

## DINAMICA DI POPOLAZIONI DI *BOTRYOTINIA FUCKELIANA* CARATTERIZZATE PER LA PRESENZA/ASSENZA DI ELEMENTI TRASPONIBILI SU VITE

C. ROTOLO, W. HABIB, R.M. DE MICCOLIS ANGELINI, S. POLLASTRO, F. FARETRA  
Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia applicata, Università degli Studi di  
Bari - Via Amendola, 165/A, 70126 Bari  
faretra@agr.uniba.it

### RIASSUNTO

*Botryotinia fuckeliana* Whetzel (teleomorfo di *Botrytis cinerea*) è responsabile della muffa grigia su oltre 200 specie vegetali inclusa la vite. Due popolazioni simpatriche del fungo sono state distinte sulla base della presenza/assenza nel genoma del fungo di due elementi trasponibili, *Boty* e *Flipper*, risposta a fungicidi e altri marcatori molecolari. Nel presente lavoro è stata presa in esame l'evoluzione in campo delle sub-popolazioni *transposa* (*Boty*<sup>+</sup>*Flipper*<sup>+</sup>; *Boty*<sup>+</sup>*Flipper*<sup>-</sup>; *Boty*<sup>-</sup>*Flipper*<sup>+</sup>) e *vacuma* (*Boty*<sup>-</sup>*Flipper*<sup>-</sup>) nel corso del ciclo vegetativo della vite e la loro eventuale relazione con la resistenza a fungicidi. Dalla fioritura alla maturazione è stata osservata una variazione del rapporto tra le due sub-popolazioni a favore degli isolati *transposa*. Questi, inoltre, erano più spesso resistenti a uno o più fungicidi mentre gli isolati *vacuma* hanno mostrato più frequentemente il fenotipo sensibile "selvatico".

**Parole chiave:** *Botrytis cinerea*, muffa grigia, trasposoni, resistenza a fungicidi

### SUMMARY

#### DYNAMICS OF *BOTRYOTINIA FUCKELIANA* POPULATIONS CHARACTERIZED FOR THE PRESENCE/ABSENCE OF TRANSPONABLE ELEMENTS ON GRAPEVINE

*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (anamorph: *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.) is the causal agent of grey mould on a wide range of plants including grapevine. Two coexisting sympatric populations of the fungus, characterized for the presence/absence of two transposable elements (TE), *Boty* and *Flipper*, response to fungicides and other molecular markers have been recently distinguished. The dynamics in the field of the sub-populations *transposa* (*Boty*<sup>+</sup>*Flipper*<sup>+</sup>; *Boty*<sup>+</sup>*Flipper*<sup>-</sup>; *Boty*<sup>-</sup>*Flipper*<sup>+</sup>) and *vacuma* (*Boty*<sup>-</sup>*Flipper*<sup>-</sup>) during grapevine-growing season and their relationship with fungicide resistance was investigated. A variation of the ratio between the two sub-populations was observed from blossoming to ripening when *transposa* isolates became prevalent. *Transposa* isolates were more often resistant to at least one of the tested fungicides, while *vacuma* isolates showed more frequently the sensitive "wild-type" phenotype.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*, grey mould, transposons, fungicide resistance

### INTRODUZIONE

*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (teleomorfo di *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.) è un fungo ubiquitario e polifago in grado di infettare un numero elevato di differenti specie vegetali, sulle quali causa la malattia nota come muffa grigia. Alterna vita saprofitaria a comportamenti parassitario o emiparassitario. La capacità di tollerare anche le basse temperature degli ambienti refrigerati lo rende anche uno dei principali agenti di malattia in post-raccolta.

Il fungo è caratterizzato da un'elevata variabilità ed un'estrema adattabilità (Grindle, 1981) che condizionano fortemente le strategie di protezione. Con relativa facilità, infatti, il fungo differenzia resistenza a fungicidi, che può compromettere l'efficacia dei trattamenti

(Georgopoulos, 1977; Santomauro *et al.*, 1997). Tra le fonti di variabilità, oltre all'eterocariosi (Hansen e Smith, 1932), presenza di dsRNA e particelle virus-simili, la presenza/assenza dei due elementi trasponibili (TE), *Boty* e *Flipper*, potrebbe rivestire un ruolo rilevante (Daboussi, 1997; Diolez *et al.*, 1995; Levis *et al.*, 1997). Gli isolati di *B. fuckeliana* con entrambi o uno dei due TE (*transposa*) e gli isolati che ne sono privi (*vacuma*) coesistono, in proporzioni variabili, sulle diverse piante ospiti e sui diversi organi (Giraud *et al.*, 1999; De Miccolis Angelini *et al.*, 2003).

Per valutare l'influenza dei programmi di protezione sulla dinamica delle due subpopolazioni del patogeno, *vacuma* e *transposa*, sono stati caratterizzati numerosi isolati ottenuti da infezioni naturali in diversi vigneti pugliesi sottoposti a differenti trattamenti.

## MATERIALI E METODI

Gli isolati monoconidici di *B. fuckeliana* sono stati ottenuti da campioni di foglie, germogli e bacche naturalmente infetti raccolti in 8 vigneti di uva da tavola (cv Italia o Regina) allevati a tendone, in tre differenti epoche fenologiche (fioritura-allegagione, invaiatura-inizio maturazione e maturazione). In particolare, nel periodo compreso fra maggio e giugno 2004, in ciascuno degli 8 vigneti sono stati prelevati tra 30 e 70 campioni di foglie e germogli con sintomi di marciume al verde. Tra agosto e settembre è stato eseguito un secondo campionamento di singole bacche marcescenti e in 5 vigneti coperti con polietilene per ritardare la maturazione è stato possibile effettuare un terzo campionamento tra ottobre e novembre, che ha riguardato esclusivamente bacche mature marcescenti.

Gli isolati resistenti sono stati discriminati da quelli sensibili per la loro capacità di originare colonie su idonei substrati agarizzati tal quali o contenenti i seguenti fungicidi: 10 µg/ml benomyl (benzimidazolico), 5 µg/ml vinclozolin (dicarbossimidico), 1 µg/ml pyrimethanil (anilino pirimidina), 3 µg/ml fenhexamid (idrossianilide) o 0,3 µg/ml fludioxonil (fenilpirrolo). Tutti i composti sono stati impiegati in forma di prodotti tecnici, tranne fenhexamid (Teldor, 50% p.a.).

Per valutare la presenza/assenza degli elementi trasponibili, dal micelio di 30 isolati per ciascuna delle popolazioni presenti negli 8 vigneti è stato estratto il DNA, che successivamente è stato impiegato in reazioni di amplificazione genica (PCR) con coppie di primer specifiche per i due trasposoni. Come controllo positivo è stato utilizzato DNA di 4 isolati di riferimento previamente caratterizzati. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati su gel di agarosio dopo corsa elettroforetica. La presenza/assenza di ampliconi di dimensioni pari a 970 e 1.250 bp, corrispondenti alle porzioni delle sequenze amplificate con i primer specifici per *Boty* e *Flipper*, rispettivamente, ha permesso di caratterizzare gli isolati.

## RISULTATI

Oltre il 65% degli isolati saggiati ha mostrato di portare entrambi i trasposoni (*Boty*<sup>+</sup>*Flipper*<sup>+</sup>), mentre decisamente più modesta (15%) è stata la frequenza di isolati *vacuma* (*Boty*<sup>-</sup>*Flipper*<sup>-</sup>). Il 17% degli isolati è risultato *Boty*<sup>+</sup>*Flipper*<sup>-</sup> e solo occasionalmente è stato rinvenuto il biotipo *Boty*<sup>-</sup>*Flipper*<sup>+</sup> (figura 1).

La composizione delle popolazioni presenti sulla vegetazione nella tarda primavera, sulle bacche nelle fasi dalla invaiatura alla maturazione nel periodo estivo e sulle bacche mature in autunno è stata differente evidenziando fluttuazioni nel tempo dei biotipi.

La popolazione *Boty*<sup>+</sup>*Flipper*<sup>+</sup>, pari al 51% su foglie e germogli, è incrementata sino all'80% sui grappoli maturi (III campionamento). Inverso è stato il comportamento della popolazione *Boty*<sup>-</sup>*Flipper*<sup>-</sup> che, dal 23% rilevato su foglie e/o germogli, è progressivamente diminuita sui grappoli dal 12% (II campionamento) al 6% (III campionamento). Un andamento molto simile

è stato mostrato dagli isolati *Boty*<sup>+</sup>*Flipper*<sup>-</sup> mentre quelli *Boty*<sup>-</sup>*Flipper*<sup>+</sup>, presenti nella misura del 2% circa sulla vegetazione o sulle bacche al momento dell'invasiatura, non sono stati mai rinvenuti su bacche mature (figura 2).

Figura 1. Percentuale media di rinvenimento dei diversi biotipi di *B. fuckeliana*

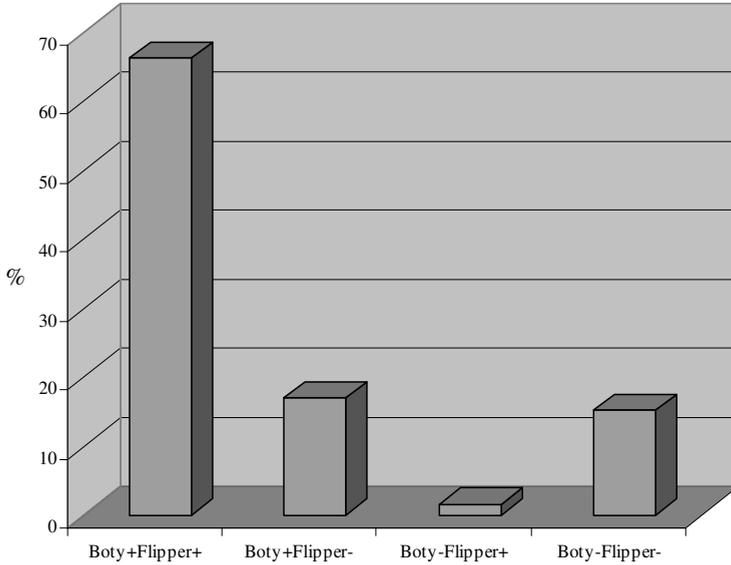
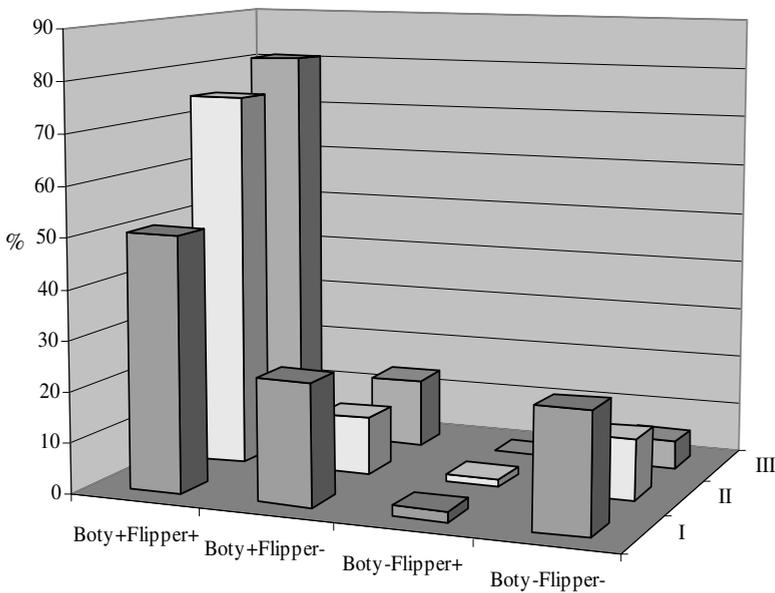


Figura 2. Percentuale media di rinvenimento dei vari biotipi di *B. fuckeliana* su foglie e/o germogli in maggio-giugno (I) e su bacche in agosto-settembre (II) o ottobre-novembre (III)



La risposta a fungicidi è stata determinata su isolati rappresentativi delle popolazioni insediate in 8 vigneti di uva da tavola in differenti epoche fenologiche (figura 3). Al momento del I campionamento (tarda primavera), in nessuna azienda erano stati applicati fungicidi antibotritici, mentre un numero variabile fra 2 e 5 trattamenti antibotritici era stato eseguito prima dei campionamenti successivi (II e III, sui grappoli). In media, il 75% degli isolati complessivamente caratterizzati si è mostrato normalmente sensibile a tutti i fungicidi analizzati (fenotipo “wild type”). In particolare, tale fenotipo caratterizzava il 78% della popolazione di *B. fuckeliana* presente sulla vegetazione in maggio-giugno, il 76% di quella presente in agosto-settembre e il 62% di quella presente nel vigneto in ottobre-novembre. Le restanti frazioni erano rappresentate da isolati resistenti ad almeno uno dei fungicidi saggiati. Nello specifico, isolati resistenti ai benzimidazolici costituivano in media il 13, 17 e 20% della popolazione in occasione dei campionamenti I, II e III, nell'ordine, con valori compresi tra poco più del 3% e l'82%. La resistenza ai dicarbossimidici ha interessato il 13% degli isolati complessivamente caratterizzati; nullo o molto raro è stato, invece, il rinvenimento di isolati resistenti a fenhexamid o fludioxonil.

La resistenza alle anilinopirimidine è stata rilevata in 6 degli 8 vigneti indagati. Nel complesso, la frazione di isolati resistenti a questi fungicidi è stata pari al 4% nelle popolazioni di *B. fuckeliana* responsabili di infezioni precoci ed è incrementata di oltre 5 volte in ottobre-novembre, rappresentando in media il 21% degli isolati saggiati.

Nonostante la resistenza si sia spesso manifestata nei confronti di uno solo dei fungicidi saggiati, non è stato raro il rinvenimento di isolati con resistenza verso due o tre classi di fungicidi (figura 4).

Figura 3. Percentuale media di rinvenimento di isolati di *B. fuckeliana* sensibili (S) o resistenti a benomyl (Ben), vinclozolin (Vin), fludioxonil (Flud), e pyrimethanil (Pyr), su foglie e/o germogli in maggio-giugno (I), su bacche in agosto-settembre (II) o ottobre-novembre (III)

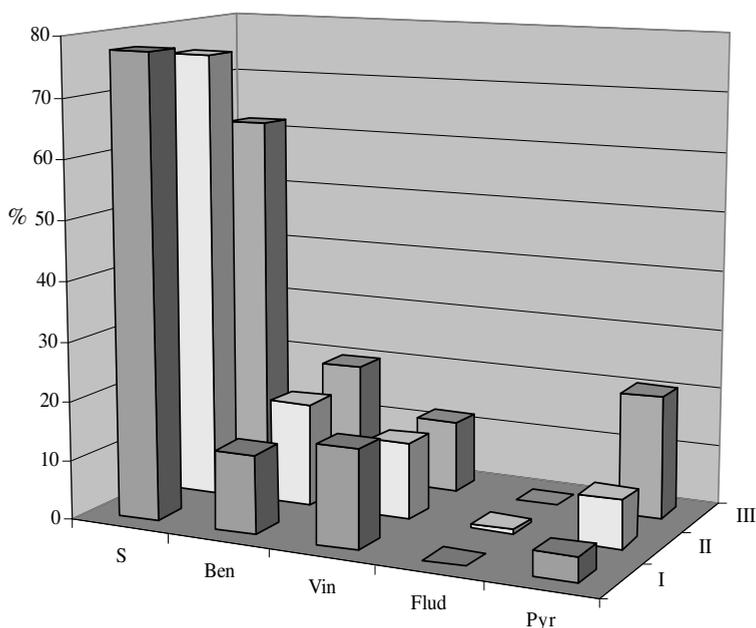
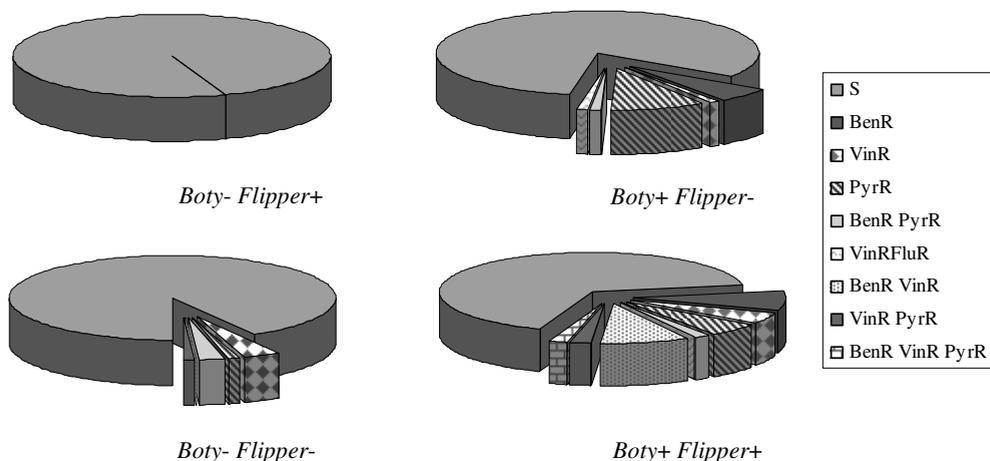


Figura 4. Percentuale di rinvenimento dei vari fenotipi di sensibilità (S)/resistenza (R) ai diversi fungicidi saggiati, in ciascuna delle sub-popolazioni di *B. fuckeliana* distinte per la presenza (+)/assenza (-) dei trasposoni *Boty* e *Flipper*



In relazione alla presenza/assenza di TE, il 95% degli isolati resistenti ad almeno un gruppo di fungicidi è risultato di tipo *transposa* (81% *Boty<sup>+</sup>Flipper<sup>+</sup>* e 14% *Boty<sup>+</sup>Flipper<sup>-</sup>*), mentre il restante 5% era *Boty<sup>-</sup>Flipper<sup>-</sup>*. Il 92% degli isolati *vacuma* (*Boty<sup>-</sup>Flipper<sup>-</sup>*) è risultato sensibile a tutti i fungicidi saggiati. Isolati *vacuma* con resistenza singola solo verso i dicarbossimidici, o doppia, verso dicarbossimidici e benzimidazolici o dicarbossimidici e anilino pirimidine, sono stati rinvenuti esclusivamente su foglie e germogli in tarda primavera. In occasione del III campionamento solo un isolato associava l'assenza degli elementi trasponibili alla resistenza a pyrimethanil. Nell'ambito della popolazione *transposa*, la percentuale di isolati sensibili è stata pari a 67 e 82%, rispettivamente per i tipi *Boty<sup>+</sup>Flipper<sup>+</sup>* e *Boty<sup>+</sup>Flipper<sup>-</sup>*, mentre i 5 isolati *Boty<sup>-</sup>Flipper<sup>+</sup>* erano normalmente sensibili (figura 4). Isolati *transposa* resistenti sono stati rinvenuti in tutti i vigneti; la frequenza di rinvenimento, pressoché simile al momento dei primi due campionamenti, è considerevolmente incrementata ad ottobre-novembre.

## CONCLUSIONI

La composizione delle popolazioni presenti sulla vegetazione (tarda primavera) e sulle bacche nelle fasi di invaiatura/maturazione (estate) e maturazione (autunno) ha confermato una modificazione nel tempo della frequenza dei biotipi. La proporzione di isolati *Boty<sup>+</sup>Flipper<sup>+</sup>* è andata incrementando nel corso del ciclo vegetativo, mentre è stato inverso il comportamento degli isolati *Boty<sup>-</sup>Flipper<sup>-</sup>*, *Boty<sup>+</sup>Flipper<sup>-</sup>* e dei rari *Boty<sup>-</sup>Flipper<sup>+</sup>*.

Le motivazioni alla base di tali fluttuazioni temporali non sono chiare. I fattori responsabili possono essere molteplici, come una ridotta capacità competitiva degli isolati privi di trasposoni rispetto a quelli che ne sono dotati. Ciò potrebbe essere in relazione con le variazioni in temperatura ed umidità relativa che si verificano durante il ciclo vegetativo della vite, soprattutto dopo la copertura dei vigneti di uva da tavola con teli in polietilene, alle modificazioni chimico-fisiche dei grappoli o anche alla differente sensibilità delle sub-popolazioni fungine ai fungicidi impiegati nei programmi di protezione. La popolazione *transposa*, infatti, è risultata costituita per più del 30% da isolati resistenti ad almeno un gruppo di fungicidi antibottrici e la loro frequenza durante il ciclo colturale è andata

incrementando in modo considerevole sino alla maturazione, quando sono stati completati i trattamenti antibiotritici. La popolazione *vacuma* è risultata, invece, quasi sempre composta da isolati normalmente sensibili ai fungicidi antibiotritici; solo in occasione del primo campionamento è stata rinvenuta una modesta frequenza di isolati resistenti a dicarbossimidici, a dicarbossimidici e benzimidazolici e a dicarbossimidici ed anilinoipirimidine, che però sono diminuiti sino a scomparire in occasione del campionamento eseguito sulle uve mature.

In sintesi, i risultati ottenuti confermano una differente capacità competitiva fra i due biotipi e soprattutto l'esistenza di una diversa risposta agli antibiotritici degli isolati di tipo *transposa* e *vacuma*. Questo ha un risvolto pratico importante: approfondire le dinamiche delle popolazioni *transposa* e *vacuma* nel tempo potrebbe, infatti, portare a migliorare l'efficacia dei programmi di protezione antibiotritica ed aiutare a prevenire perdite di efficacia dei fungicidi per fenomeni di acquisizione di resistenza.

### **Ringraziamenti**

Lavoro in parte finanziato dall'Università degli Studi di Bari - Fondi di Ateneo "Epidemiologia e genetica di microrganismi fitopatogeni" e dal FESR Programma INTERREG IIIA - Misura 2.2.: Cooperazione transfrontaliera e libero scambio nei settori primario e secondario "Valorizzazione, risanamento e produzione di materiale viti-vinicolo d'area (VARIPROVIT)"

### **LAVORI CITATI**

- Daboussi M.J., 1997. Fungal transposable elements and genome evolution. *Genetica*, 100, 253-260.
- De Miccolis Angelini R.M., Milicevic T., Natale P., Lepore A., De Guido M.A., Pollastro S., Cvjetkovic B., Faretra F., 2003. *Botryotinia fuckeliana* isolates carrying different transposons show differential response to fungicides and localization on host plants. *Journal of Plant Pathology*, 85, 288-289 (riassunto).
- Diolez A., Marches F., Fortini D., Brygoo Y., 1995. Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 103-108.
- Georgopoulos S.G., 1977. Development of fungal resistance to fungicides. In: Antifungal compounds (Siegel M.R., Sisler H.D. coord.). Marcel Dekker, New York, 439-495.
- Giraud T., Fortini D., Levis C., Lamarque C., Leroux P., Brygoo Y., 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable element reveal two sympatric species. *Molecular and Biological Evolution*, 14, 1177-1185.
- Grindle M., 1981. Variation among field isolates of *Botrytis cinerea* in their sensitivity to antifungal compounds. *Pesticide Science*, 12, 305-312.
- Hansen H.N., Smith R.E., 1932. The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 22, 953-964.
- Levis C., Fortini D., Brygoo Y., 1997. Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Molecular and General Genetics*, 254, 674-680.
- Santomauro A., Tauro G., Sorrenti M., De Guido M.A., Faretra F., 1997. Miglioramenti nella protezione dell'uva da tavola dalla muffa grigia (*Botryotinia fuckeliana*). *La Difesa delle Piante*, 20, 5-20.