

**PROGETTO DI RILEVAZIONE E QUANTIFICAZIONE PRECOCE DI  
PHAEOMONIELLA CHLAMYDOSPORA E SPECIE DI BOTRYOSPHAERIACEAE IN  
CAMPIONI DI LEGNO DI VITIS VINIFERA: PRIMI RISULTATI**

S. LENGYEL<sup>1</sup>, J. FISCHER<sup>1</sup>, E. THINES<sup>1</sup>, A. KUEHN<sup>2</sup>, R. ZITO<sup>2</sup>, R. E. GOLD<sup>2</sup>, M.  
VALENTE<sup>3</sup>, C. MURATORI<sup>3</sup>, C. ROMAGNOLI<sup>3</sup>, A. ZAPPATA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> IBWF gGmbH, Erwin-Schrödinger-Straße 56, D-67663 Kaiserslautern, Germany

<sup>2</sup> BASF SE, Agricultural Center, Speyerer Straße 2, D-67117 Limburgerhof, Germany

<sup>3</sup> BASF Italia S.p.A., C306-14, Via Marconato 8, 20811 Cesano Maderno (MI)

lengyel@ibwf.de; alessandro.zappata@basf.com

**RIASSUNTO**

*Phaeomoniella chlamydospora* (PCH) e le specie di *Botryosphaeriaceae* (BOT) sono tra i più importanti patogeni responsabili delle malattie del legno della vite (GTD), causando gravi perdite economiche nelle regioni vitivinicole di tutto il mondo. Il controllo e la gestione di queste malattie sono di difficile attuazione, dal momento che i sintomi si manifestano solo dopo un lungo periodo di latenza, quando il tessuto legnoso della pianta risulta già compromesso. Obiettivo del progetto in questione è stato quello di rilevare e quantificare i funghi responsabili delle malattie del legno attraverso l'identificazione del loro DNA in campioni di legno prelevati in campo prima della manifestazione visiva dei sintomi. Altro obiettivo è stato quello di valutare l'efficacia del prodotto Tessior<sup>®</sup>, sviluppato da BASF per la protezione delle ferite di potatura, in condizioni di pieno campo.

**Parole chiave:** malattie del legno, qPCR, Tessior

**SUMMARY**

EARLY DETECTION PROJECT FOR QUANTIFYING THE PRESENCE OF  
*PHAEOMONIELLA CHLAMYDOSPORA* AND SPECIES OF *BOTRYOSPHAERIACEAE* IN  
WOOD SAMPLES OF *VITIS VINIFERA*: FIRT RESULTS

*Phaeomoniella chlamydospora* (PCH), associated with esca disease, and *Botryosphaeriaceae* spp. (BOT), associated with dieback, are among the most important pathogens causing grapevine trunk diseases (GTDs) and related severe economic losses in wine-growing regions all over the world. The control and management of these diseases are challenging, since the relevant visible symptoms occur mostly after a long latency period, when the wood is already compromised. The aims of this project were to detect and quantify the pathogenic fungi via their DNA in wood samples before symptoms appear and to evaluate the efficacy of the BASF wound protectant Tessior<sup>®</sup> under field conditions.

**Keywords:** grapevine trunk diseases, qPCR, Tessior

**INTRODUZIONE**

Le malattie del legno della vite (GTD) sono attualmente le malattie più distruttive e in rapida crescita sulle piante di vite. I sintomi correlati variano dalle necrosi e alterazioni del colore nel tessuto fogliare internervale alla crescita stentata e declino generale della pianta, dalla necrosi settoriale o centrale del legno del tronco fino alla apoplessia, mentre la qualità e la quantità delle uve e quindi la produzione di vino sono ridotte causando enormi perdite economiche nella viticoltura delle regioni di tutto il mondo. La gestione della malattia è impegnativa per i viticoltori, poiché i primi sintomi si verificano principalmente dopo un lungo periodo di latenza, quando il legno è già compromesso. Per questo motivo è importante stabilire un metodo accurato per rilevare la contaminazione precoce nelle piante.

Fino ad oggi l'isolamento tradizionale è stata la tecnica più utilizzata per rilevare i funghi nei tessuti delle piante, anche se non sempre molto accurata, poiché soggetta ad inquinamenti di altri agenti patogeni o da funghi saprofiti che invadono i tessuti del legno rendendo difficile la classificazione. L'identificazione dei funghi unicamente tramite i loro aspetti morfologici non è sempre sufficiente e spesso sono necessarie ulteriori analisi utilizzando strumenti molecolari. La PCR quantitativa in tempo reale (qPCR) è stata utilizzata come ulteriore possibilità per rilevare e quantificare i patogeni del legno come *Phaeoconiella chlamydospora* e *Phaeoacremonium minimum* (syn. *aleophilum*) (Martín et al., 2012; Pouzoulet et al., 2013), *Eutypa lata* (Moisy et al., 2017; Pouzoulet et al., 2017) e *Diplodia* spp. (Pouzoulet et al., 2017) usando la tecnologia Verde SYBR e TaqMan. Studi hanno dimostrato l'efficacia di questo metodo su viti e talee per lo più innestate ed utilizzate come materiale vegetale per la sperimentazione. Pouzoulet et al. (2017) hanno raccolto campioni da speroni di vite infette sia naturalmente sia artificialmente e li hanno analizzati per mezzo di qPCR utilizzando la tecnologia 'Master Mix Verde SYBR' e una coppia di *primer* per amplificare il gene  $\beta$ -tubulina di tre diversi ceppi di *Diplodia seriata*. Tuttavia, almeno 21 diverse specie di *Botryosphaeriaceae* (BOT) possono infettare le piante di vite in tutto il mondo (Úrbez-Torres, 2011) e quest'ultimo fattore è stato preso in considerazione in un recente lavoro finalizzato alla designazione dei *primer* per la rilevazione di questi funghi nell'ambiente (Billones-Baaijens et al., 2018).

Nell'ambito delle ricerche per mettere a punto metodi per limitare le infezioni da parte di questi patogeni, BASF ha sviluppato un innovativo prodotto per la protezione delle ferite da potatura, che è altamente efficace nel ridurre le nuove infezioni da GTD tramite tali ingressi. Questo prodotto combina componenti fisici e chimici nella sua formulazione: l'attività fisica è assicurata da un polimero che solidifica dopo essere stato applicato sulla superficie della ferita, mentre l'attività chimica è assicurata da due fungicidi BASF ad ampio spettro, quali pyraclostrobin e boscalid.

Per valutare in condizioni di campo l'efficacia della protezione delle ferite da parte del prodotto BASF denominato Tessior® si è messo a punto un progetto per la rilevazione precoce dei patogeni. Ci si sono così posti più obiettivi: sviluppare una tecnica efficiente per ottenere campioni di legno da piante di vite; elaborare un protocollo di estrazione del DNA; stabilire un metodo qPCR per rilevare PCH e BOT nei campioni di vite.

Il metodo sperimentale è stato sviluppato utilizzando campioni raccolti da piante di vite che mostravano sintomi tipici di esca fogliare ("foglie tigrate") di diversa entità. Confrontando la gravità dei sintomi visibili su foglia con i risultati ottenuti dalla qPCR, è stata riscontrata una chiara correlazione: più la pianta appariva sintomatica, maggiori erano le quantità di DNA di PCH e BOT rilevate nei campioni. Tra il 2014 e il 2015 sono state avviate prove di campo a lungo termine in diversi paesi europei, al fine di valutare l'efficacia di Tessior applicato dopo la potatura in confronto a tesi non trattate. In alcuni casi, al fine di aumentare la pressione infettiva, le parcelle, trattate e non trattate, sono state inoculate artificialmente con spore di PCH e BOT di anno in anno dopo la potatura. Nel 2018, i campioni sono stati raccolti dagli speroni sotto le ferite di potatura dell'anno precedente e le quantità di DNA di PCH e BOT sono state determinate tramite qPCR. Il metodo sopra descritto ha dimostrato di essere rapido e accurato per rilevare e valutare le quantità di DNA di PCH e BOT nel legno di vite.

## MATERIALI E METODI

### Messa a punto del metodo di rilevazione precoce

#### *Valutazioni preliminari sul metodo di campionamento*

Nel 2018, da un vigneto a Forst in Germania che viene monitorato per la presenza di malattia del legno sin dal 2016, cinque ceppi di vite sono stati rimossi in quanto presentanti sintomi correlati alle malattie del legno della vite. Sulla base della gravità dei sintomi, principalmente "foglie tigrate", queste viti sono state classificate da 0 (pianta senza sintomi) a 4 (pianta apoplettica). In laboratorio sono stati prelevati campioni di legno da diversi punti dei ceppi usando una punta di trapano da 5 mm di diametro.

#### *Estrazione del DNA e controllo quali-quantitativo*

Il protocollo di estrazione del DNA è stato ottimizzato per i tessuti di legno utilizzando il kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel) con il tampone PL2 basato su SDS. La concentrazione del DNA dei campioni è stata misurata con il fluorometro Qubit™ 4 (Invitrogen). Al fine di ottenere un DNA di qualità adeguata per ulteriori analisi, il gene della vite 18S rRNA è stato amplificato.

#### *Definizione del primer e qPCR*

I primer e la sonda sono stati definiti *ex novo* per rilevare e quantificare PCH tramite tecnica TaqMan. Invece, per rilevare le specie BOT, sono stati utilizzati primer precedentemente messi a punto e riportati in bibliografia (Billones-Baaijens et al., 2018) con una nuova sonda TaqMan. La qPCR è stata condotta tramite iTaq™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc.) utilizzando un C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.). I dati sono stati analizzati tramite software Bio-Rad CFX Manager™ (Versione 3.1).

#### **Quantificazione assoluta usando il metodo della curva standard**

Il DNA è stato estratto da colture pure di PCH (ceppo CBS 101571) e BOT (ceppo DLR BOT41, gentilmente fornito dal Dr. Andreas Kortekamp) utilizzando il kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). Le curve standard sono state generate utilizzando una serie di diluizioni di 10 volte per entrambi i DNA fungini fino a tracciare i valori di quantificazione del ciclo (Cq) rispetto al fattore di diluizione in un grafico semi-logaritmico a base 10. Questi grafici sono stati quindi utilizzati per estrapolare la concentrazione dei funghi bersaglio nel modello di DNA.

### **Valutazione delle infezioni nei vigneti oggetto di prove di efficacia in campo.**

#### *Protezione delle ferite in campo*

A partire dal 2014 sono state avviate prove in campo a lungo termine in Germania, Francia, Grecia, Italia e Spagna. Il trattamento con Tessior è stato eseguito ogni anno in una parte del vigneto dopo la potatura (e una parte è stata lasciata non protetta come controllo). Al fine di aumentare la pressione d'infezione, le ferite da potatura sono state inoculate con spore di PCH e BOT iniziando questa procedura a partire da due o da tre anni dall'impianto.

#### *Raccolta dei campioni*

Nei vigneti dove sono state eseguite le prove per la protezione delle ferite di potatura sono stati valutati due metodi di raccolta dei campioni in base al vigore delle piante. Nel 2018 sono stati prelevati campioni di legno da speroni potati utilizzando una punta di trapano da 5 mm di diametro. I campioni sono stati raccolti su un foglio di alluminio, collocati in un sacchetto di

plastica e quindi conservati a -20 °C. Solo nel caso di viti giovani o non particolarmente vigorose, si è proceduto al taglio di 2 cm di legno dall'estremità di un tralcio potato. Successivamente, il foro di prelevamento è stato chiuso con un sigillante per ferite per prevenire ulteriori infezioni. I campioni di legno sono stati liofilizzati per 24 ore, quindi omogeneizzati con l'attrezzatura TissueLyser II (Qiagen). La quantità di DNA fungino nei campioni è stata determinata attraverso qPCR come descritto di seguito.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### **Messa a punto del metodo**

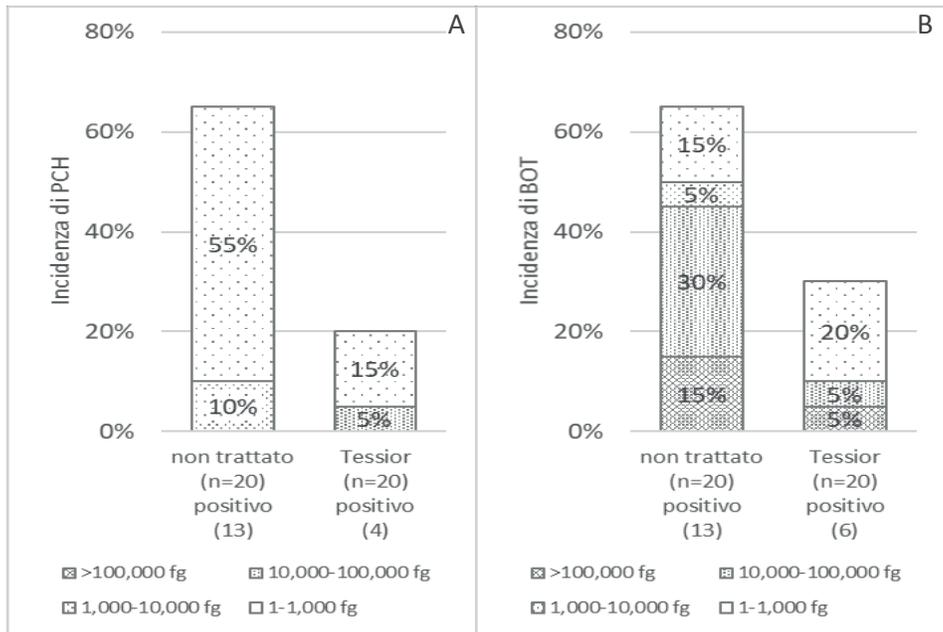
I campioni di DNA estratti e raccolti da piante di vite nel vigneto di Forst in Germania sono stati analizzati per mettere a punto il metodo e definire la quantità di DNA di PCH e BOT individuabile nelle piante tramite qPCR utilizzando sonde TaqMan.

La metodologia sviluppata per la raccolta dei campioni prevedeva la perforazione delle piante di vite sul tronco con una punta di trapano da 5 mm di diametro ed il prelievo di tessuti legnosi sotto forma di trucioli. Un metodo alternativo, che prevedeva il taglio della parte terminale degli speroni potati, è stato preso in considerazione in presenza di piante non particolarmente vigorose. Il protocollo di estrazione del DNA è stato ottimizzato per i tessuti di legno della vite utilizzando il kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel), mentre la tecnica qPCR per rilevare e quantificare PCH e BOT nei campioni di vite è stata elaborata usando la tecnologia TaqMan. Una volta messo a punto il metodo per l'estrazione del DNA e per la tecnica qPCR, le piante di vite sono state scelte in base alla gravità dei loro sintomi, ovvero presenza di "foglie tigrate" associate al complesso del mal dell'esca. Comparando questi sintomi con i risultati ottenuti da qPCR è stata osservata una chiara correlazione: più sintomatica era la pianta, maggiore era la quantità di DNA di PCH misurata nei campioni. Una grande quantità di DNA di BOT è stata rilevata solo nelle piante morte. Sulla base di questi campioni sono stati definiti diversi livelli di infezione in funzione della quantità di DNA fungino in 1 nanogrammo (ng) di DNA totale: oltre 100000 fentogrammi (fg) - tessuto morto, 10000-100000 fg - infezione abbondante, 1000-10000 fg - infezione moderata, fino a 1000 fg - presenza del fungo.

### **Valutazione dell'efficacia della protezione nel vigneto di Merville (Francia)**

Il vigneto è stato impiantato nel 2015 ed ogni anno è stato eseguito un trattamento con Tessior dopo la potatura. I campioni di legno sono stati prelevati da speroni potati nel 2017. Dopo l'estrazione totale del DNA, la quantità di DNA di PCH e BOT è stata quantificata nei campioni attraverso qPCR. È stata osservata la differenza nella quantità di DNA di PCH tra i campioni non trattati e quelli trattati con Tessior (figura 1A); tuttavia, i campioni positivi presentavano una bassa quantità di DNA fungino. Tredici dei venti campioni non trattati analizzati hanno mostrato infezione da PCH, così come quattro campioni dei venti trattati con Tessior. Anche nel caso di BOT il numero di campioni trattati con Tessior risultati infetti è molto ridotto rispetto ai campioni non trattati (figura 1B). Per quanto riguarda i risultati relativi a PCH e BOT, l'effetto di Tessior è evidente: il numero di piante infette è stato ridotto del 55-70%. Anche l'intensità della colonizzazione risultava molto più bassa nei campioni positivi raccolti nelle parcelle trattate con Tessior rispetto ai campioni positivi prelevati nelle parcelle non trattate.

Figura 1. Frequenze di rilevazione di *Phaeomoniella chlamydospora* (PCH) (A) e *Botryosphaeriaceae* (BOT) (B) in campioni di legno di vite. Nel 2018, sono stati raccolti campioni da piante non trattate e trattate con Tessior a Merville (Francia). La quantità di DNA fungino per ng di DNA totale è stata determinata in fg tramite qPCR



### Valutazione dell'efficacia della protezione nel vigneto di Firenze (Italia)

L'impianto è stato eseguito nel 2014 e diviso in parcelloni: 1, trattato ogni anno con Tessior dopo la potatura ed inoculato; 2, trattato con un prodotto per la protezione delle ferite a base di *Trichoderma* ed inoculato; 3, non trattato ed inoculato; 4, non trattato e non inoculato. I parcelloni che prevedevano le inoculazioni sono stati inoculati con spore di PCH ogni anno a partire dal 2016. Considerato lo scarso vigore delle giovani piante, tipico di terreni poveri del Chianti, per evitare di distruggere i ceppi durante il campionamento con il trapano, i campioni sono stati raccolti tagliando la parte terminale degli speroni potati nel 2017. Anche in questo caso i risultati hanno confermato le aspettative: il numero di piante infette da PCH e BOT nella tesi trattata con Tessior è stato ridotto rispettivamente del 100% e del 78%, in confronto alle piante inoculate non trattate e a quelle non inoculate e non trattate (figura 2). È interessante notare che non vi era differenza tra il numero di campioni positivi non trattati e non inoculati (naturalmente infetti) e quelli positivi fra i campioni non trattati e inoculati con PCH (artificialmente infetti), mentre è stata osservata una variazione nella quantità del DNA di PCH rilevato. Infezione da BOT è stata rilevata in nove campioni non inoculati non trattati, ma solo in tre piante trattate e inoculate con PCH. È stato riscontrato che solo due campioni trattati con Tessior sono stati infettati da BOT, mentre tra quelli trattati con *Trichoderma* ne sono risultati infetti sette.

Figura 2. Frequenze di rilevazione di *Phaeomoniella chlamydospora* (PCH) (A) e Botryosphaeriaceae (BOT) (B) in campioni di legno di vite. Nel 2018, sono stati raccolti campioni da piante non trattate e trattate con Tessior o con un prodotto biologico a Firenze (Italia). Nel 2017, una inoculazione artificiale è stata eseguita dopo il trattamento con spore di PCH. La quantità di DNA fungino per ng di DNA totale è stata determinata in fg tramite qPCR



## CONCLUSIONI

La metodologia messa a punto per la rilevazione e quantificazione precoce di specie fungine responsabili delle malattie del legno della vite applicata in prove di campo è risultata efficace per raggiungere gli obiettivi prefissati. I livelli di infezione di PCH e BOT sono stati confrontati in campioni di vite provenienti da blocchi non trattati e trattati con Tessior; l'efficacia di quest'ultimo è stata verificata in condizioni di campo a Merville (Francia) e Firenze ed è stato dimostrato che il metodo qPCR che utilizza le sonde TaqMan è una tecnica rapida e accurata per quantificare le quantità di DNA di PCH e BOT nel legno della vite. Grazie a tale metodo, è stata anche verificata l'efficacia del prodotto Tessior nel proteggere le ferite di potatura. Altre indagini, nell'ambito di questo progetto, sono tuttora in corso per analizzare i campioni raccolti da più vigneti in Europa.

## LAVORI CITATI

- Billones-Baaijens R., Úrbez-Torres J. R., Liu M., Ayres M., Sosnowski M., Savocchia S., 2018. Molecular methods to detect and quantify Botryosphaeriaceae inocula associated with grapevine dieback in Australia. *Plant Disease*, 102(8), 1489-1499.
- Martín M.T., Cobos R., Martín L., López-Enríquez L., 2012. Real-time PCR detection of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Applied and environmental microbiology*, 78(11), 3985-3991.
- Moisy C., Berger G., Flutre T., Le Cunff L., Péros J. P., 2017. Quantitative Assessment of Grapevine Wood Colonization by the Dieback Fungus *Eutypa lata*. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 3(2), 21.
- Pouzoulet J., Mailhac N., Couderc C., Besson X., Daydé J., Lummerzheim M., Jacques A., 2013. A method to detect and quantify *Phaeoacremonium chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* DNA in grapevine-wood samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(23), 10163-10175.
- Pouzoulet J., Rolshausen P. E., Schiavon M., Bol S., Travadon R., Lawrence D. P., Jacques A., 2017. A method to detect and quantify *Eutypa lata* and *Diplodia seriata*-complex DNA in grapevine pruning wounds. *Plant Disease*, 101(8), 1470-1480.
- Úrbez-Torres J. R., 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(SUPPL.), S5-S45.

