

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA / LAUREA TRIENNALE IN

VITICOLTURA ED ENOLOGIA

TITOLO DELLA TESI

“La Vite del Fantini: analisi fitopatologica ed interventi per la tutela di una vite ultracentenaria”

Tesi in

PATOLOGIA VITICOLA

Relatore:

Prof. Claudio Ratti

Correlatore:

Prof. Antonio Prodi

Dott.ssa Eleonora Cappelletti

Candidato: Martina Cempini

Matricola N° 825037

Anno Accademico 2019-2020

4. Sommario

Sommario	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUZIONE.....	5
1.2 Vite ultracentenaria del Fantini	5
1.2.1. Descrizione morfologica	7
1.2.2 Osservazioni fenologiche	7
1.2.3. Analisi biochimiche e molecolari	7
1.2.4 Osservazioni enologiche	8
1.3 Malattie del legno.....	9
1.3.1. BOTRYOSPHERIA DIEBACK	11
1.3.2. MAL DELL'ESCA	11
1.5 Trattamento in endoterapia	12
2. SCOPO DELLA TESI	15
3. MATERIALI E METODI	17
3.1 Campioni analizzati	17
3.2 Analisi micologica	19
3.2.1 Isolamento delle specie fungine presenti nella Vite ultracentenaria del Fantini	19
3.2.2 Osservazioni visive e determinazione della comunità fungina	20
3.3 Ottenimento delle colture monoconidiche	22
3.4 Analisi molecolari.....	23
3.3.1 Estrazione del DNA genomico	23
3.3.2 Quantificazione del DNA con NanoDrop	24
3.3.3 Reazione a catena della polimerasi (PCR)	25
3.3.4 Analisi elettroforetica del DNA amplificato	27
3.3.5 Purificazione del DNA	28
3.3.6 Sequenziamento ed analisi delle sequenze	28
3.5 Valutazione dell'efficacia dei prodotti <i>in vitro</i> contro <i>Diplodia mutila</i>	29
3.5.1 Prodotti RESOLV 5 e FI PLUS	29
3.5.2 Prodotto ES PLUS	30
3.6 Prove di crescita <i>in vitro</i> del patogeno <i>Diplodia seriata</i>	31
3.7 Analisi statistica delle prove <i>in vitro</i>	31
3.8 Identificazione malattie virali nella Vite del Fantini	32
3.8.1 Estrazione acidi nucleici dai tessuti vegetali	33
3.8.2 Reazione di trascrizione inversa (RT) abbinata alla reazione a catena della polimerasi (PCR)	34

3.9	Trattamento in endoterapia	36
4.	RISULTATI.....	37
4.1	Identificazione delle specie isolate tramite analisi molecolare	37
4.2	Incidenza dei generi fungini sui diversi campioni	38
4.3	Valutazione efficacia <i>in vitro</i> di prodotti contro il patogeno <i>Diplodia mutila</i>	41
4.3.1	Prodotti RESOLV 5 e FI PLUS	41
4.3.2	Prodotto ES PLUS	44
4.4	Prove di crescita <i>in vitro</i> del patogeno <i>Diplodia mutila</i>	46
4.4	Analisi malattie virali	48
4.5	Trattamento in endoterapia	48
5.	DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....	52
6.	BIBLIOGRAFIA	55
7.	SITOGRAFIA	56

ABSTRACT

La Vite ultracentenaria del Fantini, situata ai piedi della collina del podere Terzanello di Sotto a Pianoro, è una delle viti più vecchie dell'Appennino Tosco-Emiliano, scampata dall'epidemia di fillossera dell'800. La Vite, fotografata per la prima volta nel 1956 da Luigi Fantini, fu ritrovata nel 1990 da Stefano Galli, ma in condizioni decisamente diverse rispetto a quelle di quarant'anni prima. La Vite mostrava una forte perdita di vigoria, con il tronco in buona parte marcito e disseccamenti fogliari e dei tralci. Galli cercò negli anni di smuovere interesse nei confronti della vite su vari fronti e nel 2019 decise di contattare i laboratori di Patologia vegetale dell'Università di Bologna per un'analisi più approfondita sulle possibili patologie presenti sulla Vite. A tale scopo, il seguente progetto di tesi si è incentrato sull'analisi morfologica e molecolare dei diversi patogeni isolati dal materiale prelevato dalla Vite in seguito a diversi isolamenti effettuati nel 2019/2020 per comprendere l'eziologia delle diverse malattie presenti e trovare possibili soluzioni per il miglioramento della salute della stessa. Si è proceduto all'identificazione morfologica e molecolare delle colonie fungine e dei virus presenti nei tessuti vegetali analizzati; si è valutata l'efficacia di diversi prodotti a basso contenuto cuprico e con estratti vegetali *in vitro* al fine di poter scegliere il prodotto da utilizzare per il successivo trattamento in endoterapia. I funghi d'interesse, isolati su PDA e sequenziati (gene *ITS*), sono risultati essere *Diplodia mutila*, *Diplodia seriata*, *Fomitiporia mediterranea* e *Kalmusia variispora*, tutte specie responsabili delle malattie del legno e del Mal dell'esca della vite, mentre non si è riscontrata la presenza di alcun virus. Durante la ripresa vegetativa della Vite, in seguito del trattamento in endoterapia effettuato con due diversi prodotti (RESOLV 5 e ES PLUS), sarà possibile comprendere meglio il decorso della patologia.

1. INTRODUZIONE

1.2 Vite ultracentenaria del Fantini

La vite ultracentenaria del Fantini è situata ai piedi della collina del podere Terzanello di Sotto sulla via degli Dei, a pochi passi da Badolo in territorio di Pianoro.

Il primo a scoprire la vite immersa tra le colline e i boschi fu Luigi Fantini, archivista del comune di Bologna, geologo, speleologo, fotografo ed esploratore dell'Appennino bolognese. La sua passione per la fotografia lo portò nel 1965 a fotografare la pianta (Figura 1). Fantini la definì una delle viti più vecchie dell'Appennino Tosco-Emiliano, sorretta da un olmo anch'esso centenario, scampata dall'epidemia di fillossera che alla fine dell'800 fece scomparire buona parte dei vigneti europei.

La foto, custodita nei volumi sugli antichi edifici della montagna bolognese, era accompagnata da una breve descrizione: “dal grosso tronco (cm 120 di circonferenza) si espandono in direzione nord e sud, rigogliosissimi tralci per una lunghezza complessiva d'una trentina di metri. Produce annualmente dai 5 ai 6 quintali di ottima uva nera” (comunicazione personale).



Figura 1: Vite del Fantini 1965

La pianta venne ritrovata nel 1990 da Stefano Galli, volontario della Lipu, ma non nelle stesse condizioni di quarant'anni prima. La vite dopo la scoperta di Fantini venne abbandonata, sommersa

dai rovi, senza più l'olmo che la sosteneva e parzialmente ricoperta da una collinetta di terra di riporto (Figura 2). Il tronco ergeva dalla collinetta per circa 65 centimetri per poi ripiegarsi su sé stesso e proseguire orizzontalmente per un metro e mezzo, e trovando infine (alla fine) tralci che si sviluppano, in certi punti, fino a dieci metri di lunghezza. Nel tratto orizzontale la pianta era appoggiata al terreno e la circonferenza era di 72 centimetri, 55 nel tratto orizzontale e 41 nel tratto che riparte dal suolo. Il tronco era in buona parte marcio, secco o addirittura in certi punti vuoto (Galli, comunicazione personale).

Questi dati mettono in risalto le condizioni di salute della pianta, cambiate dal primo ritrovamento.



Figura 2: Vite del Fantini nel 1995

Galli contattò produttori di vino, enti pubblici e redattori di riviste per riuscire a smuovere interesse nei confronti della vite ultracentenaria per migliorare le sue condizioni, non riuscendo però nel suo intento decise di intervenire in prima persona.

Aiutato da un botanico e dal Servizio Fitosanitario dell'Assessorato Agricoltura e Ambiente Regionale, iniziò a pulirla da tutti i rovi, fece la prima potatura e la ripulì da tutte le formiche che si erano ormai prese possesso del tronco. La pianta riuscì in questo modo a reagire molto bene e dall'anno successivo sviluppò tralci di grosso vigore.

Alcuni anni dopo, tramite la Comunità Montana, portò la storia della vite all'attenzione del Podere Riosto. L'agronomo del Podere Federico Curtaz la curò, fece predisporre un filare di pali su cui sviluppare i tralci ed in collaborazione con la dott.ssa Fontana e la dott.ssa Filippetti dell'Università di Bologna avviarono gli studi sulle caratteristiche morfologiche e genetiche della pianta e dell'uva. Per non perdere l'importante risorsa genetica, alcune gemme derivate dalle prime potature furono sovra-innestate su viti delle vigne del Podere Riosto (Galli, comunicazione personale).

1.2.1. Descrizione morfologica

La vite presenta foglie di media dimensioni, pentagonale, pentalobata, ma con seni inferiori poco profondi e talora appena accennati. Il seno peziolare è a V, aperto e solo raramente presenta un dente. I seni laterali superiori sono a V (talora uno a V ed uno ad U), con lobi leggermente sovrapposti (talora anche aperti). La pagina superiore è di colore verde da medio a scuro, con bollosità da leggera a media. Sulla pagina inferiore, tra le nervature, sono presenti peli coricati e dritti con densità media. Le nervature presentano solo rarissimi peli coricati, mentre quelli dritti sono mediamente densi. I denti sono a lati convessi e a base larga. Il picciolo è corto. Il grappolo è medio o medio-grosso, piramidale, spesso alato, da medio a compatto, con un peso medio-basso (300-500g). L'acino è grosso, arrotondato, con buccia di colore rosso-nero, molto pruinosa, spessa. La polpa non è colorata, è deliquescente e a sapore neutro. La separazione del pedicello non è facile. Per quanto riguarda il vino probabilmente, per le sue caratteristiche, si può pensare che l'uva in passato fosse utilizzata a duplice attitudine (Galli, comunicazione personale).

1.2.2 Osservazioni fenologiche

L'epoca del germogliamento è media (contemporanea a Barbera) e anche quella della fioritura, mentre l'invasatura è medio-tardiva e la raccolta tardiva. La fertilità del vitigno è risultata media, pari a circa 1,5 grappoli per germoglio quando potato a tralcio lungo. Ha una vigoria medio-elevata e raggiunge livelli produttivi piuttosto buoni (comunicazione personale).

1.2.3. Analisi biochimiche e molecolari

Le analisi isoenzimatiche effettuate sulla Vite ultracentenaria del Fantini hanno messo in luce un pattern GPI PGM comune ad altri vitigni iscritti al Registro Nazionale delle Varietà di Vite: Aleatico, Bellone, Bonamico, Francavidda, Negretto, Nerello cappuccio, Perricone, Uva di Troia.

Sulla base delle analisi morfologiche si è escluso l'identità con le varietà a bacca bianca e tra quelle a bacca nera Perricone, Nerello cappuccio e Uva di Tria, lasciando aperto il confronto con Negretto, Bonamico ed Aleatico.

Il Negretto, infatti, è storicamente coltivato sul territorio bolognese e gli altri due vitigni rappresentano varietà antiche toscane potenzialmente giunte a Pianoto attraverso la via che collega Bologna a Pistoia. Le analisi molecolari però hanno permesso di escludere l'identità con questi tre vitigni e senza individuare alcun rapporto di parentela (comunicazione personale).

Tutto questo ha portato ad ottenere la registrazione presso il Registro Italiano Vigneti nel 2009 con il nome "Vite del Fantini".

1.2.4 Osservazioni enologiche

Il Podere Riosto ad oggi possiede un ettaro di uve del Fantini dal quale produce due tipologie di vino: Vecchio Riosto e Spumante Rosè.

Il primo è di colore rosso-rubino non particolarmente intenso ma vivace e brillante, con riflessi violetti. Il profilo aromatico è caratterizzato da note floreali e spicca un fruttato ricco di frutti rossi e in particolare amarene.

Il vino al gusto risulta piacevole, poco astringente, sapido anche se leggermente carente nella struttura, il contenuto polifenolico e l'estratto secco non particolarmente elevati non consentono di ottenere vini longevi e strutturati. Lo Spumante Rosè tramite la vinificazione in bianco e successiva spumantizzazione riesce ad esaltare di più il fruttato.

Tutte e due le tipologie di vino sono tagliate con piccole percentuali di vini più strutturati per avere un incremento un incremento del contenuto zuccherino e fenolico (comunicazione personale).

Stefano Galli insieme a Tommaso Santi, vicino di casa della Vite del Fantini, hanno curato la vite per tutti questi anni, intervenendo con potatura o interventi in verde quando in base alle loro esperienze la pianta ne necessitava.

Nel 2017 si sono accorti che qualcosa nella vite stava cambiando: la vigoria della pianta era diminuita, le foglie apparivano di colorazione rossa e i tralci esili.

A posteriori si sono resi conto che questi sintomi erano già presenti da due anni poiché nel 2015 avevano compiuto il taglio di un cordone che aveva perso di vigoria.

La pianta negli anni a venire presentava sempre più avvisaglie: nel 2017 è stato compiuto il taglio dell'altro cordone e i sintomi erano sempre più accentuati.

Nel 2019 Galli contattò la sezione di Patologie vegetali dell'Università di Bologna per compiere analisi e capire cosa stesse succedendo alla Vite ultracentenaria (comunicazione personale).

1.3 Malattie del legno

(GTDs-Grape Trunk Diseases; MDB- Maladies du bois)

Le malattie del legno si inseriscono nella sindrome del deperimento. Per deperimento si intende “la perdita di vigore della pianta, più o meno rapida, che può essere determinata da molteplici fattori di natura biotica, come infezioni parassitarie o virali, infestazioni di artropodi, ed abiotica, ovvero stress idrici, nutrizionali, gelata, etc”. (Serra e Peretto, 2015).

Le malattie del legno sono diventate un problema vero e proprio poiché hanno causato un aumento della mortalità delle viti con un'incidenza economica significativa sul settore. Il panorama delle malattie del legno di origine fungina della vite è molto ampio. Sono state incluse ben 17 malattie, alcune segnalate sporadicamente, mentre altre limitate a zone geografiche extraeuropee.

Le malattie della vite più diffuse sono il Mal dell'esca ed il Black Dead Arm. Una lista dei principali patogeni responsabili delle malattie più diffuse sulla vite è riportata nella Tabella 1.

Vengono considerate malattie complesse in cui una o più comuni combinazioni di gruppi fungini o l'azione concomitante di più fattori sono coinvolte nella loro insorgenza (Mostert *et al.*, 2006).

<i>Patogeno</i>	<i>Malattia</i>
<i>Cylindrocarpon spp.</i>	Black foot disease
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Cancro su ampia varietà di specie
<i>Diplodia seriata</i>	Bot canker
<i>Diplodia mutila</i>	Botryosphaeria dieback
<i>Dothiorella viticola</i>	Cancro su vite

<i>Eutypa lata</i>	Eutypa dieback
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	Mal dell'esca
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Botryosphaeria dieback
<i>Phaeoacremonium specie</i>	Mal dell'esca e malattia di Petri

Tabella 1: Patogeni del Grapevine Trunk Disease

Per molti anni le manifestazioni di deperimento attribuibili a patogeni fungini sono state imputate esclusivamente alla sindrome del Mal dell'esca, nonostante la presenza contemporanea di funghi della famiglia delle *Botryosphaeriaceae* sulle stesse viti. Le specie di questa famiglia sono note come agenti di cancri e deperimenti in diversi ospiti legnosi (mandorlo, olivo, pesco, pistacchio, leccio, sughera, ecc.), ma la loro importanza come agenti di malattie nella vite è stata a lungo sottovalutata o addirittura ignorata. Solo negli ultimi dieci anni sono stati riconosciuti come i patogeni più importanti per la vite in tutto il mondo, in virtù della loro aggressività e dell'ampia distribuzione geografica.

Un motivo per il quale i funghi della famiglia delle *Botryosphaeriaceae* sono stati poco considerati nella sindrome del deperimento, risiede nel fatto che le manifestazioni sintomatiche del mal dell'esca e del deperimento da *Botryosphaeria* sono molto simili, soprattutto sulla chioma. In più, molte volte i funghi agenti delle due malattie possono essere presenti contemporaneamente sulla stessa pianta, rendendo difficile la distinzione e l'attribuzione di un determinato sintomo dell'una o dell'altra malattia.

Le spore fungine causano una necrosi settoriale o centrale unita alla decolorazione vascolare a livello di legno che provoca uno stato depressivo alle piante caratterizzato da un indebolito sviluppo vegetativo o di defogliazione, con decolorazione delle foglie.

In generale, questo tipo di malattia interessa piante adulte ma di recente è stato notato il loro insediamento anche su vigneti giovani, cominciando a infettare anche vigneti di 2-3 anni di età. La diffusione è legata a molteplici fattori, sia biotici che abiotici.

L'Organizzazione mondiale della vite e del vino stima che il 20% dei vigneti nel mondo siano affetti da tale patologia, con costi enormi. Si è notato anche un incremento delle infestazioni in Europa a seguito del divieto di utilizzo dell'arseniato di sodio, utilizzato per contenere il Mal dell'esca. Ciò ha determinato un incremento del tasso di mortalità dello 0,5-1% all'anno negli appezzamenti in cui i viticoltori hanno dovuto cessare i trattamenti con arseniato di sodio (Graziano Alderighi, 2015).

1.3.1. Botryosphaeria dieback

La *Botryosphaeria Dieback* è una malattia del tronco della vite causata da patogeni fungini come la *Diplodia mutila* che crescono principalmente nel legno maturo. Gli agenti patogeni possono infettare il materiale di propagazione, che influisce sulla crescita delle viti di nuovo impianto; o viti stabilizzate, mediante potature od altre ferite.

Le malattie del tronco della vite causano una perdita di produttività quando le viti raggiungono la loro fase di maturità elitaria nel momento di massimo della produzione.

Il deperimento da *Botryosphaeria* è causato da specie di funghi della famiglia delle Botryosphaeriaceae. Questi funghi infettano una vasta gamma di ospiti, tuttavia, sono più comunemente associati a malattie delle piante legnose, come l'acacia e l'eucalipto.

La malattia è caratterizzata da una serie di sintomi che interessano un certo numero di strutture vegetative della vite e si possono riscontrare due forme.

La forma lenta porta ad un ritardo del germogliamento, gemme morte, ritardo sviluppo gemme e germogli, clorosi fogliare, necrosi marginali alle foglie, disseccamento grappoli e consecutiva morte della pianta.

La forma più aggressiva causa il disseccamento dei tralci a partire dall'apice, una riduzione dello sviluppo e successiva morte della pianta (Sitografia 1)

1.3.2. Mal dell'esca

L'esca è una sindrome più o meno complessa che può manifestarsi a partire dal vivaio sino alla senescenza dell'impianto.

Viene suddivisa in:

- Venature o striature brune (in vivaio);
- Malattia di Petri (in vigneto su piante di non oltre 7 anni di età);
- Esca giovane (con carie assente o circoscritta);

- Esca propria (piante mature con tessuto necrotico e cariato).

La sindrome può essere evolutiva, oppure presentare uno o alcuni dei sintomi caratteristici.

Solo la minoranza delle piante infette muore, mentre nella maggior parte dei casi le viti gestite adeguatamente da un punto di vista colturale, possono presentare sintomi in maniera non costante provocando un mascheramento. Le venature brune sono tipiche della fase vivaistica e si evidenziano nel corso della stessa preparazione del materiale di propagazione.

Nei primi anni di vita dell'impianto, barbatelle affette da venature brune, ma anche sane, possono dare origine alla Malattia di Petri causata dai funghi tracheomicotici *Phaeomoniella chlamydospora* (PAL) e *Phaeoacremonium* spp. (PCH) con avversità nella crescita visibili. Con il passare degli anni la malattia evolve in "esca giovane" e/o "esca propria".

I medesimi funghi, nell'ambito del ciclo colturale della pianta, danno origine all'esca giovane caratterizzata da chiara e tipica sintomatologia fogliare di aspetto tigrato.

L'esca propria, invece, si può riscontrare nella fase di maturità dell'impianto, dai dodici ai quattordici anni in su. È provocata dalla presenza contemporanea di tre agenti patogeni: *Phaeomoniella chlamydospora* (PAL), *Phaeoacremonium* spp. (PCH) e *Fomitiporia mediterranea* (FOMED).

Tale malattia può avere un decorso acuto o cronico. Il decorso acuto provoca apoplezia in luglio/agosto, dopo piogge abbondanti, causando il disseccamento della pianta. Nel decorso cronico, invece, i sintomi possono non comparire nel corso delle annate.

Il mal dell'esca oggi è considerato un complesso di malattie presenti contemporaneamente sulla pianta, di cui almeno una tracheomicosi ed un marciume.

1.5 Trattamento in endoterapia

L'endoterapia si basa sul principio per cui, introducendo una sostanza caratterizzata da proprietà sistemiche direttamente nel tronco questa, attraverso il sistema vascolare della pianta, si ridistribuisce nella chioma. Questo trattamento consiste nella foratura del tronco degli alberi soggetti a manifestazioni parassitarie formando piccoli fori attraverso i quali si inietta il prodotto.

Il vantaggio principale dell'endoterapia è legato alla tutela dell'ambiente. Non avere dispersione di prodotto permette un minore impatto ambientale e di effettuare trattamenti in prossimità di zone ad alta frequentazione.

Un ulteriore vantaggio risiede nel fatto che si ha una prolungata persistenza d'azione ed in molti casi permette di effettuare i trattamenti ad anni alterni. Si ha anche una riduzione delle dosi di applicazione.

Gli effetti negativi di questa metodologia sono dovuti all'apertura di ferite, che possono favorire l'ingresso di patogeni e ledere le barriere di difesa della pianta.

Si possono avere quattro tecniche di iniezione:

- ad assorbimento naturale
- a pressione
- a micropressione
- Arbosan

Il metodo ad assorbimento naturale sfrutta la normale capacità della pianta. Vengono applicati fori sul tronco in numero diverso a seconda delle caratteristiche morfologiche della pianta con un'inclinazione di 45° dal diametro di 2-4 mm ad una profondità di 3-5 cm.

La capacità di assorbimento del prodotto da parte della pianta e anche la velocità di assorbimento è influenzata da fattori esterni come le condizioni atmosferiche, dalla specie vegetale, dalla fase fenologica e dalle condizioni fitosanitarie della pianta.

La tecnica di iniezione a pressione prevede l'introduzione forzata del prodotto all'interno del tronco. Le apparecchiature che vengono utilizzate sono provviste di una pompa che preleva la soluzione da un serbatoio e fornisce il liquido sotto pressione ad un numero variabile di fori. Anche in questo caso il numero di fori è in funzione al diametro del tronco. Essi hanno un diametro di 4-6 mm e raggiungono una profondità di 5-6 mm.

Questa metodologia di applicazione non è influenzata dalle condizioni ambientali, ma dalle caratteristiche fisiologiche della pianta.

L'applicazione a micropressione consiste nell'introduzione della soluzione posta all'interno di una capsula a cui è applicato un tubetto di alimentazione che viene inserito nel foro.

I fori con diametro di 3-4 mm vengono praticati al colletto della pianta e raggiungono una profondità di 0,7 cm. Il numero di essi varia a seconda della specie, del diametro del tronco e delle caratteristiche morfologiche.

La velocità di assorbimento dipende sia dalle condizioni meteorologiche sia dallo stato vegetativo e sanitario della pianta trattata.

Il metodo Arbosan è un sistema a bassa pressione (1.5-1.8 bar) con il quale la soluzione viene introdotta nel legno tramite aghi di diametro pari a 4 mm.

L'epoca in cui effettuare le iniezioni al tronco dipende dalla specie vegetale da trattare, dall'avversità da combattere, dalle condizioni ambientali e dalla tecnica utilizzata.

Il trattamento endoterapico è sconsigliato quando si verificano condizioni di scarsa luminosità, umidità relativa superiore all'85%, nebbia, assenza di ventilazione e piogge persistenti. (Sitografia 2)

2. SCOPO DELLA TESI

La Vite ultracentenaria del Fantini, situata ai piedi della collina del podere Terzanello di Sotto in territorio di Pianoro, è una delle viti più vecchie dell'Appennino Tosco-Emiliano, scampata dall'epidemia di fillossera che alla fine dell'800 fece scomparire buona parte dei vigneti europei. La Vite fu fotografata per la prima volta nel 1956 da Luigi Fantini e venne poi ritrovata nel 1990 da Stefano Galli, ma in condizioni decisamente diverse rispetto a quelle di quarant'anni prima. Il tronco, infatti, era in buona parte marcio, secco o addirittura in certi punti vuoto.

Dopo numerose analisi della pianta e dell'uva a livello sia morfologico sia genetico, la Vite ha ottenuto la registrazione presso il Registro Italiano Vigneti nel 2009 con il nome "Vite del Fantini". Stefano Galli cercò negli anni di smuovere interesse nei confronti della vite su vari fronti e, dopo averla curata personalmente per diversi anni, decise nel 2019 di contattare i laboratori del DISTAL di Patologia vegetale dell'Università di Bologna per un'analisi più approfondita sulle possibili patologie presenti su questa vite storica.

Nell'anno stesso ed in quello successivo (2020) sono stati effettuati diversi sopralluoghi alla Vite ultracentenaria e numerosi campionamenti volti ad individuare ed identificare i patogeni responsabili del deperimento sempre maggiore della pianta.

Proprio a tale scopo, il seguente progetto di tesi si è incentrato sull'analisi morfologica e molecolare dei diversi patogeni isolati dal materiale prelevato dalla Vite del Fantini, al fine di comprendere l'eziologia delle diverse malattie presenti sulla pianta e trovare possibili soluzioni per il miglioramento della salute della stessa.

Nello specifico, il lavoro sperimentale si è articolato nei seguenti punti:

- analisi della componente fungina presente nella Vite del Fantini negli isolamenti effettuati negli anni 2019 e 2020;
- identificazione morfologica delle colonie fungine presenti nei tessuti vegetali analizzati;
- identificazione molecolare delle specie fungine d'interesse a livello di specie tramite sequenziamento parziale del gene *ITS*;
- valutazione dell'efficacia dei prodotti RESOLV 5, FI PLUS ed ES PLUS *in vitro* contro il patogeno fungino *Diplodia mutila*;
- identificazione della crescita ottimale *in vitro* del patogeno *Diplodia seriata* a diverse temperature;

- identificazione della presenza di malattie virali nella Vite del Fantini;
- trattamento in endoterapia alla Vite ultracentenaria con prodotto a base di estratti vegetali e basso contenuto cuprico.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni analizzati

Nel presente lavoro di tesi sono stati analizzati campioni vegetali provenienti da cinque isolamenti differenti effettuati alla Vite ultracentenaria del Fantini in periodi diversi.

Il primo isolamento è avvenuto nel novembre 2019 dove è stato prelevato materiale dal tronco con presenza di tacche necrotiche, i restanti prelievi si sono invece concentrati tra luglio e agosto dell'anno successivo.

All'inizio di luglio 2020 sono stati prelevati sia i trucioli ottenuti dopo aver inserito nella Vite ultracentenaria le viti necessarie per il successivo trattamento in endoterapia. I trucioli sono stati prelevati da quattro posizioni diversi del tronco, in corrispondenza dell'inserimento delle viti nella pianta (Figura 3). Inoltre, sono stati prelevati e successivamente analizzati anche la prima goccia di essudato e la linfa fuoriuscite dalla vite post trattamento.



Figura 3: Trucioli ottenuti in seguito al trattamento in endoterapia effettuato sulla Vite del Fantini

Successivamente, alla fine del mese di luglio 2020, è stato prelevato un campione dal cordone destro della vite che si presentava secco con imbrunimenti vascolari (Figura 4). Successivamente il cordone è stato asportato e portato in laboratorio per le successive analisi.



Figura 4: tralcio secco con imbrunimenti vascolari

L'ultimo isolamento è stato compiuto nel cordone rimanente di sinistra, che presentava sintomi molto più lievi e non erano evidenti disseccamenti rameali (Figura 5).



Figura 5: tralcio cordone sinistro

3.2 Analisi micologica

3.2.1 Isolamento delle specie fungine presenti nella Vite ultracentenaria del Fantini

Le analisi micologiche sui campioni sono state condotte come indicato da Beccari *et al.* (2018), al fine di poter isolare le specie fungine presenti nella vite e poter determinare la composizione della comunità fungina. I campioni sono stati disinfettati superficialmente con ipoclorito di sodio al 2% per 3 minuti, seguito da un doppio lavaggio da 1 minuto con acqua ultra-pura sterile. Questo passaggio è fondamentale per eliminare eventuali funghi saprofiti e agevolare la crescita dei soli funghi patogeni. Inizialmente, per poter avere un quadro generale della componente fungina presente nei campioni analizzati, sono stati effettuati anche degli isolamenti senza disinfezione con ipoclorito di sodio, ma esclusivamente con lavaggio in acqua sterile. Successivamente i campioni sono stati posti su un substrato di crescita agarizzato PDA in 32 piastre Petri con diametro di 90 mm, contenenti ognuna 7 frammenti di materiale vegetale. Il terreno PDA (Potato Dextrose Agar) utilizzato come substrato nutritivo è stato ottenuto sciogliendo 15,6 g di polvere di PDA commerciale (Difco™) in 400 mL di acqua deionizzata sterile. Questo terreno è stato poi sterilizzato in autoclave per 15 minuti alla temperatura di 120°C e alla pressione di 2 bar. Dopo il passaggio in autoclave, il PDA è stato raffreddato alla temperatura di 50-55°C e sono stati poi addizionati 400µL di solfato di streptomina (200 mg/L) e neomicina (100 mg/L); questi due antibiotici hanno lo scopo di ridurre al minimo la crescita batterica senza influenzare al tempo stesso la crescita fungina. Le piastre sono state successivamente sigillate con parafilm e poste ad incubare alla temperatura di $24 \pm 1^\circ\text{C}$ al buio per 7 giorni (Figura 6).

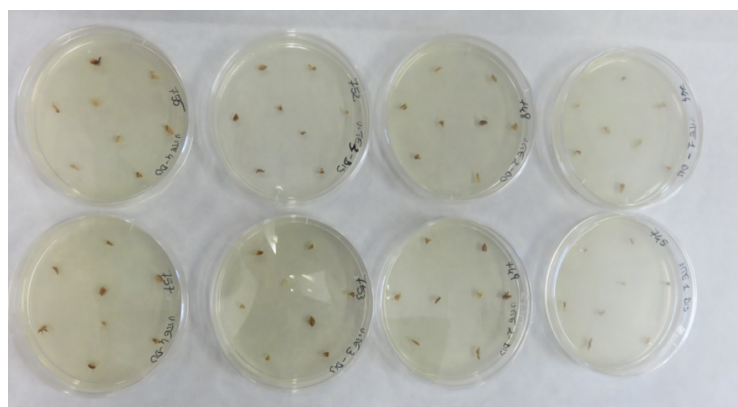


Figura 6: piastre Petri contenenti porzioni vegetali prelevate dalla Vite del Fantini

3.2.2 Osservazioni visive e determinazione della comunità fungina

Trascorso il periodo di incubazione necessario, si è proseguito con un'analisi di tipo macro e microscopica volta all'identificazione dei diversi generi fungini e delle diverse specie sviluppatasi dai diversi campioni. L'identificazione a livello di genere fungino è avvenuta inizialmente sfruttando caratteri morfologici macroscopici come la velocità di crescita, il colore e la morfologia di ogni colonia.

Questa prima analisi, basata su caratteri morfologici tipici di ogni genere fungino, permette di riconoscere i generi fungini più comuni: *Alternaria* spp. (forma una colonia dal colore nero-grigiastro e dai contorni non ben definiti, il micelio può essere rado o più cotonoso), *Epicoccum* spp. (colonia che colora il terreno PDA di un colore giallo-arancio), *Aspergillus* spp. (colonia puntinata di colore verde o nero), *Penicillium* spp. (colonia dal colore verde, crescita circolare, micelio compatto con contorno chiaro), *Cladosporium* spp. (colonia nera rada, sferica e dai contorni netti). Nelle Figure 7 e 8 è possibile osservare lo sviluppo delle diverse colonie fungine su substrato agarizzato PDA sia osservando il micelio da sopra che sul retro.

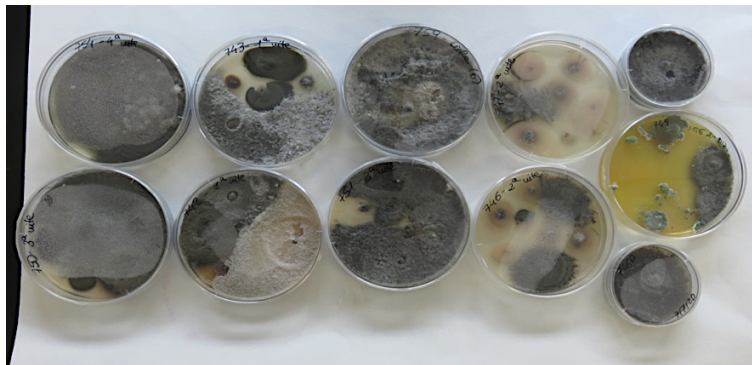


Figura 7: piastre Petri dei campioni analizzati dopo l'incubazione (vista frontale)

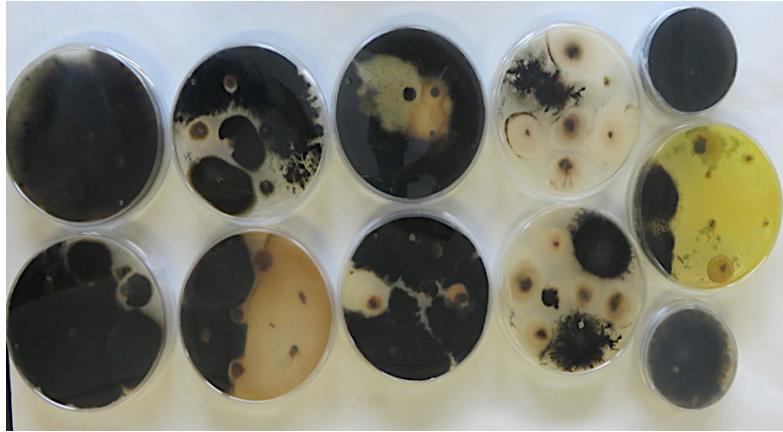


Figura 8: piastre Petri dei campioni analizzati dopo l'incubazione (vista del retro)

L'analisi a livello microscopico, con l'utilizzo di un microscopio ottico è stata effettuata valutando diversi parametri, tra cui:

- morfologia dell'ifa (presenza di setti);
- presenza/assenza di microconidi;
- presenza/assenza di macroconidi;
- presenza e morfologia di strutture tipiche quali clamidospore, fialidi e vescicole.
- Per poter valutare più correttamente la comunità fungina presente nei campioni analizzati, sono state selezionate e ritrasferite su PDA, addizionato di streptomicina e neomicina, cinque colonie isolate molto frequentemente e morfologicamente diverse tra loro, difficili però da identificare basandosi esclusivamente sui caratteri morfologici. Tali colonie sono state indicate con i seguenti codici identificativi:
 - M866 (unica colonia fungina isolata nel 2019);
 - P746a e P751 (isolamento del 3 luglio 2020);
 - P907 (isolamento del 31 luglio 2020);
 - P927 (isolamento del 28 agosto 2020).

Questo passaggio è avvenuto in ambiente totalmente sterile, sotto cappa a flusso laminare, raschiando con ansa sterilizzata, prima con un passaggio in alcool e dopo su fiamma a becco Bunsen, una piccola porzione di micelio della colonia d'interesse. Le nuove piastre sono state poi incubate a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per circa 6 giorni. Una volta trascorso il tempo di incubazione necessario, si è proceduto all'ottenimento di colture monoconidiche.

3.3 Ottenimento delle colture monoconidiche

Spesso l'analisi morfologica di una colonia fungina non è sufficiente per la determinazione del genere e della specie della stessa, per questo motivo si deve procedere con l'analisi molecolare dei ceppi fungini isolate. Prima di effettuare l'estrazione del DNA si procede all'ottenimento di colonie pure, ovvero colonie sviluppatesi partendo da un singolo conidio. Le colture monoconidiche sono state ottenute seguendo un protocollo descritto da Balmas *et al.* (2000) partendo dalle piastre con le singole colonie. Per l'ottenimento di colture monoconidiche sono stati effettuati i passaggi riportati di seguito, in condizione di completa sterilità.

Una porzione di micelio è stata raschiata dalla piastra Petri tramite l'utilizzo di un bisturi sterile. Il micelio è stato poi inserito in una falcon da 15 mL contenente 10 mL di acqua sterile precedentemente autoclavata. La sospensione è stata poi vortexata per una ventina di secondi per favorire la diffusione di conidi. Un mL della stessa è stato prelevato e trasferito in una nuova falcon contenente 9 mL di acqua sterile in maniera tale da diluire 10 volte rispetto alla sospensione di partenza. Le due sospensioni ottenute sono state versate su piastre Petri contenenti il terreno agar semplice (AS) al 2%. Questo terreno è stato ottenuto preparando una sospensione di acqua sterile e substrato liofilizzato Bacteriological agar type A (Biokar diagnostics) in proporzione di 20 g l⁻¹. La miscela ottenuta è stata agitata manualmente in modo da ottenere una distribuzione omogenea dei conidi sul substrato e successivamente sottoposta ad un ciclo in autoclave a temperatura di 120°C in condizioni di 1 atmosfera di pressione per 15 minuti.

Per ogni piastra in cui è stata versata la sospensione acqua-conidi è stato allontanato l'eccesso acquoso. Successivamente le piastre sono state poste, in posizione inclinata, ad una temperatura di circa 25°C ± 1°C per 16-24 ore, in funzione della velocità di germinazione dei conidi. Trascorso il periodo di incubazione è stato possibile osservare controluce la presenza di conidi germinati. Per ogni colonia di partenza sono stati selezionati due conidi germinati, questi sono stati prelevati e sono stati posti in nuove piastre contenenti terreno PDA addizionato di antibiotici. Le piastre così ottenute sono state incubate a 24°C per 7 giorni. Prima di procedere con l'analisi di tipo molecolare, le diverse colonie sono state sottoposte ad analisi visiva al microscopio.

3.4 Analisi molecolari

3.3.1 Estrazione del DNA genomico

Le colonie monoconidiche sono state successivamente sottoposte ad estrazione del DNA genomico seguendo la procedura descritta da Prodi *et al.* (2011). Essa si articola nelle seguenti fasi:

- Il micelio ottenuto dalle colonie monoconidiche è stato raschiato mediante l'utilizzo di un bisturi e posto in Eppendorf contenenti ognuna 4 biglie di vetro precedentemente autoclavate. Per favorire l'immediato congelamento delle cellule fungine, le Eppendorf vengono poste a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ per almeno un'ora.
- Al micelio congelato vengono aggiunti $1500\text{ }\mu\text{L}$ di tampone di estrazione chiamato "CTAB" [costituito da: 2% CTAB (bromuro di esadeciltrimetilammonio); 100mM Tris-HCL a pH8; 20 mM di EDTA (acido etilendiamminotetracetico); 1,4 NaCl, 1% di solfito di sodio; 2% di PVP-40 (polivinilpirrolidone)] ed il tutto è frammentato tramite l'utilizzo di un vortex. Questa operazione porta alla disgregazione delle cellule e favorisce la penetrazione del tampone di estrazione. Le Eppendorf vengono poi incubate a bagnomaria a 65°C per almeno 15 minuti.
- Trascorso il periodo di incubazione il campione viene centrifugato (Microfuge 22R, Beckman) a temperatura ambiente per 10 minuti ad una velocità di 12000 rpm. Si recuperano poi $700\text{ }\mu\text{L}$ di surnatante che vengono trasferiti in una nuova Eppendorf da $1,5\text{ }\mu\text{L}$.
- Al surnatante prelevato si aggiunge un egual volume di una soluzione di alcool isoamilico:cloroformio (1:24), il tutto viene miscelato manualmente e poi centrifugato a 12000 rpm per 10 minuti. Il solvente organico favorisce la precipitazione delle proteine lasciando gli acidi nucleici in soluzione acquosa (Figura 9).

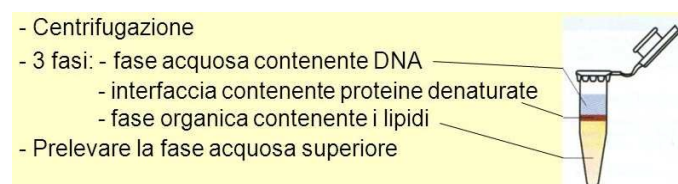


Figura 9: divisione delle 3 fasi con alcool isoamilico:cloroformio (1:24)

- Dai campioni centrifugati sono stati prelevati 550 μL di liquido surnatante trasferiti in Eppendorf da 1,5 ml e nuovamente addizionati con alcool isoamilico:cloroformio (1:24) in egual misura. I campioni sono stati ulteriormente centrifugati a 12000 rpm per 10 minuti.
- Si ottiene di nuovo un surnatante da cui vengono prelevati con cura 450 μL e vengono posti in una nuova Eppendorf da 1,5 μL , a cui vengono addizionati 225 μL di NaCl 5M e 450 μL di isopropanolo freddo (-20°C). L'alcool favorisce la precipitazione del DNA rendendolo insolubile in soluzione acquosa. I campioni, agitati mediante vortex per alcuni secondi, vengono posti alla temperatura di -20°C per almeno 60 minuti.
- Dopo il periodo di incubazione i campioni sono centrifugati ad una velocità di 12000 rpm per 20 minuti alla temperatura di 4°C . A questo punto il DNA precipitato nel pellet sul fondo della provetta, viene sottoposto a due lavaggi con 500 μL di etanolo al 70%, ognuno seguito da una centrifugazione a 12000 rpm per 10 minuti, in modo tale da allontanare i residui di isopropanolo eventualmente presenti sulla superficie del pellet.
- A questo punto l'etanolo viene allontanato e l'Eppendorf contenente il pellet di DNA, viene posta in una macchina del vuoto per 10 minuti in modo tale da allontanare eventuali tracce di etanolo rimaste.
- Il pellet così ottenuto viene risospeso in 50 μL di acqua nucleasi free, precedentemente sterilizzata utilizzando i raggi UV. Prima di effettuare le successive analisi molecolari il campione viene diluito in rapporto 1:10.

3.3.2 Quantificazione del DNA con NanoDrop

Prima di effettuare l'analisi molecolare tramite PCR, è necessario quantificare il contenuto di partenza del DNA del campione che si vuole analizzare, verificando la presenza di eventuali contaminazioni chimiche o di proteine dello stesso.

Per quantificare il DNA dei campioni fungini è stato utilizzato il Nanodrop (ND1000, Thermo Scientific). Il NanoDrop è uno spettrofotometro che ci permette di quantificare campioni di RNA, DNA o proteine utilizzando microvolumi. La quantità di luce assorbita è direttamente proporzionale alla quantità di DNA, quindi sulla base di questo valore viene ricavata la concentrazione espressa in $\text{ng}/\mu\text{L}$. Inoltre, in base alle diverse lunghezze d'onda dei diversi composti, è possibile avere

un'indicazione sulla qualità dei campioni. I picchi di assorbanza considerati per valutare la purezza dei campioni di DNA sono due: il rapporto 260/280 che deve essere circa 1,8; il rapporto 260/230 che deve essere compreso tra 1.8 e 2.2 (Figura 10).

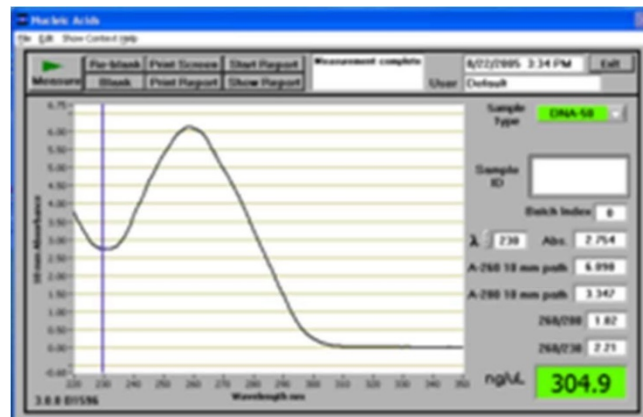


Figura 10: misura della concentrazione e purezza del campione mediante Nanodrop

Rapporti di purezza significativamente differenti possono indicare la presenza di proteine, fenolo, cloroformio o altri contaminanti. I passaggi da seguire per la quantificazione sono:

- Per iniziare, pulire la superficie ottica superiore ed inferiore del sistema di ritenzione del campione dello spettrofotometro, pipettando 1,5 μL di acqua nucleasi free sulla superficie ottica inferiore e chiudere la leva.
- Eseguire una prima lettura del bianco con 1,5 μL di acqua nucleasi free per tarare la macchina.
- Una volta completata la misurazione del bianco, disporre 1,5 μL del primo campione di DNA da quantificare, abbassare la leva e avviare la misurazione. Il software calcola automaticamente la concentrazione di acido nucleico e i rapporti di purezza.
- Alla fine del processo fare ulteriormente la lettura del vuoto con 1,5 μL di acqua nucleasi free per ripulire lo strumento (Desjardins & Conklin, 2010).

3.3.3 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Una volta ottenuto e quantificato il DNA è stata eseguita una reazione a catena della polimerasi (PCR) basata sulla parziale amplificazione del gene *ITS*. La regione *ITS*, acronimo di *Internal Transcribed Spacer*, è una sequenza altamente variabile che permette di distinguere le diverse specie fungine

mediante analisi PCR (Martin e Rygiewicz, 2005). La Master Mix utilizzata per la PCR aveva un volume finale di 50 μ L, ottenuta con i seguenti reagenti:

- 24,80 μ L di acqua sterilizzata priva di nucleasi;
- 10 μ L di buffer 5x (Promega);
- 2 μ L di primer forward 10mM (Sigma Aldrich);
- 2 μ L di primer reverse 10mM (Sigma Aldrich);
- 1 μ L di dNTP mix 10mM (Promega);
- 0,20 μ L dell'enzima Taq polimerasi 5U μ L-1 (Promega);
- 10 μ L del DNA del campione in esame precedentemente diluito in rapporto 1:10.

3.3.3.1 Primers del gene *ITS* (ITS4/ITS5)

I primer utilizzati per la parziale amplificazione del gene *ITS* sono ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990) (Tabella 2). Il ciclo della PCR usato per amplificare ITS consiste in 5 differenti fasi:

1. Denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti;
2. Denaturazione a 94°C per 45 secondi;
3. Annealing a 56°C per 45 secondi;
4. Elongazione a 72°C per 1 minuto;
5. Elongazione finale a 72°C per 10 minuti.

Le fasi 2,3 e 4 sono ripetute per 35 cicli totali.

Gene	Primer	Sequenze	Dimensione del prodotto di amplificazione	Temperatura di annealing	Riferimenti
<i>ITS</i>	ITS4	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	700 bp	56°C	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS5	5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G			

Tabella 2: sequenze dei primer utilizzati per l'amplificazione parziale del gene *ITS*

3.3.4 Analisi elettroforetica del DNA amplificato

Per quanto riguarda la corsa elettroforetica, sono stati caricati circa 8 μL di ciascuna reazione PCR in gel di agarosio all'1% in tampone TBE. La cella elettroforetica (modello H213, Scie Plas) contiene il tampone TBE 1x (54 g di tris-base, 27,5 g di acido borico, 20 mL 0,5M di EDTA pH 8,0). La tensione applicata per la corsa elettroforetica era circa 120-130 volt per 40 minuti (Figura 11). Durante il caricamento del gel sono stati inseriti anche 5 μL di Marker di 100bp DNA Promega per confrontare le dimensioni (bp) dei campioni analizzati (Figura 12).

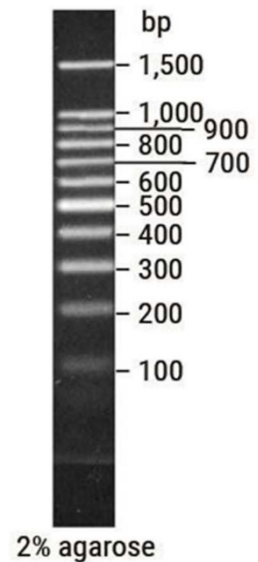
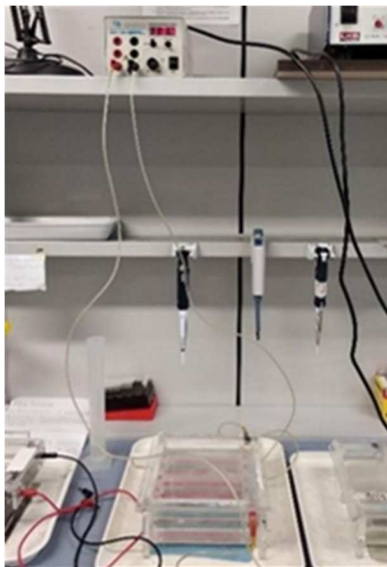


Figura 11: Cella di elettroforesi (modello H213, Scie Plas) Figura 12 : Marker 100 bp DNA Promega.

Le corse elettroforetiche sono state visualizzate utilizzando l'illuminatore aereo UV (Spectroline, Model TVL-312°) dopo l'immersione in una soluzione di bromuro di etidio 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (EtBr) per circa 15 minuti. Grazie alla fissazione di EtBr, è stato possibile visualizzare gli ampliconi. Un controllo negativo è sempre stato incluso in ciascuna reazione a catena della polimerasi per verificare la presenza di eventuali contaminazioni.

3.3.5 Purificazione del DNA

Prima di mandare a sequenziare il prodotto di PCR, è stata effettuata la sua purificazione seguendo il protocollo presente nel kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). In breve:

- Si aggiunge un volume uguale di Membrane Binding Solution al prodotto di amplificazione di PCR, quindi ai 42 μL del prodotto della PCR sono aggiunti 42 μL di Membrane Binding Solution;
- Il prodotto PCR preparato è trasferito in una minicolonna, con una membrana di cellulosa, che a sua volta è inserita in un'Eppendorf aperta. Questa è lasciata per 1 minuto a temperatura ambiente;
- Il tutto è poi centrifugato a 12000 rpm per 1 minuto e a fine centrifuga il liquido sceso nell'Eppendorf è allontanato e la minicolonna reinserita. IL DNA, così facendo, rimane intrappolato nella cellulosa;
- Sono aggiunti 700 μL di Membrane Wash Solution addizionata di etanolo ed il tutto viene centrifugato a 12000 rpm per 1 minuto. A fine centrifuga viene allontanato il liquido presente nella Eppendorf;
- Il punto precedente viene ripetuto aggiungendo 500 μL di Membrane Wash Solution e, successivamente, centrifugato a 12000 rpm per 5 minuti;
- È stata svuotata l'Eppendorf e poi è stata fatta una centrifuga per 1 minuto per far scendere dalla minicolonna eventuali residui;
- La minicolonna è trasferita in un'Eppendorf nuova da 1,5 mL e poi sono aggiunti 30 μL di H₂O nucleasi-free. Il tutto è lasciato riposare per 1 minuto a temperatura ambiente e poi centrifugato a 12000 rpm per 1 minuto;
- La minicolonna è stata tolta e il DNA precipitato nell'Eppendorf è pronto per essere mandato a sequenziare. Il DNA purificato viene conservato a 4°C.

3.3.6 Sequenziamento ed analisi delle sequenze

Il sequenziamento dei campioni amplificati per il gene *ITS* è stato effettuato dalla società Eurofins Genomics. Tutte le sequenze ottenute in formato .ab1 sono state inizialmente analizzate e pulite utilizzando il software Chromas. Le sequenze nucleotidiche sono state poi messe a confronto con le sequenze depositate nei database NCBI utilizzando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3.5 Valutazione dell'efficacia dei prodotti *in vitro* contro *Diplodia mutila*

3.5.1 Prodotti RESOLV 5 e FI PLUS

Nella prova svolta *in vitro* è stata valutata l'efficacia del prodotto RESOLV 5 e FI PLUS nei confronti del patogeno *Diplodia mutila* (P746a) su un substrato nutritivo agarizzato come il PDA.

I prodotti utilizzati sono una miscela di microelementi, nello specifico rame e zinco, e a base di estratti vegetali combinati con un carrier di idrossiapatite brevettato con il nome di MICROSAP®. Il prodotto FI PLUS contiene al suo interno solfato di rame a 3,5% e solfato di zinco al 1%. Per quanto riguarda il prodotto RESOLV 5, invece, si ha una maggior presenza di rame (5%), mentre il contenuto di zinco rimane invariato.

Nello specifico, la sperimentazione *in vitro* ha previsto l'allestimento di 3 repliche (a,b,c) per ogni tesi a concentrazione di prodotto differente. Il prodotto FI PLUS è stato indicato con la sigla Fi, mentre il RESOLV 5 con la sigla Rvi.

Le tesi analizzate sono state in totale sei: Fi 0,2% (Fi 300), Fi 0,4% (Fi 500), RVi 0,4% (RVi 500), RVi 0,8% (RVi 1000), ozono ed un controllo negativo.

Le miscele utilizzate sono state ottenute attraverso delle normali diluizioni che hanno previsto le seguenti proporzioni di prodotto/acqua per la preparazione di 1 mL di soluzione. Sono state quindi ottenute le seguenti quantità:

- Fi 0,2% → 0.133 mL di prodotto + 0.867 mL di H₂O
- Fi 0,4% → 0.267 mL di prodotto + 0.733 mL di H₂O
- RVi 0,4% → 0.267 mL di prodotto + 0.733 mL di H₂O
- RVi 0,8% → 0.533 mL di prodotto + 0.467 mL di H₂O
- Ozono → tal quale

L'ozono è stato utilizzato tal quale, quindi senza nessun tipo di diluizione.

Preparate le diluizioni si procede con l'allestimento della prova *in vitro* tramite la tecnica dell'inclusione. Nella piastra Petri contenente 10 mL di PDA, inseriti attraverso l'utilizzo di una pipetta elettronica, vengono addizionati 150 µl delle diverse diluizioni dei prodotti da testare.

Le piastre vengono lentamente agitate per alcuni secondi in modo da permettere la completa occupazione della piastra. Successivamente le piastre vengono lasciate aperte per evitare lo sviluppo di condensa e garantire la solidificazione del materiale. Attraverso l'utilizzo di un foro tappi di ottone sterilizzato su fiamma di becco Bunsen, è stato prelevato un tondello di micelio (dimensioni di 7 mm), il quale è stato poi disposto sulla piastra Petri. Il tutto è stato effettuato sotto cappa a flusso laminare per garantire la massima sterilità dell'ambiente di lavoro. Sono state poi preparate tre repliche per ogni tesi in corso di valutazione, con l'aggiunta di un "bianco", ovvero substrato PDA con la sola aggiunta di acqua. Le piastre sono state messe ad incubare a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. I rilievi sono stati effettuati a 3, 5 e 7 giorni dalla preparazione delle piastre per monitorare sia lo sviluppo del fungo sia l'efficacia dei prodotti RESOLV 5 e FI PLUS.

La crescita e lo sviluppo del fungo sono stati valutati mediante un righello con il quale si è misurata l'estensione di esso lungo le direzioni ortogonali. Dalle misure ottenute si è poi calcolata la media e l'incidenza statistica.

3.5.2 Prodotto ES PLUS

Successivamente, è stata svolta una prova *in vitro* analoga alla precedente ma testato il prodotto ES PLUS, prodotto indirizzato alla lotta dei patogeni responsabili del Mal dell'esca della vite. Tale prodotto è a base di microelementi (rame e zinco) combinati con MICROSAP® ed estratti vegetali. Il prodotto ES PLUS ha un basso contenuto sia di rame (3,5%) sia di zinco (1%).

In questa prova *in vitro* sono stati testati due ceppi differenti di *Diplodia mutila*: P746a (testato anche precedentemente) e M866 (ceppo proveniente dal primo isolamento effettuato nel 2019 alla Vite del Fantini).

La sperimentazione ha previsto l'allestimento di 3 repliche (a,b,c) per ogni tesi a concentrazione di prodotto differente. Le tesi analizzate sono state in totale quattro: ES PLUS 0.2 % (ES 300), ES PLUS 0.4 % (ES 500), un controllo chimico ed un controllo negativo.

Le miscele utilizzate sono state ottenute attraverso delle normali diluizioni che hanno previsto le seguenti proporzioni di prodotto/acqua:

- ES PLUS (0.2%) \rightarrow 0,167 mL di prodotto + 0.833 mL di H₂O
- ES PLUS (0.4%) \rightarrow 0,28 mL di prodotto + 0.72 mL di H₂O

- Controllo chimico → 0.1 mL di prodotto + 0.9 mL di H₂O

La prova è stata svolta seguendo i procedimenti della tecnica dell'inclusione sopra riportati per i prodotti RESOLV 5 e FI PLUS.

Le piastre sono state messe in termostato ad incubare a 25°C ± 1. I rilievi sono stati effettuati a 3, 5 e 7 giorni valutando la crescita media tramite righello anche in confronto ai prodotti già analizzati.

3.6 Prove di crescita *in vitro* del patogeno *Diplodia seriata*

Per individuare la temperatura ottimale di crescita del ceppo P751 (*Diplodia mutila*) sono state effettuate prove di crescita *in vitro* a cinque diverse temperature: 5°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C. La prova ha previsto l'allestimento di 5 repliche per ogni temperatura presa in considerazione, per un totale di 25 piastre Petri.

Dalla colonia P751 di partenza cresciuta su terreno PDA, sono stati prelevati 25 tondelli di micelio (dimensioni di 7 mm ognuno) attraverso un foratappi di ottone sterilizzato su fiamma di becco Bunsen e posti al centro di altrettante piastre Petri contenenti ciascuna 10 mL di substrato PDA. Le piastre sono state sigillate con parafilm. Questi passaggi sono avvenuti in ambiente totalmente sterile, sotto cappa a flusso laminare. Le piastre Petri contenenti il tondello del patogeno sono state quindi poste in termostati diversi in base alla temperatura di crescita da testare. Dopo 3 e 5 giorni di incubazione sono stati effettuati i rispettivi rilievi misurando la crescita della colonia, ottenuta dalla media delle due diagonali del diametro.

3.7 Analisi statistica delle prove *in vitro*

I risultati delle prove *in vitro* sulla valutazione dell'efficacia dei prodotti e della temperatura ottimale sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il software Statgraphics 2.1. La distribuzione dei dati è stata valutata con il test Shapiro-Wilk. Per i dati parametrici è stata effettuata l'analisi unidirezionale della varianza (ANOVA) attraverso il test Duncan. Le differenze con un p-value <0,05 sono state considerate statisticamente significative.

3.8 Identificazione malattie virali nella Vite del Fantini

L'individuazione degli agenti virali presenti sui campioni prelevati della Vite del Fantini è stata effettuata mediante reazione di trascrizione inversa abbinata alla reazione a catena della polimerasi (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR), impiegando appropriate coppie di primers (Tabella 3).

Virus	Primer	Sequenza (5'-3')	Prodotto (bp)	Riferimenti bibliografici
<i>GVA</i>	GVA6591F	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA	271	Goszczynski <i>et al.</i> , 2003
	GVA6862R	TCGAACATAACCTGTGGCTC		
<i>GVB</i>	H28	GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC	459	Minafra and Hadidi, 1994
	C410	ATCAGCAAACACGCTTGAACCG		
<i>GLRaV-1</i>	LR1-HSP70-149f	ACCTGGTTGAACGAGATCGCTT	168	Osman <i>et al.</i> , 2008
	LR1-HSP70-293r	GTAAACGGGTGTTCTTCAATTCTCT		
<i>GLRaV-2</i>	P19qtF4	CTAACAATTTCTTCTTTGGATCGCAT	155	Beuve <i>et al.</i> , 2007
	P24qtR	AGAATGTCTTCAGCTTCATAAGGAG		
<i>GLRaV-3</i>	56F	AAGTGCTCTAGTTAAGGTCAGGAGTGA	254	Osman <i>et al.</i> , 2008
	285R	GTATTGGACTACCTTTCGGGAAAAT		
<i>GLRaV-4</i>	LR4 hsp-85f	ATATACATACCTTTCGGGAAAAT	93	Osman <i>et al.</i> , 2008
	LR4 hsp-178r	CCCTATAAACTAGCACATCCTTCTCTAGT		
<i>GLRaV-5</i>	26f	AACACTCTGCTTTTCTGCTGGC	162	Osman <i>et al.</i> , 2008
	188r	CTTTTATGTCCCGATAAACGAGTACA		
<i>GLRaV-9</i>	LR9-114f	CGGCATAAGAAAAGATGGCAC	82	Osman <i>et al.</i> , 2008
	LR9-196r	TCTTTATGTCACGGTAGACCAACAC		

<i>ArMV/</i> <i>GFLV</i>	M2	(C/T)T(A/G)GATTTTAGGCTCAATGG	290	Gambino <i>et al.</i> , 2008
	M3	TG(C/T)AA(A/G)CCAGG(A/G)AAGAAAAT		
<i>GFkV</i>	FkV1	AGTACCTCCTCCACCGCACC	243	Sabanadzovic <i>et al.</i> , 1996
	FkV2	TTTCTCGGGCAGAGAGCCGTCC		
<i>GRSPaV</i>	RSP13	GAG GGT CCA GTT GTT TCC	314	Meng <i>et al.</i> , 1999
	RSP14	ATC CAA AGG ACC TTT TGA CC		
<i>GPGV</i>	GPgV F4	GGCCGTTCACTTATGTCTGA	155	Beuve <i>et al.</i> , 2007
	GPgV r4	CTCCTGACGAATCGACATATCTTCC		

Tabella 3: Coppie di primers utilizzate per la determinazione dello status sanitario delle vite saggiate

Nello specifico, sono state svolte le analisi per l'individuazione dei seguenti virus: *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3, 4, 5, 9* (GLRaV-1, 2, 3, 4, 5, 9), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV), *Grapevine pinot gris virus* (GPGV).

3.8.1 Estrazione acidi nucleici dai tessuti vegetali

L'estrazione degli RNA virali è stata effettuata dal tessuto fogliare della Vite del Fantini. È stato utilizzato lo Spectrum™ Plant Total RNA kit (SIGMA), modificandone leggermente il protocollo. Un campione di 1 g di tessuto fogliare è stato omogeneizzato in buste di estrazione (Bioreba), utilizzando un apposito trapano, dopo avere aggiunto 7 ml di tampone MacKenzie di estrazione, con forti proprietà denaturanti e distruttive nei confronti delle cellule:

- 4 M guanidina isotiocianato;
- 0,2 M sodio acetato (pH 5);
- 25 mM NaEDTA (etilendiaminotetracetato di sodio);
- 2,5% (w/v) PVP-40 (polivinilpirrolidone).

A 1 ml della sospensione ottenuta, trasferita in un tubo Eppendorf da 1,5 ml, sono stati aggiunti 150 μ l di sodiolaurilsarcosina al 30%, che ha la funzione di denaturare le proteine; il tutto è stato incubato a 70°C per 10 minuti e poi centrifugato per cinque minuti a 13.000 rpm.

Terminata questa fase, seguendo il protocollo del kit, sono stati impiegati i seguenti componenti:

- “Filtration Columns” (blu): le colonnine trattengono i frammenti delle cellule sottoposte in precedenza a lisi consentendo l’omogeneizzazione del campione;
- “Binding Columns” (rosse): le membrane di gel di silice, presenti nelle colonnine, legano gli acidi nucleici estratti (DNA+RNA) che sono poi facilmente eluibili con acqua;
- “Soluzioni di lavaggio 1 e 2”: tamponi di lavaggio contenenti etanolo per la rimozione di metaboliti e composti cellulari.

Il volume totale è stato trasferito in una “Filtration Column”, posta in un tubo Eppendorf da 2 ml (“collection tube”, fornito dal kit), e centrifugato a 13.000 rpm per cinque minuti. Questo passaggio permette di rimuovere la maggior parte dei residui cellulari; tuttavia, una piccola quantità degli stessi può passare attraverso la membrana della colonna e formare un piccolo sedimento (pellet) sulla base della provetta. Questa fase può essere ripetuta due volte, a seconda del volume iniziale.

L’eluato è stato trasferito in un nuovo tubo Eppendorf (da 1,5 ml, non fornito dal kit) a cui sono stati aggiunti 350 μ l di etanolo al 70%; 700 μ l della miscela sono stati posti in una “Binding Column”, inserita in un “collection tube”, centrifugando a 13.000 rpm per 1 minuto. Eliminato l’eluato, il procedimento è stato ripetuto una seconda volta, utilizzando la quantità rimasta.

L’acido nucleico, legato alla “Binding Column”, è stato quindi lavato con 500 μ l di tampone di lavaggio 1 e centrifugato a 13.000 rpm per 1 min. In seguito, la colonnina è stata lavata 2 volte con 500 μ l di tampone di lavaggio 2 e centrifugata a 14.000 rpm per 1 min. Infine è stata centrifugata nuovamente “a vuoto” per 3 min, con l’intento di eliminare ogni residuo di etanolo che potrebbe inibire le reazioni successive.

Infine, l’RNA totale è stato eluito con 100 μ l di acqua RNase-free, centrifugando a 13.000 rpm per 1 minuti. L’RNA così ottenuto è stato conservato a -20°C.

3.8.2 Reazione di trascrizione inversa (RT) abbinata alla reazione a catena della polimerasi (PCR)

I campioni di RNA estratti e i controlli positivi e negativi sono stati centrifugati a 4°C per 10 min (per ridurre la concentrazione degli inibitori presenti) e sottoposti a retrotrascrizione (RT, *reverse transcriptase*), che consente la sintesi di un filamento di DNA complementare (cDNA) sullo stampo di un filamento di RNA.

È stato utilizzato 0.5 µL di RNA, a cui sono stati aggiunti 4,5 µL della miscela:

- M-MLV RT 5X Buffer (Promega) 1,0 µl
- Random primers (0,5 µg/µl; Roche) 1,0 µl
- dNTPs (10 mM; Promega) 0,5 µl
- M-MLV RT (20 U/µL, Promega) 0,25 µl
- H₂O RNasi-Free 1,75 µl

La reazione è avvenuta, in ThermoStrip da 0,2 ml (Micro Biotech), a 42°C per un'ora, seguita da una fase a 94°C per 15 min, per inattivare l'enzima.

I campioni sono stati quindi sottoposti alla reazione a catena della polimerasi (PCR, *polymerase chain reaction*) con amplificazione del frammento ad opera dell'enzima *Taq* polimerasi, impiegando il termociclatore Thermocycler Biometria T3. Ai 5 µl di reazione di RT, sono stati aggiunti 20 µl della miscela di PCR così composta:

- Free Mg 5x Buffer (Promega) 5,00 µl
- MgCl₂ (25 mM; Promega) 1,50 µl
- dNTPs (10 mM; Promega) 0,50 µl
- Primer omologo o "forward" (10µM) 1,00 µl
- Primer complementare o "reverse" (10µM) 1,00 µl
- Go Taq Flexy polimerasi (5U/ µL; Promega) 0,25 µl
- H₂O RNase-Free 10,8 µl

Il ciclo di PCR prevede:

- denaturazione a 95°C per 10 sec;
- annealing per 10 sec a T°C variabile a seconda del virus analizzato (tab.7);
- sintesi a 72° per 45 sec.

Queste fasi sono state ripetute 35 volte.

Otto microlitri dei prodotti ottenuti dalla reazione RT-PCR sono stati analizzati tramite elettroforesi in gel di agarosio all'1% in TBE 1X (500 ml di TBE 10X contengono 54 g Tris-base, 27,5 g acido borico e 20 ml di 0,5 M NaEDTA pH 8,0) impiegando la cella elettroforetica MIDI HU13 (ANALYTICAL CONTROL). Terminata la corsa, il gel è stato colorato in una soluzione 0,4 µg/ml di bromuro di etidio e i frammenti di DNA sono stati evidenziati mediante un transilluminatore a luce UV (Spectroline, Model TVL-312A). Il peso molecolare dei prodotti di PCR è stato stimato confrontandone la mobilità con frammenti di DNA noti (100 bp DNA Ladder, Promega).

3.9 Trattamento in endoterapia

Dopo aver analizzato le colonie fungine e svolto le prove *in vitro* con i prodotti RESOLV 5, FI PLUS ed ES PLUS, sono stati eseguiti due trattamenti in endoterapia utilizzando il prodotto RESOLV 5 e ES PLUS. Tali prodotti, infatti, avevano mostrato nelle prove in piastra degli ottimi risultati nel contenimento della crescita del patogeno fungino analizzato. Il prodotto RESOLV 5 è stato utilizzato nel primo trattamento ad una concentrazione del 0.2%, mentre nel secondo trattamento è stato utilizzato il prodotto ES PLUS (0.2%).

Il trattamento è stato effettuato alla pressione di 4 bar per circa 30 minuti.

Nella Figura 13 è possibile osservare i fori effettuati per il successivo trattamento in endoterapia (Figura 14).



Figura 13: fori sul tronco



Figura 14: trattamento in endoterapia

4. RISULTATI

In seguito alle osservazioni macroscopiche e microscopiche delle colonie fungine isolate dai diversi tessuti vegetali prelevati dalla Vite ultracentenaria del Fantini, è stato possibile identificare a livello morfologico la presenza di 5 diversi generi fungini: *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Penicillium* spp. ed *Aspergillus* spp.

Tutte le altre colonie fungine isolate, non identificate a livello morfologico, sono state sottoposte ad analisi molecolare per il riconoscimento a livello di specie.

4.1 Identificazione delle specie isolate tramite analisi molecolare

Un totale di 5 isolati fungini provenienti dalla Vite ultracentenaria del Fantini sono stati caratterizzati in seguito al sequenziamento parziale del gene *ITS* e successiva analisi in BLAST. L'elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione del gene *ITS* ha evidenziato la presenza di un singolo amplicone della dimensione attesa di 700 bp.

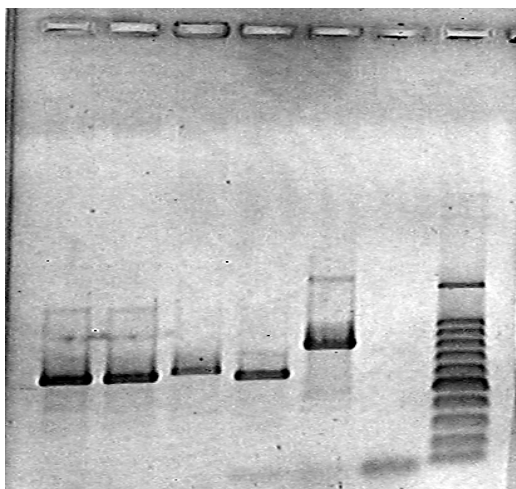


Figura 15: prodotto di amplificazione del gene ITS

Inserendo le sequenze dei rispettivi campioni su BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) si è potuta verificare l'identità dei 5 diversi isolati fungini, riscontrando la presenza di 4 quattro patogeni differenti (Figura 16):

- la piastra P1209a/19 e P746a presentano un'identità del 99.8% con la sequenza di riferimento *Diplodia mutila* CBS 302.36;

- la piastra P751 presenta un'identità del 99.82% con la sequenza di riferimento *Diplodia seriata* CBS 112555;
- la piastra P907 presenta un'identità del 98.27% con la sequenza di riferimento *Fomitiporia mediterranea* F42-a16;
- la piastra P927 presenta un'identità del 99.81% con la sequenza di riferimento *Kalmusia variispora* CBS 121517.

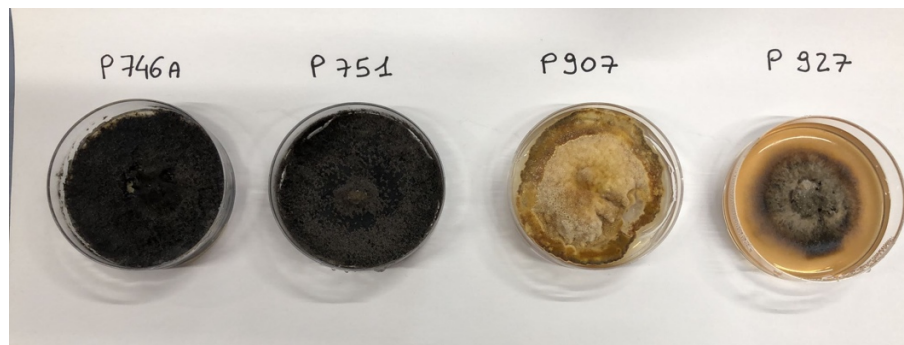


Figura 16: piastre Petri dei diversi isolati fungini sottoposti ad analisi molecolare

Il patogeno *Diplodia mutila* (P746a), così come il fungo *Diplodia seriata* (P751), in coltura monoconidica, presentano uno sviluppo circolare con micelio rado, caratterizzati da una colorazione inizialmente biancastra e, successivamente, grigio-verde fino ad assumere un colore intenso nerastro con l'invecchiamento della colonia. I conidi sono ialini, cilindrici e privi di setti.

La *Fomitiporia mediterranea* (P907) appare con un micelio molto compatto dal colore bianco-giallastro che con il tempo assume una colorazione più scura giallo-marrone.

La colonia di *Kalmusia variispora* (P927) presenta un micelio aereo dal colore grigio-olivaceo e sul retro della piastra la colonia presenta un colore più scuro nel centro. Il micelio ha uno sviluppo circolare ed i conidi ellissoidi sono unicellulari e ialini.

4.2 Incidenza dei generi fungini sui diversi campioni

Terminato il periodo di incubazione, si è proceduto all'analisi micologica valutando l'incidenza in percentuale di ciascun genere fungino isolato dai campioni prelevati in periodi diversi nel corso del 2019/2020. I frammenti dei campioni da cui non è stato osservato lo sviluppo di colonie fungine sono stati classificati come "sani". L'analisi molecolare del primo isolamento effettuato nel 2019 ha permesso di evidenziare la presenza del patogeno *Diplodia mutila*, isolato con una frequenza del 94.3%. (Grafico 1).

Incidenza delle specie fungine individuati nell'isolamento anno 2019.

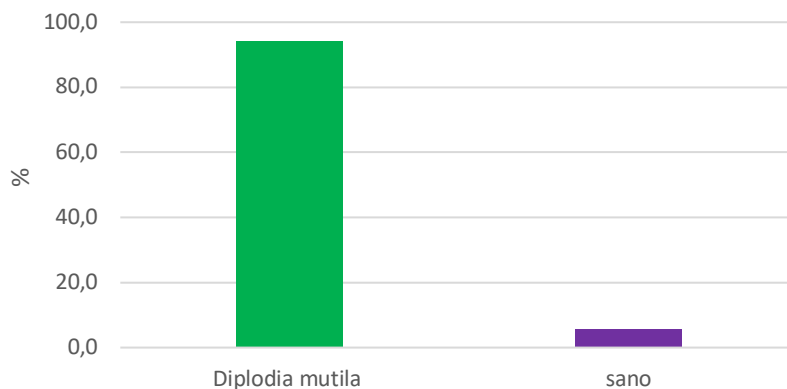


Grafico 1: Incidenza (%) delle specie isolate dalla Vite ultracentenaria del Fantini nell'anno 2019

Negli isolamenti effettuati nell'anno 2020, invece, si è potuto notare un incremento della comunità fungina all'interno dei campioni analizzati, ma presentando un patogeno in comune.

L'isolamento compiuto sui trucioli prelevati da quattro posizione diverse è avvenuto nei primi giorni di luglio 2020. L'analisi effettuata ha permesso di mettere in risalto la presenza di 6 generi fungini differenti (Grafico 2). Nel dettaglio, è stato possibile osservare la presenza di *Diplodia seriata* (8%), *Penicillium* spp. (6.3%), *Aspergillus* spp. (1.8%), *Alternaria* spp. (1.8%), *Cladosporium* spp. (0.9%) e *Diplodia mutila* (0.9%).

Incidenza dei generi fungini nell'isolamento 03.07.2020

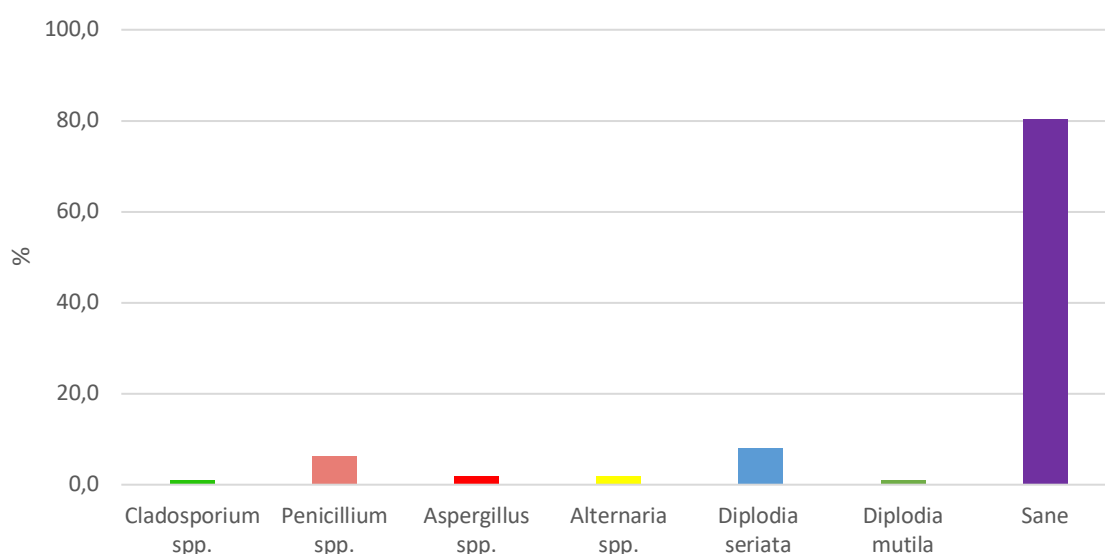


Grafico 2: Incidenza (%) dei generi e specie isolate dalla Vite ultracentenaria del Fantini in data 3 luglio 2020

L'analisi del tralcio proveniente dal cordone destro, effettuata a fine luglio 2020, ha evidenziato la presenza di *Fomitiporia mediterranea* con un'incidenza del 28,6%, *Diplodia mutila* con un'incidenza del 23,8% ed infine *Alternaria* spp. (4,5%) (Grafico 3).

Incidenza dei generi fungini nell'isolamento in data 31.07.2020

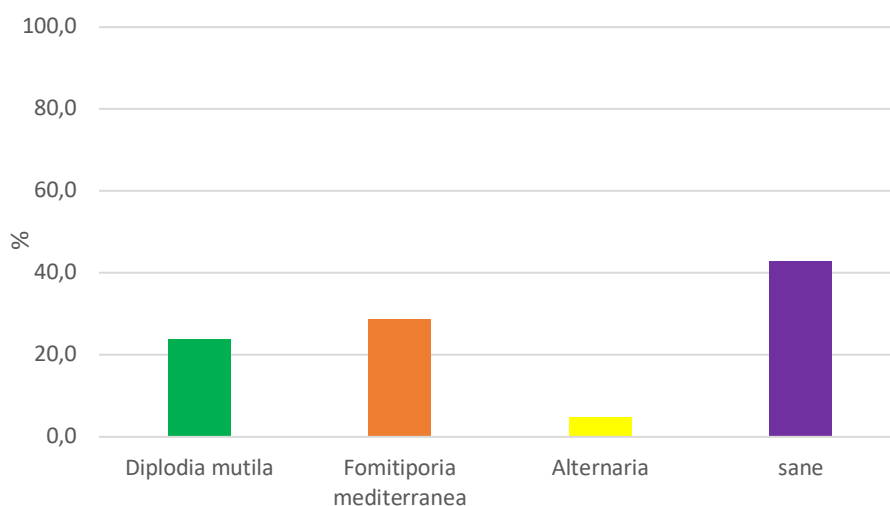


Grafico 3: Incidenza (%) dei generi e specie isolate dalla Vite ultracentenaria del Fantini in data 31 luglio 2020

Dall'isolamento del cordone destro, effettuato nei primi giorni di agosto 2020, si è potuta notare la presenza unica e predominante del patogeno *Fomitiporia mediterranea* presente con un'incidenza del 40% sul totale del materiale analizzato (Grafico 4).

Incidenza dei generi fungini dell'isolamento in data 07.08.2020

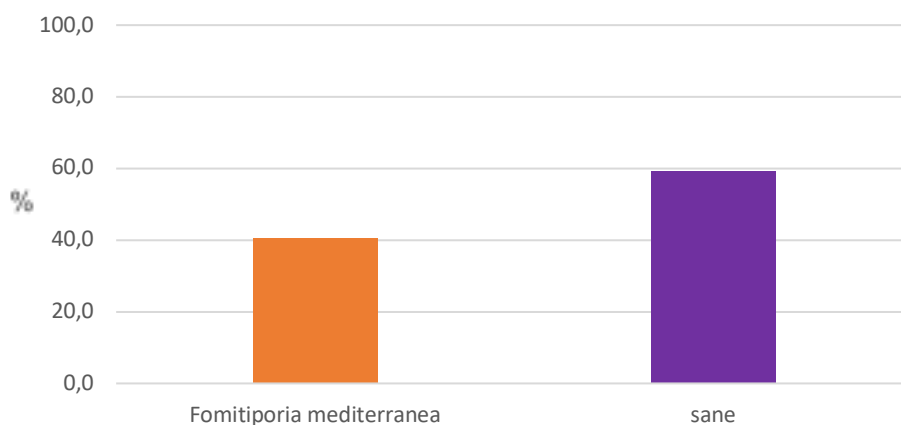


Grafico 4: Incidenza (%) dei generi e specie isolate dalla Vite ultracentenaria del Fantini in data 7 agosto 2020

L'ultimo isolamento effettuato sul cordone di destra a fine agosto 2020, mostrato nel Grafico 5, ha evidenziato la presenza di 3 diversi patogeni fungini: *Alternaria* spp., *Epicoccum* spp. e *Kalmusia variispora*. Il patogeno maggiormente presente è *Kalmusia variispora* con un'incidenza del 75% rispetto ad *Alternaria* spp. al 18.8% ed una più bassa percentuale di *Epicoccum* spp. (3.1%).

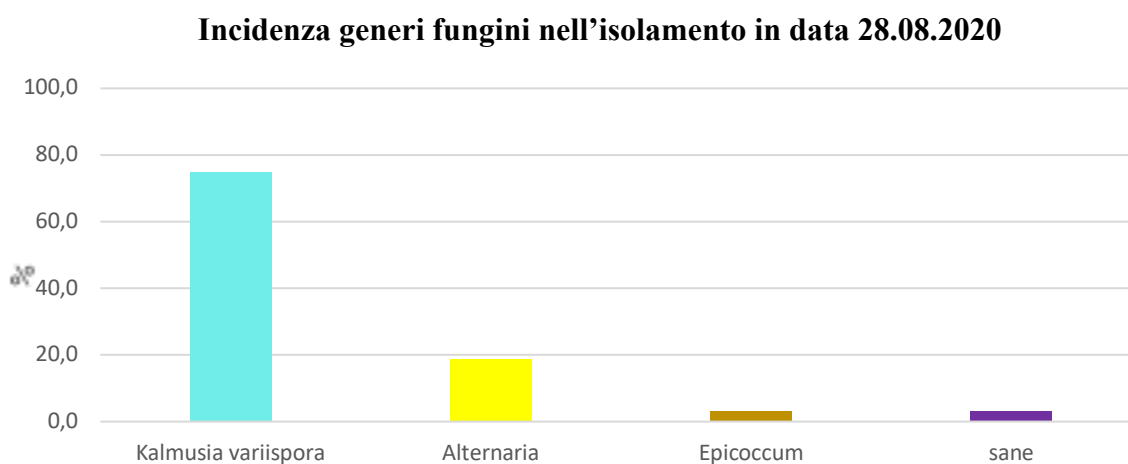


Grafico 5: Incidenza (%) dei generi e specie isolate dalla Vite ultracentenaria del Fantini in data 28 agosto 2020

4.3 Valutazione efficacia *in vitro* di prodotti contro il patogeno *Diplodia mutila*

4.3.1 Prodotti RESOLV 5 e FI PLUS

Il rilievo della prova è stato svolto a 3 e 5 dopo l'allestimento della prova. Nella Tabella 4 vengono riportate misurazione relative alla crescita del patogeno con i diversi prodotti e risultati dell'analisi statistica.

Analizzando i dati possiamo notare come nel primo rilievo il prodotto RESOLV 5 sia risultato maggiormente efficace: a concentrazione 0,2% e 0,4% il prodotto ha inibito la crescita del fungo e le due tesi non mostrano differenze secondo i dati statistici.

Prendendo in considerazione i dati ottenuto dall'utilizzo di FI PLUS riscontriamo una crescita della colonia di 62.2 mm alla concentrazione dello 0.2% e di 30.8 mm a concentrazione 0.4%.

Attraverso i dati statistici è possibile osservare come la tesi con il prodotto FI PLUS al 0,2% non mostri alcuna differenza di crescita significativa con la tesi di controllo con acqua.

La tesi con l'ozono evidenzia una crescita della colonia di 24.8 mm e statisticamente non si differenzia dal RESOLV 5 (sia 0,4% sia 0,8%) e dal FI PLUS al 0,4%.

IL rilievo svolto al quinto giorno ha messo in luce i dati precedentemente ottenuti al terzo giorno confermando l'andamento di crescita del patogeno

Come si può notare dalla figura 17 il RESOLV a concentrazione 0.4% e 0.8% ha inibito la crescita del patogeno, non presentando differenze statistiche tra le due tesi.

Tesi	Diametro medio	p value <0,05
Controllo (H ₂ O)	66,7	c
Ozono	24,8	ab
Fi 0.2%	62,2	c
Fi 0.4%	30,8	b
RVi 0.4%	2,5	a
Rvi 0.8%	0,0	a

Tabella 4: risultati ottenuti dalle misurazioni ed analisi statistica delle prove in vitro al 3° giorno

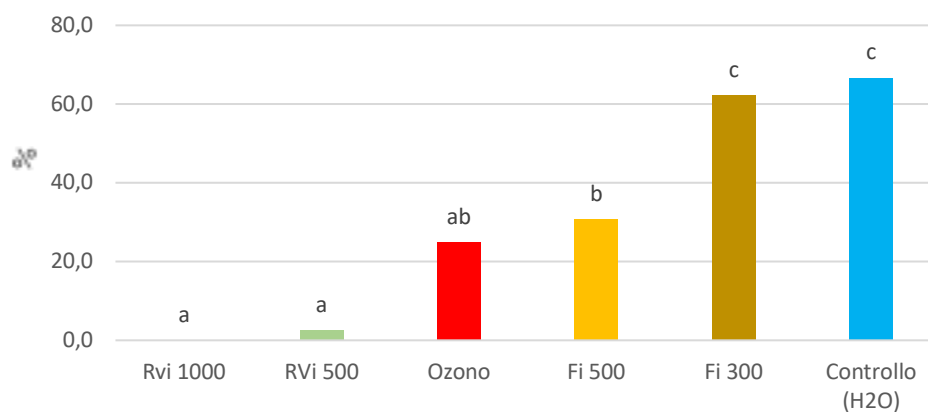


Grafico 6.: andamento crescita del patogeno (%) al 3° giorno

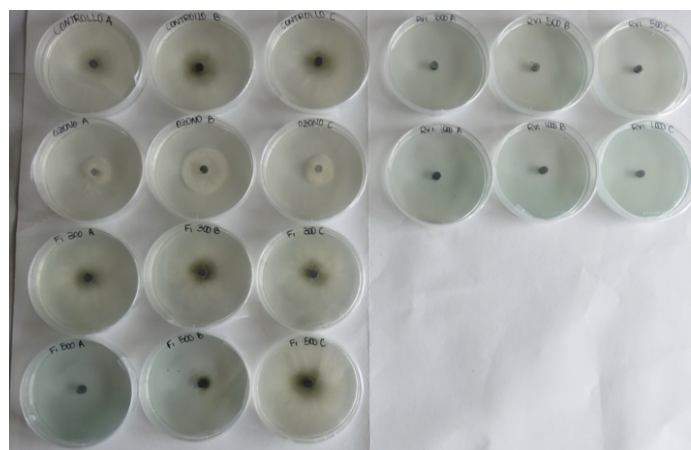


Figura 17: rilievo visivo al 3° giorno

Il rilievo svolto al quinto giorno ha confermato l'andamento di crescita del patogeno osservato nelle misurazioni effettuate precedentemente (Grafico 7).

Soffermandosi sulle misurazione e le analisi statistiche, dopo cinque giorni dall'allestimento della prova risulta che il prodotto RESOLV 5 ha inibito lo sviluppo del micelio sia nella tesi a concentrazione 0.4% sia allo 0.8% (Tabella 5).

La tesi con il prodotto FI PLUS a concentrazione 0.2% non ha presentato differenze di crescita del patogeno e di analisi statistica con la tesi di controllo (H₂O). A concentrazione 0.4% il prodotto è riuscito ad inibire parzialmente la crescita.

Tesi	Diametro medio	p value <0,05
Controllo (H ₂ O)	78,0	c
Ozono	51,5	bc
Fi 0.2%	78,0	c
Fi 0.4%	36,3	b
RVi 0.4%	2,7	a
Rvi 0.8%	0,0	a

Tabella 5: risultati ottenuti dalle misurazioni del diametro medio e analisi statistica al 5° giorno

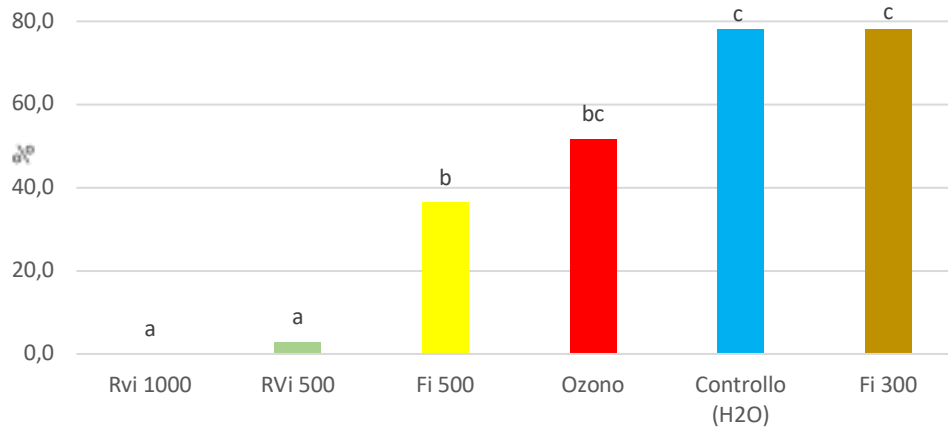


Grafico 7: andamento crescita patogeno (%) al 5° giorno

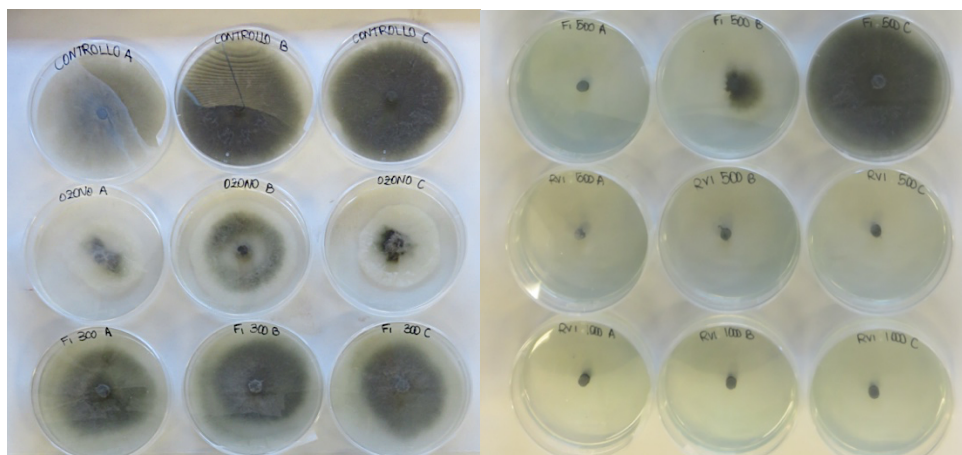


Figura 18: rilievo visivo al 5° giorno

4.3.2 Prodotto ES PLUS

Il rilievo della prova è stato svolto sempre a 3 e a 5 giorni dall'allestimento della prova.

Analizzando i dati possiamo notare come la crescita del patogeno non sia stata inibita da ES PLUS, sia a concentrazione 0,2% sia a 0,4% (Tabella 6).

Il prodotto ES PLUS a concentrazione 0.2% al primo rilievo ha mostrato una crescita della colonia di 22.3 mm, mentre a concentrazione 0.4% solo di 10.7 mm. Il controllo chimico (Rubin Plus) ha mostrato un'inibizione totale della crescita del micelio.

Statisticamente la tesi a concentrazione 0.4% è simile alla tesi del controllo chimico perché inibisce parzialmente la crescita del patogeno, anche se non completamente.

Tesi	Diametro medio	p value <0,05
Controllo (H ₂ O)	49,5	c
Es Plus 0,2%	22,3	b
Es Plus 0,4%	10,7	ab
Ch (Rubin Plus)	0,0	a

Tabella 6: risultati ottenuti dalle misurazioni e analisi statistica delle prove in vitro al 3° giorno

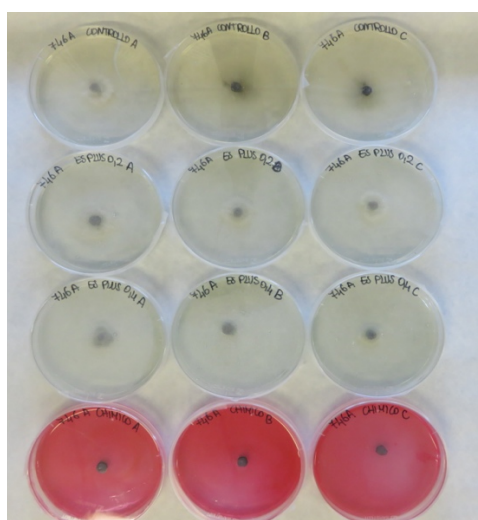


Figura 19: rilievo visivo al 3° giorno.

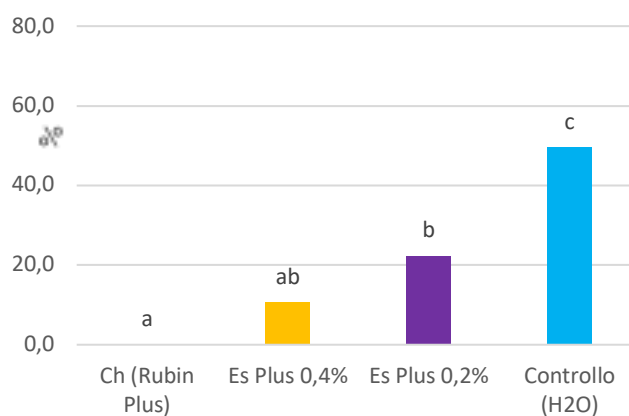


Grafico 8: andamento crescita patogeno (%)

Il rilievo al quinto giorno ha confermato l'andamento di crescita del patogeno precedentemente osservata (Tabella 7)

La tesi con ES PLUS a concentrazione 0.4% evidenzia una crescita del micelio del 18.7 %, mentre a concentrazione 0.2% del 38.3% (Grafico 9)

Prendendo in considerazione l'analisi statistica, le tesi al quinto giorno dall'allestimento mostrano crescite differenti.

Tesi	Diametro medio	p value <0,05
Controllo (H ₂ O)	78,0	d
Es Plus 0,2%	38,3	c
Es Plus 0,4%	18,7	b
Ch (Rubin Plus)	0,0	a

Tabella 7: risultati ottenuti dalle misurazioni e analisi statistica delle prove in vitro al 5° giorno

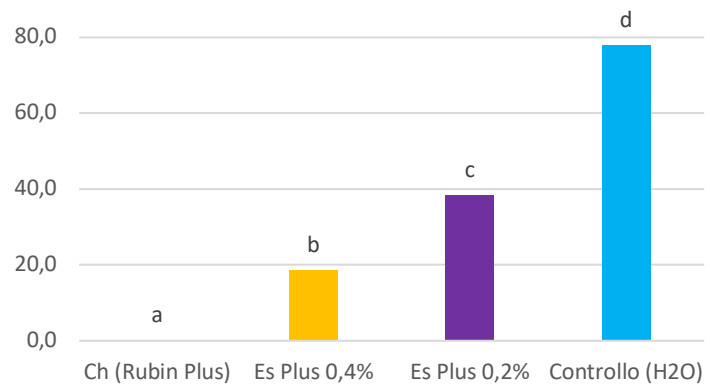
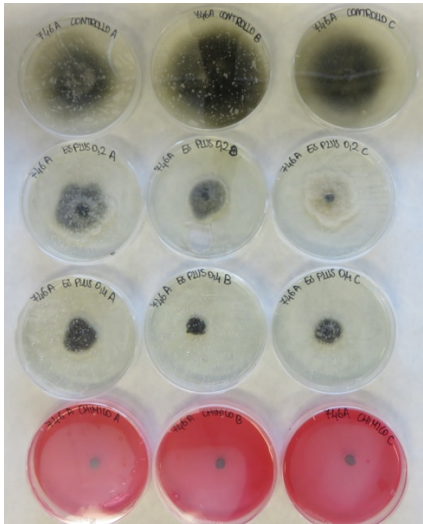


Figura 20: rilievo visivo al 5° giorno

Grafico 9: andamento crescita patogeno (%)

4.4 Prove di crescita *in vitro* del patogeno *Diplodia mutila*

Il rilievo dopo tre giorni di incubazione delle 25 piastre del ceppo P751 (*Diplodia mutila*) ha permesso di evidenziare una crescita del patogeno alla temperatura di 20°C di 40.7 mm, a T 25°C di 60.2 mm, a T 30°C di 36.9 mm ed a T 35°C di 5.6 mm. Alla temperatura di 5°C la colonia fungina non è cresciuta.

Vengono riportate le misurazioni relative alla crescita del patogeno su substrato agarizzato nei diversi rilievi svolti. Oltre a questi, sono presenti i risultati dell'analisi statistica.

Come possiamo notare dalla Tabella 8, la tesi a T 25°C è l'unica che statisticamente si distingue dalle altre tesi, mostrando i valori di diametro medio più elevati. La tesi a T 5°C non presenta differenze dalla tesi a T 35°C, come la tesi a T 20°C che risulta uguale alla tesi a T 30°C

Temperatura	Diametro medio	p value <0,05 DUCAN
5°C	0,0	a
20°C	40,7	b
25°C	60,2	c
30°C	36,9	b
35°C	5,6	a

Tabella 8: risultati ottenuti dalla misurazione e analisi statistica delle prove *in vitro* al 3° giorno

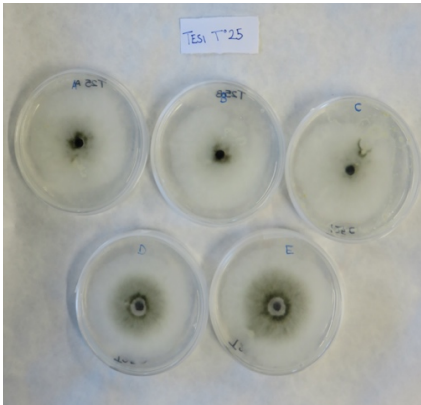


Figura 21: rilievo visivo al 3° giorno

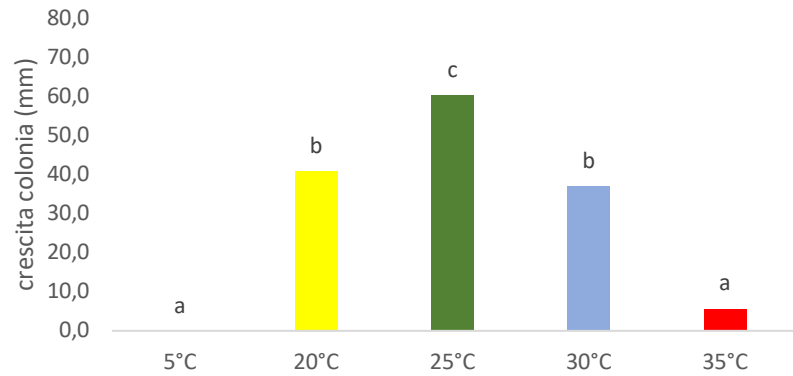


Grafico 10: andamento crescita patogeno (mm)

Il rilievo dopo 5 giorni dall'allestimento della prova ha mostrato risultati simili a quelli ottenuti in precedenza: la crescita del patogeno è avvenuta maggiormente a T 25°C con una crescita di 78 mm, seguita da T 20°C con il 66.3 mm, a T 30°C 45.8 mm e infine T 35°C con una crescita della colonia di 5.6 mm. Possiamo quindi affermare che la temperatura ottimale di crescita del patogeno *Diplodia mutila* si è registrata alla temperatura di 25°C.

Dall'analisi statistica (Tabella 9) possiamo notare come la tesi a T 5°C non presenti distinzioni dalla tesi a T 35°C. Al quinto giorno la tesi a T 20°C risulta statisticamente uguale alla tesi a T 30°C e simile alla tesi a T 25°C.

Temperatura	Diametro medio	p value <0,05 DUCAN
5°C	0,0	a
20°C	66,3	bc
25°C	78,0	c
30°C	45,8	b
35°C	5,6	a

Tabella 9: risultati ottenuti dalla misurazione e analisi statistica delle prove in vitro al 5° giorno

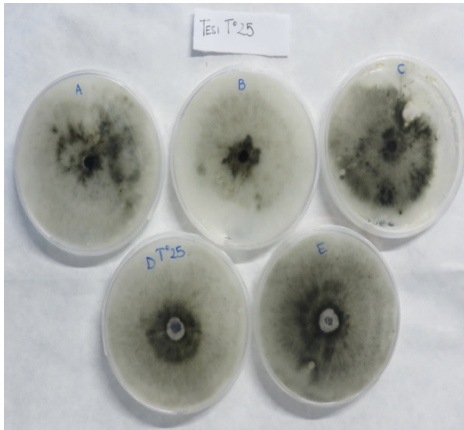


Figura 22: rilievo visivo al 5° giorno

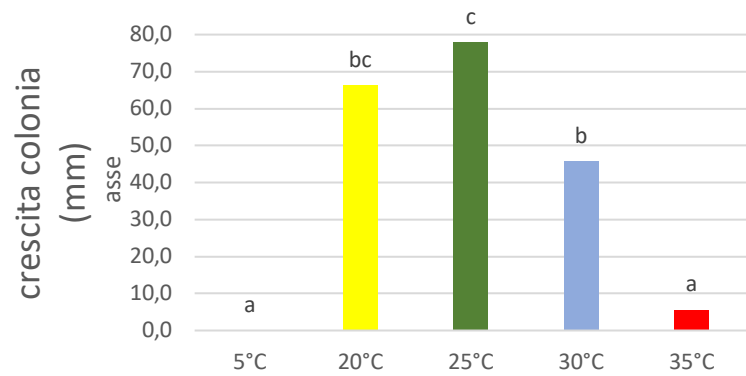


Grafico 11: andamento crescita patogeno (mm)

4.4 Analisi malattie virali

La corsa elettroforetica su gel di agarosio del prodotto RT-PCR, relativo ai campioni analizzati per i diversi virus, non ha individuato la presenza di nessun amplificato fatta eccezione dei controlli positivi, confermando così l'assenza di virus nei tessuti vegetali analizzati.

4.5 Trattamento in endoterapia

Dopo quattro giorni dal primo trattamento avvenuto il 2 luglio 2020 si è potuta notare la risposta da parte della pianta.

Come possiamo notare nella Figura 23, il cordone destro ha iniziato a mostrare foglie color bronzorame con evidenti reticolature necrotiche. Nei giorni successivi anche le foglie del cordone sinistro hanno iniziato a manifestare la stessa sintomatologia.



Figura 23: vite del Fantini 6 Luglio 2020 post trattamento



Figura 24: parte destro



Figura 25: parte sinistra

Per aiutare la pianta a rispondere più velocemente al problema verificatosi è stata effettuata un'irrigazione di soccorso scavando delle buche sulla collinetta ai lati del tronco dove è stata versata l'acqua (Figura 26)

Nel corso delle settimane successive il cordone destro ha perso di vigoria, le foglie hanno iniziato a ripiegarsi su se stesse per poi seccarsi e cadere. Col progredire della stagione i tralci hanno iniziato a seccarsi portando a morte e l'intero cordone che è stato perciò asportato.



Figura 26: buche laterali per irrigazione di soccorso.



Figura 27: Vite del Fantini 26 luglio 2020

Da fine luglio e durante il mese di agosto alcuni tralci del cordone sinistro hanno iniziato a seccarsi mentre altri hanno iniziato a vegetare producendo nuove foglie e lignificando adeguatamente a fine stagione.



Figura 28: Vite del Fantini 27 luglio 2020



Figura 29: Vite del Fantini 28 agosto 2020

Il 18 novembre è stato eseguito un secondo trattamento utilizzando il prodotto ES PLUS (0.2%).



Figura 30: Vite del Fantini 18 Novembre

Il 24 febbraio 2021 è stata effettuata la potatura invernale (Figura 31).



Figura 31: Potatura invernale 24 febbraio 2021

4. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di individuare la biodiversità fungina e virale all'interno dei campioni isolati dalla Vite centenaria del Fantini a seguito di un 'evidente presenza di sintomi quali perdita di vigoria, disseccamento dei tralci e dell'area fogliare.

Dalle analisi effettuate si è potuta riscontrare la presenza di vari patogeni nei diversi tessuti vegetali analizzati: *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ed *Epicoccum* spp. Questi cinque generi elencati sono stati riscontrati nei diversi campioni con una percentuale relativamente bassa, che va da 0,9 al 18%. Tali generi sono inoltre funghi principalmente saprofitici della vite, di conseguenza nelle successive indagini si è deciso di proseguire con le analisi molecolari su quei patogeni fungini presenti con un'incidenza % elevata, ma non riconoscibili a livello di genere e specie basandosi esclusivamente sui caratteri morfologici.

Dopo il sequenziamento del DNA, è stato possibile confermare la presenza di quattro patogeni fungini principale: *Diplodia mutila*, *Diplodia seriata*, *Fomitiporia mediterranea* e *Kalmusia variispora*.

Nello specifico dal primo isolamento, effettuato in data 3 luglio 2020 analizzando i trucioli, è stato possibile isolare il patogeno *D. seriata* con un'incidenza del 8%, mentre la specie *D. seriata* è stata riscontrata solo allo 0,9%. Tale risultato rimane congruente con quelli ottenuti dall'isolamento fatto nel 2019, dove il 94,3% dei campioni analizzati aveva mostrato la presenza dello stesso patogeno, ovvero *D. mutila*.

Nel secondo rilievo del 2020 effettuato a fine luglio, invece, sono stati due i generi fungini maggiormente isolati: *D. mutila* con il 23,8% e *F. mediterranea* con il 28,6%. Tale isolamento è stato effettuato sul cordone destro che maggiormente presentava sintomi di disseccamento e necrosi vascolare.

Il terzo rilievo, in data 7 agosto 2020, è stato effettuato dallo stesso cordone. Esso, ormai completamente secco, è stato asportato e successivamente analizzato. Anche in questo caso è stato possibile riscontrare una elevata presenza del patogeno *F. mediterranea* (40,6%).

Infine, l'ultimo rilievo (fine agosto 2020) ha permesso di isolare con il 75% d'incidenza il patogeno *K. variispora*.

Tali patogeni isolati dalla Vite del Fantini sono tutti associati o a malattie del legno o al Mal dell'esca (Morales *et al.*, 2012). Nello specifico, i patogeni *D. mutila* e *D. seriata* appartengono alla famiglia *Botryosphaeriaceae*, complesso di funghi responsabili della malattia del legno che causano la sindrome del deperimento. Sia *D. mutila* sia *D. seriata* sono stati associati alla *Botryosphaeria* Dieback in Cile (Díaz *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2012), malattia del legno responsabile della morte di parte delle piante, riducendo la produttività e la redditività della vite (Gubler *et al.*, 2010). In

esperimenti effettuati su piante axeniche, tronchi e germogli non hanno mostrato differenze di patogenicità tra *D. mutila* e *D. seriata* (Díaz *et al.*, 2013). Questi sono patogeni responsabili di malattie del legno che infettano principalmente il legno maturo attraverso potature o ferite. Nella forma più aggressiva causano il disseccamento dei tralci, riduzione dello sviluppo con una successiva morte mentre la forma meno aggressiva portano a una morte della pianta più lenta con un iniziale ritardo del germogliamento e dello sviluppo delle gemme, clorosi fogliare e disseccamento grappoli. *F. mediterranea* (FOMED) è uno dei tre agenti patogeni responsabili dell'esca propria.

È un basidiomicete che colonizza xilema e altri tessuti producendo tossine (eutipina), sostanze degradanti il legno (ligninasi), enzimi degradatori (laccasi). Produce corpi fruttiferi sulla corteccia delle branche di colore bruno cannella. Da questi si differenziano basidiospore che veicolate dal vento vengono a contatto con ferite di potatura. Le spore germinano e dopo la fusione di due miceli primari, formano un micelio che si insedia in vari tessuti tra cui il legno. Il fungo all'esterno della pianta forma i carpofori. Inoltre, nell'area centro-meridionale *F. mediterranea* prevale come principale patogeno associato al Mal dell'esca (Ciccarone *et al.*, 2004).

Il patogeno *K. variispora* è stato segnalato in bibliografia come responsabile delle malattie del legno in un'ampia area geografica in Iran (Farnaz Abed-Ashtiani *et al.*, 2019).

Per quanto riguarda invece le analisi virali effettuate sui diversi tessuti vegetali prelevati non è emersa la presenza di alcun virus suggerendo che il deperimento della Vite centenaria del Fantini sia associato esclusivamente alla presenza di patogeni fungini.

L'identificazione di questi quattro patogeni fungini associati al deperimento delle malattie del legno, dai vari campioni prelevati nel corso della stagione e, soprattutto la forte presenza di *F. mediterranea* e l'isolamento di *K. variispora* nei campioni di tessuti asintomatici evidenzia purtroppo la forte presenza del complesso mal dell'esca nella maggior parte della pianta, anche in quelle porzioni che alla vista non mostrano ancora segni evidenti di deperimento. Essendo tutti patogeni responsabili della sindrome del deperimento, i risultati ottenuti indicano che, in assenza di interventi, negli anni a venire i sintomi potrebbero presentarsi sempre più accentuati, portando al disseccamento dell'intera pianta.

Le prove *in vitro* hanno permesso di evidenziare l'efficacia dei prodotti RESOLV 5, FI PLUS ed ES PLUS contro il patogeno *D. mutila* mentre prove precedenti condotte sempre presso il DISTAL, hanno messo in evidenza l'efficacia degli stessi prodotti anche verso le principali specie fungine associate al Mal dell'esca.

Per questi motivi, nell'ambito del lavoro svolto sono stati effettuati due trattamenti in endoterapia a distanza di tre mesi uno dall'altro. Il primo trattamento, effettuato con il prodotto RESOLV 5, ha provocato un effetto indesiderato legato a un'intossicazione da rame. Ciò è probabilmente dovuto a

una errata formulazione del lotto di prodotto utilizzato in cui lo ione Cu^{++} era in concentrazioni troppo elevate. Malgrado questo effetto negativo il trattamento ha dimostrato che con il metodo di endoterapia utilizzato il prodotto viene velocemente traslocato e distribuito in tutta la pianta permettendo perciò di raggiungere eventuali patogeni presenti anche in tessuti non sintomatici. Nonostante ciò, una parte della vite (cordone destro) è andata incontro a disseccamento probabilmente in quanto troppo compromessa da infezioni fungine, come suggerito dagli isolamenti effettuati sui campioni prelevati il 7 agosto 2020.

Il secondo trattamento, è stato svolto in via precauzionale con il prodotto ES PLUS a concentrazione ridotta (0,5%) all'inizio del riposo vegetativo ma sarà necessario monitorare attentamente la pianta nel corso della prossima stagione vegetativa per valutarne l'efficacia e capire se c'è stato o meno un rallentamento dello sviluppo dei patogeni fungini.

In funzione dei rilievi che verranno effettuati durante la prossima stagione sarà necessario modulare le strategie, le modalità e le tempistiche di intervento al fine di cercare di salvare un patrimonio viticolo, storico, culturale e paesaggistico come quello rappresentato dalla Vite del Fantini.

5. BIBLIOGRAFIA

Abed-Ashtiani, Farnaz, Abolfazl Narmani, and Mahdi Arzanlou. "Analysis of *Kalmusia variispora* associated with grapevine decline in Iran." *European Journal of Plant Pathology* 154.3 (2019): 787-799.

Ciccarone, Claudio, et al. "Molecular analysis of *Fomitiporia mediterranea* isolates from esca-affected grapevines in southern Italy." *Phytopathologia Mediterranea* 43.2 (2004): 268-272.

Fischer, Michael. "A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales)." *Mycological Progress* 1.3 (2002): 315-324.

Fontana M., Filippetti I., Pastore C., Intrieri C. Indagine ampelografica e molecolare su vitigni locali dell'Emilia Romagna: primi risultati. Atti del I convegno Nazionale di Viticoltura, Ancona 21-23 Giugno 2006.

Fontana M., Filippetti I., Pastore C., Vespignani G., Intrieri C. "Individuazione e caratterizzazione di alcuni vitigni minori dell'Emilia". Atti convegno "I vitigni autoctoni minori: aspetti tecnici, normativi e commerciali", 2006

Pachioli Silverio "Avversità "poco note" nella viticoltura italiana" (2020).

Ramírez, Mauricio, Luz María Pérez, and Jaime Rolando Montealegre. "Susceptibility of different grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars to *Diplodia seriata* and *Diplodia mutila*." *International Journal of Agriculture and Natural Resources* 45.1 (2018): 93-98.

Reveglia, Pierluigi, et al. "Diploquinones A and B, two new phytotoxic tetrasubstituted 1, 4-naphthoquinones from *Diplodia mutila*, a causal agent of grapevine trunk disease." *Journal of agricultural and food chemistry* 66.45 (2018): 11968-11973.

6. SITOGRAFIA

1. Botryosphaeria dieback identification and management”. Disponibile al seguente link:
https://cdn.csu.edu.au/__data/assets/pdf_file/0004/455197/NWGIC-fs4-botdieback.pdf
(Ultimo accesso 22.02.2021).
2. “L’endoterapia”. Link:
<https://agricoltura.regione.emiliaromagna.it/fitosanitario/temi/avversita/schede/avversita-per-nome/cameraria/lendoterapia> Bibliografia
3. “La vite del Fantini” link:
https://www.bibliotecasalaborsa.it/cronologia/bologna/1965/la_vite_di_fantini
4. “Grapevine trunk disease” link: https://en.wikipedia.org/wiki/Grapevine_trunk_disease
5. “Le malattie del tronco, un’emergenza per la viticoltura mondiale” link:
<https://www.teatronaturale.it/strettamente-tecnico/mondo-enoico/21680-le-malattie-del-tronco-un-emergenza-per-la-viticultura-mondiale.htm>
6. “La vite del Fantini” Link: <https://www.podererioso.it/la-vite-del-fantini/>