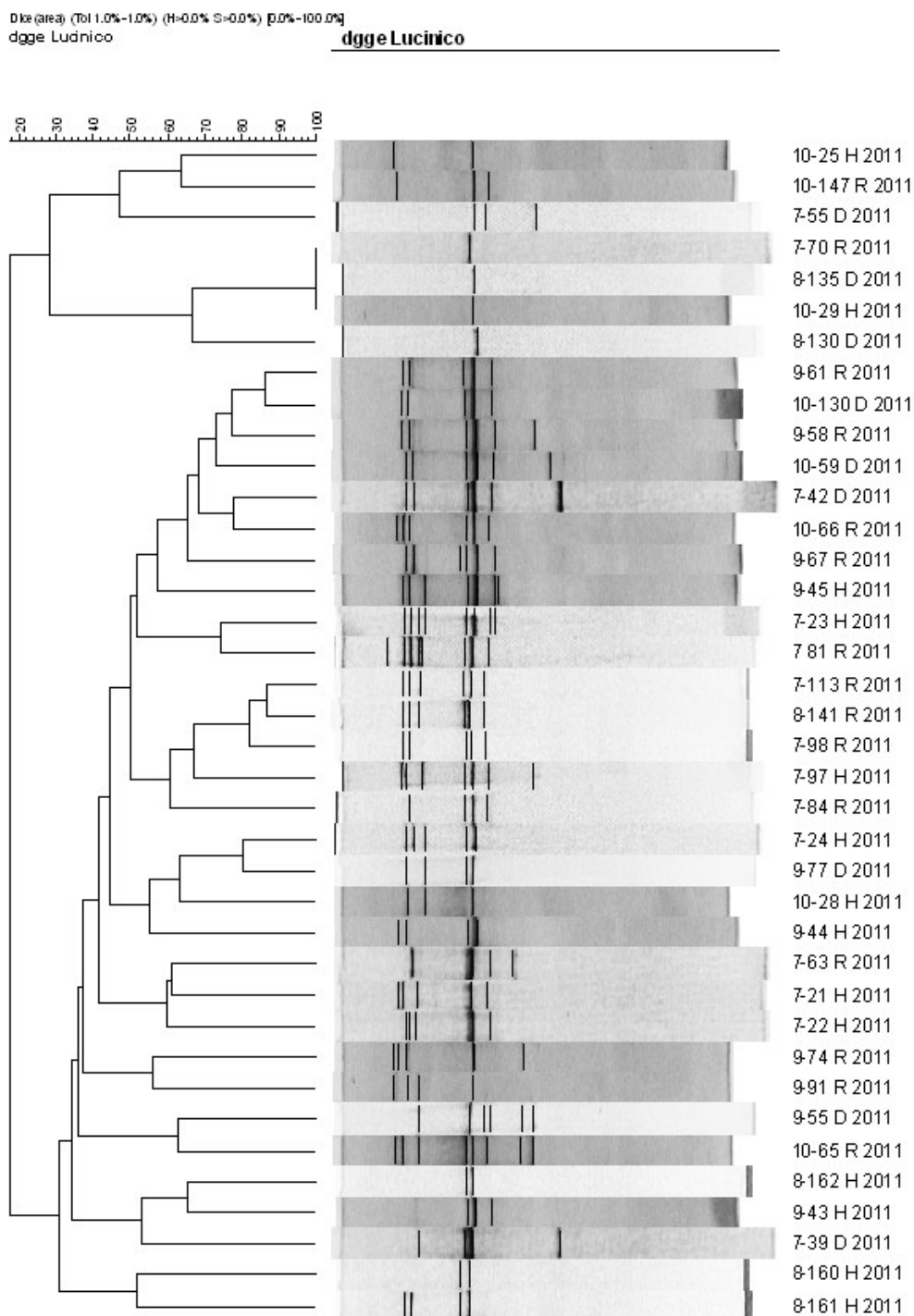


Figura 24 Dendrogramma dei profili DGGE ottenuti da piante sane (G) recovery (R) e disease (GY) campionate nel 2011 in località Lucinico. Coefficiente di similarità Dyce, Cluster analysis UPGMA(Software GelComparII)

Discussione

Discussione

Il sistema biologico-vegetale connesso con l'agricoltura sta diventando progressivamente più fragile e per questo più difficile da governare. Bastano lievi turbamenti perché esso entri in crisi (Osler, 2011) Sempre più frequentemente si tende a dimenticare come in natura le piante siano in un equilibrio dinamico con l'ambiente e come alterando questi equilibri l'uomo sta progressivamente indebolendo il sistema dal quale in fin dei conti dipende. L'agricoltura moderna dipende sempre maggiormente da pesanti interventi chimici, il moltiplicarsi di nuovi principi attivi licenziati ogni anno ne è la testimonianza. Il sopravvento di gravi malattie quali Flavescenza dorata e Legno nero, incurabili mediante interventi chimici, hanno dato impulso alla ricerca scientifica volta alla individuazione di una possibile soluzione del problema. Nell'ambito di questi studi (Schmid 1965; 1975; Osler et al., 1999) è stato osservato un fenomeno di risanamento spontaneo e duraturo di piante sia di Vite che di melo ed albicocco, le cui basi fisiologiche sono tuttora in via di definizione (Musetti et al., 2005; 2006; 2007; Carraro et al., 2004; Romanazzi et al., 2008).

Un potenziale ruolo delle comunità endofitiche nel fenomeno del recovery è stato ipotizzato in diversi lavori (Bulgari et al., 2011; Musetti et al., 2011). Gli endofiti infatti sono riportati in letteratura essere induttori di risposte di difesa nelle piante (Walters 2009), possiedono inoltre un'azione diretta nei confronti di numerosi organismi patogeni, e sono in grado di incrementare la resistenza agli stress nelle piante ospite.

Il presente lavoro di tesi ha voluto in prima battuta descrivere la massima biodiversità possibile presente in vite. Da numerosi e recenti lavori riscontrati in letteratura emerge come un approccio polifasico sia garanzia di esplorazione della massima biodiversità di un sistema, dalla comunità batterica del suolo, alla composizione microbica delle acque di scarto fino alla determinazione delle comunità endofitiche o epifitiche di piante di interesse agronomico o ecologico in ecosistemi antropici o naturali.

Nel presente lavoro sono stati utilizzati due metodi, uno dipendente dalla coltivazione, basato sia su analisi di micologia classica che di biologia e molecolare, e uno indipendente dalla coltivazione basato su analisi molecolari.

L'approccio dipendente dalla coltivazione nella sua componente micologica ha consentito in primo luogo di determinare come alle condizioni sperimentali adottate, il nodo ed in particolare il nodo di due anni sia il tessuto vegetale dal quale si siano ottenuti le percentuali maggiori di isolamento. Si è determinato in oltre come a parità di località e di conduzione

Discussione

agronomica, piante inselvatichite di bordo vigneto generino le percentuali più elevate di isolamento, ciò potrebbe suggerire come le minori pressioni antropiche alle quali queste piante sono assoggettate possa incrementarne la biodiversità. L'analisi micologica classica ha consentito inoltre di suddividere gli isolati ottenuti in 10 generi fungini. L'affiancamento di metodiche molecolari quali l'analisi PCR della regione ITS mediante utilizzo dei primers universali per funghi ITS₁/ITS₄, l'analisi RFLP delle sequenze ottenute ed il relativo sequenziamento, hanno portato alla caratterizzazione a livello di specie di tutti i 10 generi endofitici isolati, consentendo inoltre l'individuazione di ulteriori 19 specie. È stato quindi possibile evidenziare variabilità laddove, carenze di caratteri morfologici, abbiano limitato le possibilità di l'identificazione. L'impiego di un approccio molecolare indipendente dalla coltivazione consistente nel clonaggio molecolare, analisi RFLP e successivo sequenziamento molecolare ha permesso l'identificazione 27 nuove specie fungine. All'interno di queste specie si annoverano sia organismi a lenta crescita, *non coltivati* (sui substrati artificiali e alle condizioni sperimentali impiegate), che specie fungine *non coltivabili* ma comunque presenti all'interno dei tessuti vegetali analizzati. Queste due tipologie di endofiti, *non coltivati* e *non coltivabili*, sono state rilevate mediante l'impiego del metodo molecolare indipendente dalla coltivazione.

Dall'analisi dei risultati ottenuti dall'applicazione dei due metodi, è emerso come la percentuale di endofiti fungini rilevati sia stata maggiore nel metodo indipendente dalla coltivazione rispetto a quelli rilevati mediante il metodo dipendente dalla coltivazione. Tuttavia né il metodo dipendente dalla coltivazione né il metodo indipendente dalla coltivazione, qualora usati indipendentemente l'uno dall'altro, siano in grado di rilevare il 100% della biodiversità ottenibile con l'applicazione congiunta dei due metodi. È stato quindi osservato quanto riportato in letteratura. È stato possibile inoltre determinare come più del 90% degli organismi fungini ottenuti dal metodo dipendente dalla coltivazione, e più dell'80% di quelli ottenuti dal metodo indipendente dalla coltivazione appartengano a 7 generi principali quali *Alternaria* sp. *Phoma* sp. *Epicoccum* sp. *Aureobasidium* sp. *Cladosporium* sp. *Pestalotiopsis* sp. *Pestalotia* sp. La presenza di questi generi è stata confermata in un recente lavoro condotto in Spagna volto a individuare la comunità fungina endofitica presente in diversi tessuti vegetali di 9 Varietà di Vite coltivate in 6 zone viticole (González V. & Tello M.L., 2010).

Discussione

La costante elevata frequenza di isolamento di queste specie endofitiche a partire da tessuti e fasi fenologiche diverse di viti sane, indica come, nell'ecosistema considerato, queste ultime, rappresentino la condizione equilibrio più frequente. Dall'altro lato è inoltre stato possibile determinare specie endofitiche fungine, tra le quali *Lophiostoma macrostomum* *Neofabraea alba* *Rhodotorula* sp. *Phaeosphaeria* sp. che sono state ottenute con basse frequenze mediante il metodo indipendente dalla coltivazione. Queste specie, nonostante la loro bassa frequenza potrebbero rivelarsi importanti specie indicatrici di uno stato della pianta o la cui presenza o assenza possa avere delle ripercussioni nel fenomeno del recovery.

Nel presente si è notato come le percentuali di isolamento ottenute mediante l'approccio dipendente dalla coltivazione dei diversi endofiti fungini, possano differire dalle percentuali ottenute dall'analisi delle librerie di cloni ottenute dal metodo indipendente dalla coltivazione, questa discordanza potrebbe essere imputata a:

- diversità in termini di campionamento; il metodo dipendente dalla coltivazione è stato impiegato al fine di ottenere la massima biodiversità di organismi coltivabili in vitro, presenti in vite, analizzando pertanto diversi tessuti vegetali come lamina fogliare, tessuti floematici da tralcio quali porzioni di nodo dell'anno, nodo di 2 anni, ed internodo. Nell'approccio indipendente dalla coltivazione, considerata la necessità ridurre al massimo la presenza di contaminazioni dovute a DNA di organismi epifiti è stato utilizzato il tessuto floematico da tralcio comprendente porzioni di nodo ed internodo, che, diversamente dalla lamina fogliare, consente, previa sterilizzazione e scortecciamento, di essere ragionevolmente scevro dalle suddette possibilità di contaminazione.
- Amplificazione preferenziale; i primers ITS1F-ITS4 impiegati nel metodo dipendente dalla coltivazione come molti altri primers presenti in letteratura, sono soggetti, in diverso grado, alla generazione un'amplificazione preferenziale di DNA target fungini, presenti in un numero maggiore di copie a scapito di quelli presenti in minor quantità, o amplificare in maniera differente templati con diversa affinità di sequenza presente nella regione di attacco dei primers, il che si tradurrebbe in una alterazione delle proporzioni degli ampliconi clonati. Queste criticità sono riportate in diversi lavori in letteratura e sono comuni a tutti i lavori implicanti l'utilizzo di metodiche molecolari basate sulla reazione di PCR (Kirk et al., 2004; Vainio & Hantula., 1999; Bellemain et al., 2010)

Discussione

- Criticità nelle fasi di estrazione; strutture di resistenza come blastospore, clamidiospore periteci cleistoteci qualora presenti nei tessuti utilizzati per l'isolamento danno con facilità origine ad una colonia fungina, contrariamente le stesse strutture potrebbero costituire un punto di criticità nelle fasi di estrazione del DNA.

In definitiva l'utilizzo congiunto dei due metodi, unitamente all'analisi Blast delle sequenze ottenute ha consentito l'identificazione di 50 (OTU's) associabili a 50 organismi endofitici fungini diversi. Un'analisi più approfondita delle sequenze ottenute, mediante software di allineamento Bioedit, ha messo in luce la presenza di polimorfismi all'interno delle OTU's generate, il che potrebbe significare, che la biodiversità possa essere ancora più ampia, individuando in tal modo fino a 21 ulteriori genotipi ITS.

Gli approcci applicati nel presente lavoro sono in letteratura descritti come metodi richiedenti un forte consumo di tempo e risorse, tuttavia rimangono basilari per un approccio completo allo studio delle comunità endofitiche. Nel presente lavoro si è voluto quindi mettere a punto una tecnica per il fingerprinting della comunità microbica presente in vite che sia al contempo meno dispendiosa in termini di risorse e che possa consentire una stima rapida della comunità endofitica presente in vite. È stata quindi focalizzata l'attenzione sulla tecnica di fingerprinting, Denaturant Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) utilizzata frequentemente in letteratura per la discriminazione delle comunità batteriche presenti nel suolo ma indicata anche per studi in pianta. Sono state valutate diverse coppie di primers specifiche per il DNA fungino escludenti il DNA della pianta, applicabili a DGGE, da questo studio è emerso come la coppia ITS₁F-GC/ITS₂ si sia rivelata idonea a tale scopo. La messa a punto del gradiente denaturante e delle condizioni di elettroforesi sono state altrettanto determinanti per una ottimale discriminazione dei diversi organismi. Gli organismi individuati mediante i due metodi dipendente e indipendente dalla coltivazione hanno avuto la duplice funzione di descrivere la comunità endofitica fungina in vite e di servire al contempo come database per la messa a punto della tecnica di fingerprinting (DGGE).

Dall'analisi DGGE di tutti gli organismi fungini ottenuti è emerso come la maggior parte di questi possa essere discriminata alle condizioni denaturanti, di elettroforesi e con i primers di PCR selezionati. È stato messo in luce come la tecnica sia in grado di differenziare specie strettamente correlate esistendo tuttavia la possibilità di comigrazione di profili appartenenti ad organismi diversi.

Discussione

La messa a punto della tecnica di DGGE, e la verifica della possibilità di discriminare la maggior parte delle OTU's ottenute, ha costituito il punto di partenza per un'applicazione pratica del metodo descritto. Si è voluto quindi allestire una prova preliminare di fingerprinting della comunità endofitica fungina presente in viti sane infette o recovered da legno nero al fine di verificarne l'esistenza di una possibile correlazione. Sono state studiate piante provenienti da due vigneti di Cormons e Lucinico aventi un'elevata incidenza di "recovery". La verifica della presenza del giallume della vite in campo e la successiva conferma dell'infezione da fitoplasma del legno nero nelle viti nei due vigneti con elevata incidenza di recovery individuati sia a Lucinico che a Cormons, è stata al contempo essenziale ed informativa. È stato possibile constatare come il recovery è un fenomeno in evoluzione nei vigneti individuati. È emerso infatti che dal confronto di 14 viti sintomatiche e positive alla real-time PCR nel 2010, 4 nel 2011 sono risultate asintomatiche e negative alla real-time-PCR. Tale dato, al momento, pur non costituendo evidenza di "recovery" in senso stretto, in quanto carente in termini di verifica della permanenza nel tempo dello stato di asintomaticità, costituisce un dato interessante relativo all'evoluzione della malattia (Par 9.2.1). La diagnosi del fitoplasma del Legno nero nei tessuti delle piante campionate nei due anni di indagine ha costituito un ulteriore elemento di riflessione. Dai risultati ottenuti è stato confermato come i migliori risultati per la diagnosi della presenza del fitoplasma del Legno nero mediante analisi real-time PCR siano stati ottenuti analizzando il DNA estratto da nervatura fogliare. Nel presente lavoro, tuttavia, sia nell'approccio dipendente dalla coltivazione che in quello indipendente dalla coltivazione, sono stati impiegati tessuti vascolari provenienti da tralcio. È stata pertanto valutata, la possibilità di diagnosticare il fitoplasma del Legno nero mediante analisi real-time PCR anche a partire da questa tipologia di tessuto vegetale. Dai risultati ottenuti, è stato confermato come, la diagnosi del fitoplasma del Legno nero sia stata possibile a partire da entrambi i tessuti.

Confermato lo stato fitosanitario delle piante presenti nei vigneti di Lucinico e Cormons, si è proceduto alla loro analisi di fingerprinting mediante DGGE. Dall'analisi dei risultati ottenuti dalla prova di fingerprinting, è emerso come la tecnica sia risultata appropriata all'analisi della biodiversità presente in vite mettendo in luce differenze nella composizione di organismi endofiti presenti nelle diverse piante analizzate. L'analisi cluster preliminare condotta mediante software GelCompar II® dei pattern DGGE ottenuti per ogni singola pianta

Discussione

analizzata non ha al momento permesso di stabilire una correlazione univoca tra composizione endofitica e stato fitosanitario. Rimanendo tuttavia evidente la necessità di ulteriori indagini e perfezionamenti nell'analisi dei dati, risulta comunque possibile generare ipotesi alternative che prevedano, l'implicazione di singole specie endofitiche fungine, definibili come "indicatrici", nell'instaurarsi e nel mantenimento del recovery nel tempo.

La messa a punto e la verifica di applicabilità della metodica di fingerprinting mediante DGGE, eseguita nel presente lavoro di tesi, unitamente alla creazione del database di endofiti fungini della vite, costituiscono gli strumenti operativi di partenza per poter eseguire queste verifiche, ed avvicinarsi ulteriormente alla comprensione delle complicate dinamiche che stanno alla base del fenomeno del recovery.

Bibliografia

- 1) Albertazzi, G., Milc, J., Caffagni, A., Francia, E., Roncaglia, E., Ferrari, F., Tagliafico, E., Stefani, E., Pecchioni, N. 2009. Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. *Plant Science* 176: 792–804
- 2) Angelini E., Bianchi G.L., Filippin L., Morassutti C., Borgo M. 2007. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 68:613–622.
- 3) Angelini E., Negrisolo E., Clair D., Borgo M., Boudon-Padieu E. 2003. Phylogenetic relationships among Flavescence dorée isolates and related phytoplasmas determined by Heteroduplex Mobility Assay and sequences of ribosomal and non-ribosomal DNA. *Plant Pathology*, 52:663–672.
- 4) Arnaud G., Malembic-Maher S., Salar P., Bonnet P., Maixner M., Marcone C., Boudon-padieu E., Foissac X. 2007. Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:4001–4010.
- 5) Arnold A.E. 2007. Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress, challenges and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21: 51-66.
- 6) Arnold A.E., Herre E.A. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (*Malvaceae*). *Mycologia* 95: 388–398.
- 7) Arnold A.E., Mejía L.C., Kyllö D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N., Herre E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100: 15649–15654.
- 8) Bacon C.V., Wite J.F.J., 2000. Physiological adaptation in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae In: Bacon CW, White J.F.J, eds. *Microbial endophytes*. New York, NY, USA: Marcel Dekker Inc., 237–263.
- 9) Bacon C.W., Porter J.K., Robbins J.D, and Luttrell E.S 1977. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Appl Environ Microbiol*, 34(5): 576-581.

Bibliografia

- 10) Barry D., Darrah L.L. 1991. Effect of research on commercial hybrid maize resistance to European corn-borer (*Lepioptera, Pyralidae*). *Journal of Economic Entomology*, 84:1053–1059.
- 11) Bartnicki-Garcia S 1970 Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. In: Harbone JB (ed) *Phytochemical phylogeny*. Academic, London, pp 81–103
- 12) Bartnicki-Garcia S., 1987. The cell wall in fungal evolution. In: Rayner ADM, Brasier CM, Moore D (eds) *Evolutionary biology of the fungi*. Cambridge University Press, New York, pp 389–403
- 13) Bellemain E, Carlsen T., Brochmann C., Coissac E., Taberlet P and Kauserud H., 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10:189.
- 14) Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C., Codon A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7:249–260.
- 15) Besl H., Bresinsky A., 1997. Chemosystematics of Suillaceae and Gomphidiaceae (suborder Suillineae). *Plant Syst Evol* 206:223–242
- 16) Bianco P.A., Casati P., Marziliano N. 2004. Detection of phytoplasmas associated with grapevine Flavescence dorée disease using real-time PCR. *Journal of Plant Pathology*, 86:259–264.
- 17) Bixby A.J., Potter D.A., 2010. Influence of endophyte (*Neotyphodium lolii*) infection of perennial ryegrass on susceptibility of the black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) to a baculovirus. *Biological control*, 54(2): 141-146.
- 18) Borneman, J. and Triplett, E. W. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 2647-2653.
- 19) Botti S., Bertaccini A. 2003. Variability and functional role of chromosomal sequences in phytoplasmas of 16Srl-B subgroup (aster yellows and related strains). *Journal of Applied Microbiology*, 94:1–8.
- 20) Bougoure D.S., Cairney J.W.G. 2005. Fungi associated with hair roots of *Rhododendron lochiaie* (*Ericaceae*) in an Australian tropical cloud forest revealed by culturing and culture-independent molecular methods. *Environmental Microbiology*, 7(11): 1743–1754.

Bibliografia

- 21) Bridge P.D., 1985. An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterization of species of *Penicillium* subsection *Fasciculata*. *J Gen Microbiol* **131**:1887–1895
- 22) Bulgari D., Casati P., Crepaldi P., Daffonchio D., Quaglino F., Brusetti L., and Bianco P.A., 2011. Restructuring of Endophytic Bacterial Communities in Grapevine Yellow-Diseased and Recovered *Vitis vinifera* L. *Plants. Applied And Enviromental Microbiology* **77**(14): 5018–5022
- 23) Bulgari, D., et al. 2009. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. *J. Microbiol.* **47**:393–401.
- 24) Buono R., Vallariello G., 2002. Introduzione e diffusione della vite (*Vitis vinifera* L.) in Italia. *Delpinoa*, **44**: 39-51.
- 25) Carlile MJ., Watkinson S.C and Gooday G.W 2001. *The Fungi*. Copyright © 2001 Elsevier Ltd.
- 26) Carraro L., Ferrini F., Labonne G., Ermacora P., Loi N. 2004. Seasonal infectivity of *Cacopsylla pruni*, vector of European stone fruit yellows phytoplasma. *Annals of Applied Biology*, **144**:191–195.
- 27) Christensen N.M., Nicolaisen M., Hansen M., Schulz A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time pcr and bioimaging. *MPMI*, **17**(11):1175–1184.
- 28) Cimerman A., Pacifico D., Salar P., Marzachi C., Foissac, X. 2009. Striking diversity of *vmp1*, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**:2951–2957.
- 29) Clapp J.P. van der Stoel C.D. van der Putten W.H., 2000. Rapid identification of cyst (Heterodera spp., Globodera spp.) and root- knot (Meloidogyne spp.) nematodes on the basis of ITS2 sequence variation detected by PCR-single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) in cultures and field samples. *Mol. Ecol.* **9**:1223–1232.
- 30) Clay K., 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**: 10–16.
- 31) Clay K., Schardl C., 2002. Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses. *The American Naturalist*, **160**: S99-S127.

Bibliografia

- 32) Conrath U., Pieterse C.M.J and Mauch-Mani B., 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **7**:210–216.
- 33) Conti M., Vidano C., 1988. Auchenorrhinchi e trasmissione di agenti fitopatogeni in Italia. *Atti Giornate Fitopatologiche* **3**: 27-50.
- 34) Cooney J.M., Lauren D.R., Di Menna M.E. 2001. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**:522–526.
- 35) Credi R., Terlizzi F., Bissani R., Poggi Pollini C. 2001. Presenza e diffusione dei fitoplasmi del legno nero e della flavescenza dorata della vite in Emilia-Romagna. *Vignevini*, **12**:107–110.
- 36) Credi R., Terlizzi F., Stimilli G., Nardi S., Lagnese R. 2002. Flavescenza dorata della vite nelle Marche. *L'Informatore Agrario*, **22**:61–63.
- 37) Currah R.S, Van Dyk M. 1986. A survey of some perennial vascular plant species native to Alberta for occurrence of mycorrhizal fungi. *Canadian Field-Naturalist*, **100**: 330–342.
- 38) Daire X., Boudon-Padieu E., Berville A., Schneider B., Caudwell A. 1992. Cloned DNA probes for detection of grapevine Flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). *Annals of Applied Biology*, **121**:95–103.
- 39) Daire X., Clair D., Larrue J., Boudon-Padieu E. 1997b. Research note; survey for grapevine yellows phytoplasmas in diverse European countries and Israel. *Vitis*, **36**:53–54.
- 40) Daire X., Clair D., Larrue J., Boudon-Padieu E., Alma A., Arzone A., Carraro L., Osler R., Refatti E., Granata G., Credi R., Tanne E., Pearson R., Caudwell A. 1993. Occurrence of diverse MLOs in tissues of grapevine affected by grapevine yellows in different countries. *Vitis*, **32**:247–248.
- 41) Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H. 1967. Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or Paulownia witches' broom. *Ann Phytopathol Soc Jpn*, **33**:259–266.
- 42) Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*, **19**:11-15.

Bibliografia

- 43) Ernst M., Mendgen K.W., Wiersel S.G.R. 2003. Endophytic fungal mutualist: seed-borne *Stagnospora* spp. Enhance reed biomass production in axenic microcosms. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, **16**: 580-587
- 44) Felske A., Rheims H, Wolterink A., Stackebrandt E. and Antoon D. L. Akkermans 1997. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiology* 1997 **143**: 2983-2989
- 45) Fisher, MM, Triplett, EW (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4630–4636
- 46) Ford, V. L., and Kirkpatrick T. L. 1989. Effects of *Acremonium coenophialum* in tall fescue on host disease and insect resistance and allelopathy to *Pinus taeda* seedlings. *Proceedings of the Arkansas Fescue Toxicosis Conference* **140**:29–34.
- 47) Frausin C. 2000. Flavescenza dorata e legno nero della vite in Friuli-Venezia Giulia. *L'Informatore Agrario*, 56:65–72.
- 48) Frisvad J.C, Filtenborg O.,1990. Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In: Samson RA, Pitt JI (eds) *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Plenum, New York, pp 373–384
- 49) Galetto L., Bosco D., Marzachi C. 2005. Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of Flavescence dorée (16SrV), Bois noir (16SrXII) and apple proliferation (16SrX) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. *Annual of Applied Biology*, **147**:191–201.
- 50) Gardes M., Bruns T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, **2**: 113-118.
- 51) Girman D. (1996) The use of PCR-based single-stranded conformation polymorphism analysis (SSCP-PCR) in conservation genetics. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation* (eds Smith TB, Wayne RK), pp. 167–182. Oxford University Press, Oxford.
- 52) Glenn A.E., Hinton D.M., Yates I.E., Bacon C.W. 2001. Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**:2973–2981.

Bibliografia

- 53) González V & Tello M.L., 2010. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity* **47**:29–42
- 54) Gori M., Monnanni R., Buiatti M., Goti E., Carnevale S., Da Prato L., Bertaccini A., Biricolti S. 2007. Establishing a real-time PCR detection procedure of “flavescence dorée” and “bois noir” phytoplasmas for mass screening. *Bulletin of Insectology*, **60**:255-256.
- 55) Gwinn K.D., Gavin A.M. 1992. Relationship between endophyte infestation level of tall fescue seed lots and *Rhizoctonia zeae* seedling disease. *Plant Disease*. **76**:911– 914
- 56) Hanlin R.T., 2001. Illustrated Genera of Ascomycetes. Combined Keys, Vol I & II. APS Press
- 57) Hawksworth D, Kirk P, Sutton B, Pegler D. 1995. Ainsworth' s and Bisby' s Dictionary of the Fungi. Wallingford, UK: CAB Int. 8th ed.
- 58) Heuer H, Smalla K., 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoreses (DGGE) and temperature gradient gel electrophoreses (TGGE) for studying soil microbial communities. in: J.D. Van Elsas, E.M.H. Wellington, J.T. Trevors (Eds.), *Modern Soil Microbiol I*. Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 353-373.
- 59) Hren M., Boben J., Rotter A., Kralj P., Gruden K., Ravnikar M. 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology*, **56**:785–796.
- 60) Hren, M., Nikolic, P., Rotter, A., Blejec, A., Terrier, N., Ravnikar, M., Dermastia, M., Gruden, K. 2009. Bois noir phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics* **10**: 460.
- 61) Hren, M., Ravnikar, M., Brzin, J., Ermacora, P., Carraro, L., Bianco, P. A., Casati, P., Borgo, M., Angelini, E., Rotter, A., Gruden, K. 2009. Induced expression of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase I genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. *Plant Pathology* **58**: 170–180
- 62) James T.Y., Letcher P.M., Longcore J.E., Mozley-Strandridge S.E., Porter D., Powell M.J., Griffith G.W., Vilgalys R., 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* **98**:860–871.
- 63) Jumpponen A., Trappe J.M. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root colonizing fungi. *New Phytologist*. **140**: 295–310.

Bibliografia

- 64) Kimmons C. A., Gwinn K. D., and Bernard E. C. 1990. Nematode reproduction on endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. *Plant Disease* **74**:757–761.
- 65) Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglou P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*; **58** 169–188.
- 66) Kohn L.M., 1992. Developing new characters for fungal systematics: an experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia* **84**:139–153
- 67) Kong, P., Rubio, L., Polek, M.L., Falk, B.W., 2000. Population structure and genetic diversity within California citrus tristeza virus (CTV) isolates. *Virus Gene* **21**, 139–145.
- 68) Koroch A., Juliani H., Bischoff J., Lewis E., Bills G., Simon J., White J.F.J. 2004. Examination of plant biotrophy in the scale insect parasitizing fungus *Dussiella tuberiformis*. *Symbiosis* **37**: 267-280.
- 69) Krings M., Taylor T.N., Hass H., Kerp H., Dotzler N., Hermsen E.J. 2007. Fungal endophytes in a 400-million-yr old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist* **174**: 648–657.
- 70) Krogh S.S., Mensz S.J.M., Nielsen S.T., Mortensen A.G., Christophersen C., Fomsgaard V. 2006. Fate of benzoxazinone allelochemicals in soil after incorporation of wheat and rye sprouts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**:1064–1074.
- 71) Kulda G. and Bacon C. 2008. Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control* **46**: 57-71
- 72) Lackner G., Partida-Martinez L. P and C. Hertweck. 2009. Endofungal bacteria as producers of mycotoxins. *Trends in Microbiology* **17**:570–576.
- 73) Lackner G., Partida-Martinez L.P., Hertweck C.. 2009. Endofungal bacteria as producers of mycotoxins. *Trends in Microbiology*, **17**:570–576.
- 74) Landi, L., Romanazzi, G. 2011. Seasonal Variation of Defense-Related Gene Expression in Leaves from Bois noir Affected and Recovered Grapevines. *Journal of Agricultural and food Chemistry* **59**: 6628–6637.
- 75) Langer M., Maixner M. 2004. Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*, **43**(4):191–199.

Bibliografia

- 76) Lawrey J.D. 2000. Chemical interactions between two lichen-degrading fungi. *Journal of Chemical Ecology*, 26:1821–1831.
- 77) Lecellier G., Silar P., 1994. Rapid method for nucleic extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr. Genet.* 25: 122-12
- 78) Lee I.-M, Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., Bottner K. D., Marcone C., Seemüller E. 2004. '*Candidatus* Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:1037—1048.
- 79) Lee I.-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54:221–255.
- 80) Lee I.-M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48:1153–1169.
- 81) Lee I.M., Bottner-Parker K.D., Zhao Y., Villalobos W., Moreira L., 2011. '*Candidatus* Phytoplasma costaricanum' a new phytoplasma associated with a newly emerging disease in soybean in Costa Rica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61:1237-1238.
- 82) Lee I.M., Zhao Y., Davis R.E., 2010. Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. *CAB International. Phytoplasma: Genomes, Plant Hosts and Vectors* 51-63.
- 83) Leuchtman A., Clay K., 1993. Nonreciprocal compatibility interactions between *Epichloë typhina* and four host grasses. *Mycologia* 85:157-163.
- 84) Maixner M. 1994. Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (*Auchenorrhyncha: Cixiidae*). *Vitis*, 33:103—104.
- 85) Maixner M., Ahrens U., Seemüller E. 1995. Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology*, 101:241—250.
- 86) Margaria, P., Palmano, S. 2011. Response of the *Vitis vinifera* L. cv. 'Nebbiolo' proteome to Flavescence dorée phytoplasma infection. *Proteomics* 11: 212–224.
- 87) Martin K.J., Rygiewicz P.T, 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5:28.

Bibliografia

- 88) Martini M., Murari E., Mori N., Bertaccini A. 1999. Identification and epidemic distribution of two flavescence dorée-related phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Disease*, 83:925–930.
- 89) Martini M., Musetti R., Grisan S., Polizzotto R., Borselli S., Pavan F., and Osler R., 2009. DNA-Dependent Detection of the Grapevine Fungal Endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Dis.* 93:993-998.
- 90) Mills D.K., Entry J.A., Gillevet P.M., Mathee K., 2007. Assessing Microbial Community Diversity Using Amplicon Length Heterogeneity Polymerase. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71:572-578
- 91) Minerdi D., Moretti M., Gilardi G., Barberio C., Gullino M.L., Garibaldi A. 2008. Bacterial ectosymbionts and virulence silencing in a *Fusarium oxysporum* strain. *Environmental Microbiology*, 10:1725–1741.
- 92) Moricca S., Borja I., Vendramin G.G., Raddi P., 2000. Differentiation of *Seiridium* species associated with virulent cankers on cypress in the Mediterranean region by PCR-SSCP. *Plant Pathol.* 49: 774–781.
- 93) Mostert L., Crous P.W., Petrini O. 2000. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia*, 52:46–58.
- 94) Mostert L., Crous P.W., Petrini O. 2000. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific references to *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 52:46–58.
- 95) Musetti R., Grisan S., Polizzotto R., Martini M., Paduano C., Osler R. 2011. Interactions between 'Candidatus *Phytoplasma mali*' and the apple endophyte *Epicoccum nigrum* in *Catharanthus roseus* plants. *Journal of Applied Microbiology*, 110(3): 746–756.
- 96) Musetti R., Paolacci A.R., Ciaffi M., Tanzarella O.A., Polizzotto R., Tubaro F., Mizzau M., Ermacora P., Badiani M., Osler R. 2010. Phloem cytochemical modification and gene expression following the recovery of apple plants from apple proliferation disease. *Phytopathology* 100:390–399.
- 97) Musetti R., Polizzotto R., Grisan S., Martini M., Borselli S., Carraro L., Osler R. 2007. Effects induced by fungal endophytes in *Catharanthus roseus* tissues infected by phytoplasmas. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 293-294

Bibliografia

- 98) Musetti R., Sanità di Toppi L., Ermacora P., Favali M.A. 2004. Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology* 94:203-208.
- 99) Musetti R., Sanità di Toppi L., Martini M., Ferrini F., Loschi A., Favali M.A., Osler R. 2005. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellow. *European Journal Of Plant Pathology*, 112:53-61.
- 100) Musetti R., Vecchione A., Stringher L., Borselli S., Zulini L., Marzani C., D'Ambrosio M., Sanità di Toppi, L., and I. Pertot 2006. Inhibition of Sporulation and Ultrastructural Alterations of Grapevine Downy Mildew by the Endophytic Fungus *Alternaria alternata*. *Phytopatology* 96(7): 689-698
- 101) Musetti, R., Tubaro, F., Polizzotto, R., Ermacora, P., Osler. R. 2008. Il "Recovery" da Apple Proliferation in melo è associato all' aumento della concentrazione dello ione Calcio nel floema. *Petria*, 18(2): 380-383.
- 102) Mutton P., Boccalon W., Bressan S., Coassin C., Colautti M., Del Cont Bernard D., Floreani A., Zucchiatti D., Pavan F., Mucignat D., Frausin C., Antoniazzi P., Stefanelli G., Villani A. 2002. Legno nero della vite in vigneti di Chardonnay del Friuli-Venezia Giulia. *Informatore Fitopatologico*, 52 (1):52—59.
- 103) Muyzer, G., 1999. DGGE TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion Microbiology*. 2: 317–322.
- 104) Muyzer, G., Waal, E.C.D., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695 – 700.
- 105) Myers, R. M., Lumelsky, N., Lerman, L. S., and Maniatis, T. (1985b). Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature* 313: 495–498.
- 106) Myers, R. M., Maniatis, T., and Lerman, L. S. (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 155: 501–527.
- 107) Nagpal, ML, Fox, KF, Fox, A (1998) Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms? *J Microbiol Meth* 33: 211–219

Bibliografia

- 108) Niemeyer H.M., Perez F.J. 1995. Potential of hydroxamic acids in the control of cereal pests, diseases, and weeds. In Inderjit, K.M.M. Daksini, and F.A. Einhellig, eds. Allelopathy: Organisms, Processes and Applications, pp. 260–270. ACS Symposium Series 582, American Chemical Society, Washington DC, USA.
- 109) Nikoh N. and Fukatsu T., 2000. Interkingdom Host Jumping Underground: Phylogenetic Analysis of Entomoparasitic Fungi of the Genus *Cordyceps*. *Molecular Biology And Evolution*. **17(4)** :629–638.
- 110) O'Dell T.E., Massicotte H.B., Trappe J.M. 1993. Root colonization of *Lupinus latifolius* Agardh. and *Pinus contorta* Dougl. by *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox. *New Phytologist*, 124: 93–100.
- 111) Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T., 1989a. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2766–2770.
- 112) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K., 1989b. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**: 874–879.
- 113) Ortí G., Hare M.P., Avise J.C (1997a) Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Molecular Ecology*, **6**: 575–580.
- 114) Osler R., Carraro L., Ermacora P., Ferrini F., Loi N., Loschi A., Martini M., Mutton P.B., Refatti R. 2003. Roguing: a controversial practice to eradicate grape yellows caused by phytoplasmas. In 'Proceedings of the 14th International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine Meeting'. (Ed. Consiglio Nazionale delle Ricerche – Istituto di Virologia Vegetale – Bari) p. 68. (Locorotondo (Bari), Italy).
- 115) Osler R., Loi N., Carraro L., Ermacora P., Refatti E. 1999. Recovery in plants affected by phytoplasmas. *Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology*: 589-592.
- 116) Osler, R., Carraro, L., Loi, N., Pavan, F., Firrao, G., Musetti, R., Ermacora, P., Loschi, A., Pertot, I. and Refatti, E., 1996. Le più importanti malattie da fitoplasmi nel Friuli-Venezia Giulia. *Atlante* 9-15.
- 117) Osler R. 2011. Considerazioni sul "recovery" e sue implicazioni pratiche. *Convegno Udine Recovery*, 1-2 Settembre 2011.

Bibliografia

- 118) Pan J.J., May G. 2009. Fungal-fungal associations affect the assembly of endophyte communities in maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology*, 58:668–678.
- 119) Partida-Martinez L.P & Hertweck C., 2005. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature* **437**, 884-888.
- 120) Partida-Martinez L.P & Hertweck C., 2007. A Gene Cluster Encoding Rhizoxin Biosynthesis in “*Burkholderia rhizoxina*”, the Bacterial Endosymbiont of the Fungus *Rhizopus microsporus*. *ChemBioChem* **8**: 41–45.
- 121) Partida-Martinez L.P., Groth I., Schmitt I., Richter W., Roth M., Hertweck C. 2007. *Burkholderia rhizoxinica* sp. nov. and *Burkholderia endofungorum* sp. nov., bacterial endosymbionts of the plant pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57:2583–2590.
- 122) Partida-Martinez L.P., Hertweck C.. 2005. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature*, 437:884–888.
- 123) Paterson R.R.M., Bridge P.D 1994. *Biochemical techniques for filamentous fungi*. CAB International, Wallingford
- 124) Pavan F., Stefanelli G. 2000. Strategie di lotta contro *Scaphoideus titanus* e *Hyalesthes obsoletus* vettori di fitoplasmi associati a giallumi della vite, 71-77. In: Atti Convegno “Flavescenza dorata e Legno nero della vite in Friuli-Venezia Giulia”, Gorizia, 5 novembre 1999.
- 125) Petrini O., 1991.- Fungal endophytes of tree leaves, pp. 185-187. In: *Microbial ecology of the leaves* (Fokkema N., van den Heuvel J., Eds.).- Cambridge University Press., Cambridge, UK.
- 126) Pignatti S., 1982. *Flora d’Italia*. Edagricole, Bologna.
- 127) Pilcher C.D., Rice M.E., Obrycki J.J., Lewis L.C. 1997. Field and laboratory evaluations of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn on secondary Lepidopteran pests (*Lepidoptera: Noctuidae*). *Journal of Economic Entomology*, 90:669–678.
- 128) Polizzotto R., Andersen B., Martini M., Grisan S., Gemma Assante., Musetti R., 2011. A polyphasic approach for the characterization of endophytic *Alternaria* strains isolated from grapevines. (doi:10.1016/j.mimet.2011.11.009)

Bibliografia

- 129) Punelli, F., Uva, P., Ferrarini, A., Faggioli, F., Barba, M., Pasquini, G. 2010. Classi di *Gene Ontology* differenzialmente espresse in viti infette dal fitoplasma stolbur. *Petria*, 20 (3): 762-764.
- 130) R. Musetti, R. Polizzotto, A. Vecchione, S. Borselli, L. Zulini, M. D'Ambrosio, L. Sanità di Toppi, I. Pertot 2007. Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternata* against *Plasmopara viticola*: An ultrastructural study. *Micron* 38(6): 643-650
- 131) Ranjard L., Poly F., Lata J.-C., Mougél C., Thioulouse J. and Nazaret S. 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: Biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4479-4487.
- 132) Razin, S., Yogev, D. and Naot, Y., 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (4): 1094-1156.
- 133) Refatti E., Carraro L., Osler R., Loi N., Pavan F. 1998. Presenza di differenti tipi di giallumi della vite nell'Italia nordorientale. *Petria*, 8:85-98.
- 134) Richard G.-F., Kerrest A., Dujon B. 2008. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4):686-727.
- 135) Rodolfi M., Legler S.E., Picco A.M. 2006. Endofiti fungini in *Vitis vinifera* in Oltrepò Pavese. *Micologia Italiana*, 35:25-31.
- 136) Rodriguez R.J., Henson J., Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim Y and Regina S Redman R.S 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME Journal* 2: 404-416
- 137) Rodriguez R.J., Wite Jr J.F., Arnold A.E., Redman R.S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182:314-330.
- 138) Romanazzi G., Murolo S. 2008. Partial uprooting and pulling to induce recovery in bois noir-infected grapevines. *Journal of Phytopathology*, 156:747-750.
- 139) Rouhier N., Jacquot J.P. 2008. Getting sick may help plants overcome abiotic stress. *New Phytologist*, 180: 738-741.

Bibliografia

- 140) Saunders M., Glenn A.E and Kohn M. 2010. Exploring the evolutionary ecology of fungal endophytes in agricultural system: using functional traits to reveal mechanism in community processes. *Evolutionary Applications*, **3**: 525-537.
- 141) Saunders M., Kohn L. M. 2009. Evidence for alteration of fungal endophyte community assembly by host defense compounds. *New Phytologist*, **182**:229–238.
- 142) Saunders M., Kohn L.M. 2008. Host-synthesized secondary compounds influence the in vitro interactions between fungal endophytes of maize. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**:136–142.
- 143) Schardl C.L and Craven K.D 2003. Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology* **12**: 2861-2873
- 144) Schardl C.L., Leuchtman A., Chung K.R., Penny D., Siegel M.R.,1997. Coevolution by common descent of fungal symbionts (*Epichloë*) and grass host. *Molecular Biology and Evolution* **14**: 133-143.
- 145) Schulz B., Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*, **109**(6):661–686.
- 146) Schwieger F. and Tebbe C. C. 1998. A new approach to utilize PCR single-strand-conformation polymorphism for 16s rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 4870-4 876.
- 147) Scott D.L., Clark C.W., Fyffe A.E., Walker M.D., Deahl K.L., 1998. The differentiation of *Phytophthora* species that are patho-genic on potatoes by an asymmetric PCR combined with single- strand conformation polymorphism analysis. *Lett. Appl. Micro- biol.* **27**: 39–44.
- 148) Seddas A., Meignoz R., Daire X., Boudon-Padieu E. 1996. Generation and characterization of monoclonal antibodies to Flavescence dorée phytoplasma: Serological relationships and differences in electroblot immunoassay profiles of Flavescence dorée and elm yellows phytoplasma. *European Journal of Plant Pathology*, **102**(8):757—764.
- 149) Seddas A., Meignoz R., Daire X., Boudon-Padieu E. 1996. Generation and characterization of monoclonal antibodies to Flavescence dorée phytoplasma: serological relationships and differences in electroblot immunoassay profiles of Flavescence dorée and Elm yellows phytoplasmas. *European Journal of Plant Pathology*, **102**:757—764.

Bibliografia

- 150) Seemüller E., Schneider B., Mäurer R., Ahrens B., Daire X., Kison H., Lorenz K.-H., Firrao G., Avinent L., Sears B.B., Stackebrandt E. 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 18S ribosomal DNA. *International Journal of System Bacteriology*, 44:440–446.
- 151) Seifert 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9 (1): 83–89.
- 152) Sforza R., Clair, D., Daire, X., Larrue, J. and Boudon-Padieu, E. 1998. The Role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the Occurrence of Bois noir of Grapevines in France. *Journal of Phytopathology*, 146: 549–556.
- 153) Spatafora J.W., Sung G.H., Sung J.M., Hywel-Jones N.L., White Jr J.F., 2007. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Molecular Ecology* 16: 1701–1711.
- 154) Steinebrunner F., Schiestl F.P., Leuchtman A. 2008. Ecological role of volatiles produced by *Epichloe*: differences in antifungal toxicity. *FEMS Microbiology and Ecology*, 64:307–316.
- 155) Stinson A.M., Zidack N.K., Strobel G.A., Jacobsen B.J. 2003. Mycofumigation with *Muscodor albus* and *Muscodor roseus* for control of seedling diseases of sugar beet and *Verticillium* wilt of eggplant. *Plant Disease*, 87:1349–1354.
- 156) Stone J.K., Bacon C.W. and White J.F. 2000. An overview of endophytic microbes : endophytism defined. In C.W Bacon and J.F. White eds. *Microbial endophytes*, pp 3-30. Marcel Dekker, New York.
- 157) Sunnucks P., Wilson A.C.C., Beheregaray L.B., Zenger K., French J. and Taylor A. C. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* 9: 1699–1710.
- 158) Suzuki, M.T., and Giovannoni, S.J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 62: 625-630.
- 159) Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. [Molecular Biology and Evolution](#) 28: 2731-2739.

Bibliografia

- 160) Tanaka A., Christensen M.J., Takemoto D., Park P., Scott B. 2006. Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus—perennial ryegrass mutualistic interaction. *Plant Cell*, 18: 1052–1066.
- 161) Tiunov A.V., Scheu S. 2005. Facilitative interactions rather than resource partitioning drive diversity-functioning relationships in laboratory fungal communities. *Ecology Letters*, 8:618–625.
- 162) Torres M.S., White J.F.J., Bischoff J.F. 2007. *Hypocrella panamensis* sp. Nov (Clavicipitaceae Hypocreales): a new species infecting scale insects on *Piper carrilloanum* in Panama. *Mycological Research*, 111(3) 317-323.
- 163) Trillas M. I. and G. Segarra 2009. Interactions between nonpathogenic fungi and plants. In L. C. van Loon, ed. *Plant Innate Immunity*, pp. 321–359. Academic Press Ltd., Elsevier Science Ltd., London.
- 164) Vainio E.J * and Hantula J. 1999. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research* 104 (8): 927–936
- 165) Valášková V., Baldrian P., 2009. Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. *PLANT SOIL ENVIRON*, 55 (10): 413–423
- 166) van Elsas J.D., Boersma F.G.H., 2011. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology* 47: 77-87.
- 167) VanEtten H., Temporini E., Wasmann C. 2001. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 59:83–93.
- 168) Walters D.R. 2009. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control.
- 169) Wang C.J.K., Wilcox H.E. 1985. New species of ectendomycorrhizal and psuedomycorrhizal fungi: *Phialophora findlandia*, *Chloridium paucisporum* and *Phialocephala fortinii*. *Mycologia*, 77: 951–958.
- 170) Watanabe T. 2002 Pictorial atlas of soil and seed fungi : morphologies of cultured fungi and key to species. *Crop Protection* 28: 459–465

Bibliografia

- 171) Webber J. 1981. A natural biological control of Dutch elm disease. *Nature*, 292:449—451.
- 172) West C. P., Izekor E., Oosterhuis D. M., and Robbins R. T., 1988. The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant and Soil* 112:3–6.
- 173) White J.F.J Sullivan R., Balady G., Gianfagna T., Yue Q., Meyer W., Cabral D. 2001. A fungal endosymbiont of the grass *Bromus setifolius*: distribution in some Andean populations, identification, and examination of beneficial properties. *Symbiosis* 31: 241–257.
- 174) White T.J., 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, edito da Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., Academic Press, New York: 315-322.
- 175) White, J. F., Jr., A. C. Morrow, G. Morgan-Jones, and D.A. Chambless. 1991a. Endophyte-host associations in forage grasses. XIV. Primary stromata formation and seed transmission in *Epichloe typhina*: developmental and regulatory aspects. *Mycologia* 83:72–81.
- 176) White, J.F. Jr, Morgan-Jones, G. and Morrow, A.C., 1993. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agric. Ecosyst. Environ.* 44:13–37.
- 177) Wilson D. 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73: 274–276
- 178) Zhao, Y., Sun, Q., Wei, W., Davis, R.E., Wu, W. and Liu, Q. (2009) '*Candidatus* Phytoplasma tamaricis', a novel taxon discovered in witches'-broom diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2496-2504.