

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Forestali e Ambientali

Specie di *Neonectria* coinvolte nell'eziologia del
cancro del faggio nella foresta del Cansiglio

Relatore

Dott. Benedetto T. Linaldeddu

Laureando

Francesco Contorno

Matricola n.

1131197

ANNO ACCADEMICO 2017/2018

Indice

Abstract	pag. 5
Riassunto	” 7
1. Introduzione	” 9
1.1 Il Faggio comune	” 9
1.1.1 Inquadramento sistematico	” 9
1.1.2 Ecologia del faggio	” 10
1.1.3 Areale di distribuzione	” 12
1.2 Principali avversità di natura biotica	” 14
1.3 Il Cancro del faggio	” 16
1.3.1 Eziologia	” 18
1.3.2 Sintomi e segni della malattia	” 19
1.3.3 Controllo della malattia	” 20
2. Scopo della tesi	” 23
3. Materiali e metodi	” 25
3.1 Sito d'indagine	” 25
3.2 Monitoraggio fitosanitario e campionamenti	” 27
3.3 Isolamento del patogeno	” 28
3.4 Identificazione morfologica	” 29
3.5 Identificazione molecolare	” 29
3.5.1 Identificazione degli isolati	” 29
3.5.2 Analisi filogenetiche	” 30
3.6 Saggi di patogenicità	” 31
4. Risultati	” 33
4.1 Sintomatologia e diffusione della malattia	” 33
4.2 Eziologia	” 35
4.2.1 Caratterizzazione morfologica	” 36
4.2.2 Caratterizzazione molecolare	” 39
4.3 Saggi di patogenicità	” 41
5. Discussione e conclusioni	” 43
6. Bibliografia	” 45
7. Sitografia	” 49
ALLEGATI	” 51
ALLEGATO 1. Tabella di campionamento	” 51

ALLEGATO 2. Sequenze nucleotidiche (formato FASTA) usate nelle analisi
molecolari

” 53

Abstract

The Beech Bark Disease is one of the main disease of beech trees in Europe and USA. In Italy this disease has been known for a long time, but little information is available about its spread and etiology. Therefore, in order to fill the scientific gaps about this disease, an investigation was carried to: i) evaluate the spread and incidence of the disease in an important beech stand in Veneto, the Pian del Cansiglio; ii) characterize the *Neonectria* species involved in the etiology. Results of the monitoring survey showed the high diffusion of beech trees with open cankers, the typical symptom of the disease. In all sites, symptomatic plants showed a general decline. At the same time, the mechanical stability of trees was compromised by the occurrence of several cankers in the branches and along the trunk. In general, a low degree of mortality in all sites was recorded. This aspect suggests the endemic character of the disease in the investigation sites, probably due to involvement of only one species *Neonectria coccinea* in the disease etiology. Although with low frequency, other 4 fungal species some of which known to be endophyte of beech were isolated from symptomatic tissues. In conclusion, the results obtained in this thesis have allowed us to expand the knowledge about the bio-ecology of *Neonectria coccinea*, a species for which scientific knowledge is still limited and incomplete; knowledge that deserves to be further investigated especially about the natural corridors that can prevent and/or favor the establishment, development and spread of this pathogen in Italian beech forests. From an epidemiological point of view, it would also be interesting to study if there is any interaction between *N. coccinea* and the insect *C. fagisuga* commonly found in the Pian del Cansiglio.

Riassunto

Il cancro del faggio conosciuto con l'acronimo di BBD derivante dal nome inglese della malattia *Beech Bark Disease* è una delle principali malattie del faggio in Europa e negli Stati Uniti d'America. In Italia questa malattia è riportata da tempo, ma sono ancora lacunose le informazioni sulla sua diffusione ed eziologia. Pertanto, vista l'assenza di informazioni sui microrganismi fungini coinvolti nel processo di patogenesi e la grande valenza ecologica delle faggete nel panorama boschivo italiano, è stata svolta un'indagine finalizzata a: *i*) valutare il grado di diffusione e incidenza della malattia in una delle faggete più importanti del Veneto, quella del Pian del Cansiglio; *ii*) caratterizzare sotto il profilo morfologico, genetico e patogenetico le specie di *Neonectria* coinvolte nella eziologia della malattia. L'attività di monitoraggio ha consentito di individuare la presenza diffusa su tutto l'areale del Cansiglio di piante di faggio con i sintomi tipici della malattia. Le piante sintomatiche mostravano un generale stato di declino vegetativo. Allo stesso tempo la loro stabilità meccanica era spesso compromessa a causa dei cancri. All'interno dei focolai infettivi (*hot-spot*) nel complesso è stato riscontrato un basso livello di mortalità delle piante. Questo carattere tipico delle malattie endemiche è probabilmente dovuto al fatto che nell'eziologia della malattia è coinvolta una sola specie fungina, *Neonectria coccinea*. Oltre a *Neonectria coccinea* nel corso delle indagini sono state isolate, anche se con bassi valori di frequenza, altre 4 specie fungine alcune delle quali riportate in letteratura come endofiti del faggio. In conclusione, i risultati ottenuti nell'ambito di questa tesi hanno consentito di ampliare le conoscenze sulla bio-ecologia della *Neonectria coccinea*, una specie per la quale le conoscenze scientifiche sono ancora limitate e lacunose; conoscenze che meriterebbero di essere ulteriormente investigate soprattutto per quanto riguarda le barriere e i corridoi naturali che possono impedirne e/o favorirne l'insediamento, lo sviluppo e la diffusione nelle faggete italiane. Dal punto di vista epidemiologico sarebbe inoltre interessante studiare se esiste una eventuale interazione tra *N. coccinea* e l'insetto *C. fagisuga* specie comunemente presente nel Pian del Cansiglio.

1. Introduzione

1.1 Il Faggio comune

Il faggio è una pianta caducifoglia di grandi dimensioni che può raggiungere altezze di 40 m con un diametro a petto d'uomo di circa 2 m. Anche se con una certa variabilità di forme la chioma, è generalmente globosa o ovaleggiante con portamento simpodiale (Bernetti, 1995; Gellini e Grossoni, 1998)

La corteccia dei faggi è tipicamente liscia. Questo carattere, secondo Gellini e Grossoni (1998), si mantiene per tutta la vita, anche se Bernetti (2015) riporta che in alcuni casi è possibile osservare all'interno dei popolamenti esemplari maturi con delle corrugazioni del ritidoma, questi esemplari sono classificati tassonomicamente come *F. sylvatica* var. *quercoides*. La colorazione va dal grigio cenere al grigio bluastro. Sia i brachiblasti che i macroblasti ospitano le gemme che sono pluri-perulate, lunghe, affusolate ed appuntite; le foglie sono semplici leggermente peduncolate, a nervatura pennata e alternate sul ramo. Il margine delle foglie è dentato oppure intero leggermente ondulato a sezione sinusoidale.

Il faggio fa parte delle specie vegetali monoiche per cui i fiori maschili e femminili sono portati sul medesimo individuo. I fiori maschili sono rappresentati da dei cupolini globosi, penduli e posseggono un lungo peduncolo. Ogni cupolino porta 6-16 fiori; il calice è 4-7 lobato con 8-16 stami formati da lunghi filamenti liberi alla base e da antere biloculari. I fiori femminili sono 4-6 lobati, gli stili sono 3 e sono ricurvi con gli stigmi decorrenti su di essi; l'ovario è infero, costituito da 3 carpelli sincarpi ciascuno dei quali porta due ovuli bi-tegmentati. I fiori femminili sono riuniti in cime infiorescenziali bi-flore avvolte da una cupola provvista esternamente di numerose appendici squamiformi morbide. La cima è eretta ed è portata al termine da un breve peduncolo.

L'impollinazione è anemofila e il frutto è un achenio a sezione triangolare, indeiscente e monosperma (Gellini e Grossoni, 1998). Ogni frutto contiene generalmente due semi, colloquialmente chiamati faggiole. A questa descrizione fanno eccezione il faggio giapponese, in quanto le faggiole sporgono all'esterno al posto di essere completamente racchiuse dalla cupola.

1.1.1 Inquadramento sistematico

Dal punto di vista sistematico il faggio appartiene alla sottodivisione delle piante angiosperme, all'ordine delle *Fagales* Engl. e alla famiglia delle *Fagaceae* Dumort.

Quest'ultima include 8 generi: *Castanea*, *Castanopsis*, *Chrysolepsis*, *Fagus*, *Lithocarpus*, *Nothofagus*, *Quercus* e *Triglobalanus*.

Il genere *Fagus* è costituito da 7 specie:

- *F. grandifolia* Ehrh.;
- *F. engleriana* Seemen;
- *F. longipetiolata* Seemen;
- *F. lucida* Rehd. & Wils.;
- *F. japonica* Maxim.;
- *F. crenata* Bl.;
- *F. sylvatica* L.;

I caratteri che permettono di discriminare fra le diverse specie sono il margine e la nervatura fogliare e la cupola del frutto (Gellini e Grossoni, 1998).

1.1.2 Ecologia del faggio

Il faggio è una pianta senza particolari esigenze pedologiche, tant'è che è possibile trovare faggete sia in suoli silicatici che carbonatici. I fattori che generalmente ne limitano la sopravvivenza sono le gelate tardive e le ridotte disponibilità idriche, ed è per questo motivo che il faggio lo si ritrova nelle stazioni forestali meso-esalpiche, in cui questi fattori limitanti sono sporadici.

Le gelate tardive e le gelate intense rappresentano un fattore limitante per il faggio, in quanto è una specie a fogliazione precoce (la fogliazione comincia a marzo e in talune stazioni anche a fine febbraio) e l'assenza di strutture di protezione dei tessuti, come cere e peli, nelle foglie giovani, le espone agli abbassamenti termici (Del Favero, 2008). Già a -15°C possono manifestarsi cretti da gelo sul fusto. Temperature tardive di -2°C , all'inizio dell'attività vegetativa, possono danneggiare i piccoli germogli che verranno successivamente sostituiti da una fogliazione tardiva di metà giugno.

Nella catena appenninica, al contrario di quanto succede nell'arco alpino, la fascia di vegetazione del faggio sale di quota, conquistando spesso la sommità dei rilievi. Man mano che ci si sposta verso le regioni endalpiche, il faggio trova fattori stazionali limitanti legati all'escursione termica e alla disponibilità idrica, in questo contesto smette di affermarsi come specie leader all'interno del sistema forestale e lo si ritrova in formazioni miste a peccio e ad abete.

Per quel che riguarda le esigenze idriche, il faggio incontra il suo *optimum* nelle zone esalpiche, caratterizzate da frequenti precipitazioni e da valori di umidità elevati e costanti. L'apparato radicale è superficiale, spazia nella rizosfera in misura della proiezione planimetrica della chioma. Questo assetto radicale permette di sfruttare in maniera efficiente anche lo *stem flow* (scorrimento delle piogge lungo il fusto), favorito anche dalla corteccia liscia. Non tollera substrati idromorfi e i ristagni idrici in quanto le radici necessitano di suoli ben areati e, concentrando la sua attività vegetativa nella stagione primaverile, riesce a tollerare la siccità estiva che talora, quando si tratta di eventi particolarmente intensi, causano l'ingiallimento delle foglie e un conseguente arrossamento della chioma (Bernetti, 2015).

Le esigenze idriche (1500 mm medi annui di pioggia) influenzano l'areale di distribuzione e il suo limite altitudinale inferiore (Bernetti, 2015). Nella parte occidentale delle Alpi, dove le precipitazioni si fanno più rade rispetto a quella orientale, il limite inferiore del faggio è più elevato (circa 1000 m di quota) mentre ad Est dove le precipitazioni sono più cospicue il limite inferiore di vegetazione si abbassa (nelle Pre-Alpi del Veneto il limite inferiore si aggira attorno ai 600 m). Le formazioni a faggio a quote più basse vengono definite eterotopiche (si fa riferimento a questa dicitura quando ci si rivolge ad esempio alle faggete dei versanti Nord dei Colli Euganei in provincia di Padova, o alle formazioni di forra della catena appenninica e tutte quelle formazioni azonali sotto la quota tipica).

Per quanto riguarda le tipologie forestali, secondo Bernetti (2015), in virtù dell'elevato grado di copertura del suolo fornito dalle faggete nella fascia montana e la scarsa presenza di strati arbustivi, le distinzioni ecologiche all'interno delle formazioni eutrofiche di faggio si basano sulla natura della componente erbacea associate. I tre grossi gruppi erbacei sono chiamati, in maniera colloquiale, "fagetali" e sono: Erbe perenni, Graminacee e giuncacee perenni e Bulbo rizomatose.

Nella classificazione tipologica proposta da Bernetti, oltre alle faggete eutrofiche, tipiche degli ambienti mesofili in cui il faggio si esprime nel suo *optimum*, vengono riportate le faggete acidocline (suoli silicatici sub-acidi), le faggete acidofile (suoli silicatici molto acidi – spesso in concomitanza di aree precedentemente percorse da incendio), le faggete termofile (suoli carbonatici, scistosi-argillosi, e risalite di specie dei querceti a rovere e roverella), le faggete miste (le condizioni stazionali caratterizzate da fattori abiotici di disturbo), le faggete ad agrifoglio (il faggio si trova nel suo *optimum*, ma le siccità estive condizionano il sottobosco ad agrifoglio), le faggete meridionali delle quote superiori (formazioni miste con scarsa presenza di megaforbie) e le faggete extra zonali (Bernetti, 1995; Bernetti, 2015).

Tra le faggete extra-zonali troviamo: le faggete eterotopiche (le sopraccitate formazioni sotto-quota), le faggete sub-alpine (formazioni di alta quota, tipiche delle Alpi Venete), le faggete

submontane (formazioni che si riscontrano nel limite altitudinale inferiore del faggio nelle Alpi Venete, associate a carpino bianco e carpino nero), faggete rupicole (faggete pioniere in terreni accidentati con poco suolo, portamento cespitoso spesso con pino mugo o carpino nero) (Bernetti, 2015).

1.1.3 Areale di distribuzione

L'areale di distribuzione del genere *Fagus* è abbastanza ampio ed è prevalentemente distribuito nell'emisfero boreale. La specie *Fagus grandifolia* è diffusa dalle regioni costiere meridionali del Canada orientale fino al Golfo del Messico e dalle coste atlantiche degli USA fino alle pianure alluvionali dell'Ohio e del Mississippi a ovest (Cale *et al.*, 2017).

In Asia orientale sono diffuse 5 specie: in Giappone le specie *F. japonica* e *F. crenata*, in Cina occidentale le specie *F. lucida* e *F. longipediolata* e in Cina centrale *F. engleriana* (Gellini e Grossoni, 1997).

In Asia occidentale e in Europa è presente la specie *F. sylvatica* nelle sottospecie *F. sylvatica* subsp. *sylvatica* e *F. sylvatica* subsp. *orientalis*. Quest'ultima era conosciuta come *F. orientalis* Lipsky e costituiva una specie a sé stante. Tuttavia, nel 1981 Greuter e Burdet hanno rivalutato la posizione tassonomica espandendo il *taxa* *F. sylvatica* ad oriente e ridimensionando il ruolo gerarchico di alcune specie ritenute intermedie come nel caso di *F. orientalis* (Gellini e Grossoni 1997).

Dal punto di vista morfologico, *Fagus sylvatica* subsp. *orientalis* si differenzia dal faggio occidentale per le foglie più lunghe (9-12 cm) e più larghe nella parte superiore, le nervature della pagina inferiore pubescenti, il picciolo più corto (5-15 mm), il frutto lungo circa 20 mm ed i rametti dell'anno pubescenti (Gellini e Grossoni, 1998).

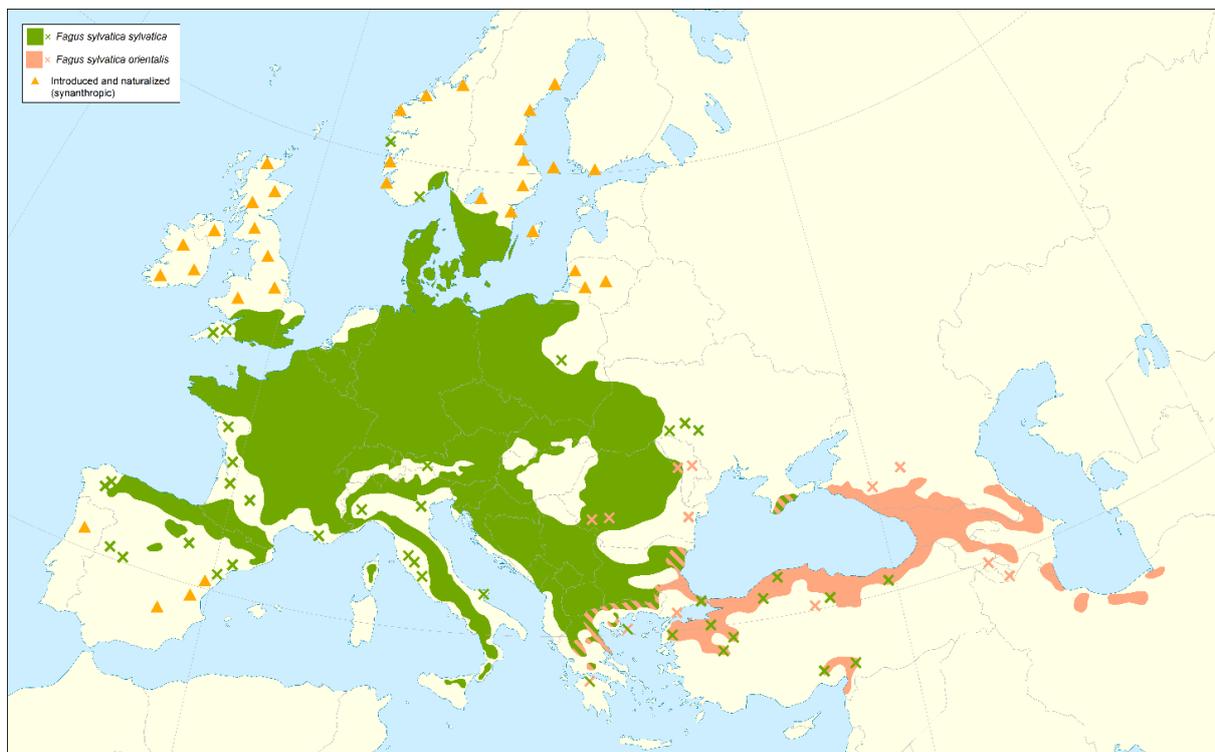


Figura 1: Distribuzione di *Fagus sylvatica* subsp. *sylvatica* e *Fagus sylvatica* subsp. *orientalis*. (Caudullo *et al.* 2017).

In Italia il faggio è presente su una superficie di circa 1.035.000 ha, di cui il 47% ad alto fusto (Bernetti, 2015). La distribuzione italiana dei boschi a *F. sylvatica* subsp. *sylvatica* mostra un ampio grado di variabilità, con tredici tipi forestali raggruppati in quattro sottocategorie di faggeta: sub-montana, montana, altimontana-subalpina, azonale (faggeta primitiva). Queste vanno a sommarsi alle faggete peninsulari e insulari con 6 tipi forestali: altimontana primitiva, altimontana tipica, montana mesoterma tipica, montana macroterma tipica con agrifoglio, montana con aceri, montana con cerro o cerreta con faggio (Del Favero, 2008).

Sia in ambiente alpino che appenninico peninsulare e insulare il fattore limitante lo sviluppo è la disponibilità idrica, mentre una minore importanza rivestono i substrati pedologici (Del Favero, 2004). Nel contesto alpino, i tredici tipi forestali sono determinati dalle diverse condizioni stazionali. La faggeta è tipica delle condizioni esalpiche, o eso-mesalpiche: per cui man mano che ci si addentra all'interno del sistema alpino, essa tende a scomparire e la presenza del faggio si esplica con individui sporadici in popolamenti forestali misti (Bernetti, 2015).

Per quel che riguarda le faggete dell'Appennino, e le formazioni presenti in Sicilia, esse fanno parte della fascia altitudinale superiore, e delineano il limite delle formazioni arboree. Il limite altitudinale per il faggio cresce secondo latitudine, difatti in Europa centrale le formazioni a faggio si arrestano a quote di collina, nell'Appennino tra 1.700 m e 1.800 m ed in Sicilia sull'Etna a quota 2.000 m (Bernetti, 2015). Il limite altitudinale inferiore possiede lo stesso

andamento ed è condizionato dalla disponibilità idrica dovuta alle precipitazioni (Bernetti, 2015). Per questo motivo nelle stazioni più piovose il limite altitudinale inferiore si sposta a quote più basse come nel caso delle Prealpi.

1.2 Principali avversità di natura biotica

Le piante nel corso della loro vita possono instaurare delle relazioni simbiotiche di diversa natura con altri organismi. Quando entrambi i bionti traggono un vantaggio la simbiosi è di tipo mutualistico, rientrano in questa categoria le micorrize una particolare associazione simbiotica tra un fungo ed una pianta superiore, localizzata a livello degli apici radicali. Mentre in altri casi quando uno solo dei due bionti trae dei vantaggi si innescano dei rapporti di commensalismo, spesso però il vantaggio di un bionte va a discapito dell'altro organismo, e questo rapporto prende il nome di parassitismo. Rientrano in questa categoria le interazioni tra le piante e i funghi fitopatogeni. Allo stesso tempo alcune specie di funghi all'interno del loro ciclo biologico possono variare il tipo di interazione simbiotica con le piante. Tra queste entità fungine rientrano quelle ad habitus endofitico. Alcuni endofiti, al variare delle condizioni ambientali, possono comportarsi da mutualisti, parassiti o commensali (Sieber *et al.*, 2007). Sul faggio sono riportate in letteratura ben 91 specie di funghi endofiti (Capretti e Ragazzi 2009).

Dal punto di vista fitosanitario numerose fitopatie concorrono ad insidiare le produzioni legnose e la stabilità dei boschi di faggio. Tuttavia, gli studi finora condotti al riguardo non sempre hanno permesso di chiarire in modo inequivocabile l'eziologia di molte di esse (Capretti e Ragazzi, 2009). Di seguito si riportano i principali parassiti finora riscontrati in Italia.

Tra i principali parassiti del faggio un ruolo importante lo rivestono gli agenti di carie (Capretti e Ragazzi, 2009). Tra questi è importante riportare le specie *Fomes fomentarius*, *Inonotus hispidus* e *Ganoderma adspersum* (Baum *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2017)

Il faggio può essere attaccato anche da agenti di marciumi radicali appartenenti ai generi *Phytophthora* de Bary e *Armillaria* (Vahl) P. Kumm.

Per quanto riguarda il genere *Armillaria*, su faggio una delle specie più importanti dal punto di vista fitosanitario è senza dubbio l'*Armillaria mellea* un fungo polifago agente del marciume radicale fibroso. Sulle piante infette è possibile osservare i segni del patogeno costituiti da spesse placche di micelio di colore bianco-crema, che si insinuano tra il tessuto corticale e il tessuto legnoso, con la corteccia che tende a separarsi facilmente dal legno sottostante. La chioma della pianta progressivamente si dissecca, spesso in modo asimmetrico, mentre a livello del colletto si differenziano i basidiomi del fungo. Il parassita può diffondersi attraverso cordoni di ife dette "rizomorfe", con le quali può raggiungere le piante sane vicine (Ingold e Hudson 1993).

Su faggio sono segnalate numerose specie di *Phytophthora*. Recentemente in Europa centrale si è assistito alla diffusione di una grave forma di deperimento e moria delle faggete a causa degli attacchi di specie afferenti a questo genere. In Bavaria (Jung, 2009), ha rinvenuto la presenza di molteplici specie di *Phytophthora* tra cui *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. plurivora* e *P. citricola* in diversi contesti urbani e forestali. La sintomatologia associata agli attacchi di *Phytophthora* spp. è rappresentata dal disseccamento improvviso dell'intera chioma a partire dalle parti distali.

Il faggio può essere attaccato anche da agenti di cancro, in particolare due malattie, il cancro carbonioso ed il cancro da *Neonectria* sono particolarmente gravi e possono compromettere la stabilità di interi ecosistemi. Il cancro carbonioso è una malattia causata da *Biscogniauxia nummularia* (Bull.) Kuntze, un ascomicete capace di colonizzare per parte del proprio ciclo biologico i tessuti del faggio in forma asintomatica, come endofita, e successivamente, a seguito di condizioni di stress dell'ospite, soprattutto di tipo idrico, comportarsi da parassita invadendo i tessuti legnosi e corticali su cui differenzia un caratteristico stroma nero erompente. Sullo stroma il fungo differenzia le strutture riproduttive costituite da periteci contenenti le ascospore, ma anche le forme di moltiplicazione agamica (forma conidica). In Italia questo patogeno è diffuso soprattutto nelle regioni centro-meridionali (Granata e Whalley 1994; Granata e Sidoti 2004; Luchi *et al.*, 2006; Capretti e Ragazzi, 2009). Il cancro del faggio da *Neonectria* è trattato in modo specifico nel prossimo paragrafo.

Altre malattie che comunemente si riscontrano su faggio sono quelle fogliari. Una delle più diffuse è l'antracnosi causata da specie del genere *Apiognomonina* spp. Höhn. Su faggio il principale agente di antracnosi è *A. errabunda*, che determina degli imbrunimenti sulla parte centrale e sul margine delle foglie (Capretti e Ragazzi, 2009).

Oltre ai parassiti fungini anche alcuni insetti possono arrecare gravi danni alle faggete. Tra gli insetti che svolgono il proprio ciclo biologico sui tessuti del faggio vi sono: *Mikiola fagi* Hartig, *Rhynchaenus fagi* L. e *Cryptococcus fagisuga* Lindinger.

Sulle foglie di faggio si riscontra frequentemente la presenza di galle (iperplasie di tessuto vegetale - tumore) indotte dal dittero *M. fagi* (Cecidomia del faggio), il quale, deponendo le uova sulla pagina superiore delle foglie, inietta delle sostanze che inducono la formazione di tessuto neoplastico attorno al punto di ovo-deposizione. Ogni galla contiene al suo interno una larva dell'insetto. Da un punto di vista funzionale la presenza delle galle non comporta nessun problema rilevante all'efficienza dell'apparato fogliare che continua a svolgere la sua funzione foto-sintetizzante (ortobotanicomontebalto.org).

Rhynchaenus fagi conosciuto come l'Orcheste del faggio, è un coleottero fitofago delle foglie del faggio. Sulle foglie è facilmente riconoscibile la presenza delle larve dell'insetto in

virtù delle mine che scava. L'attività trofica perdura dalla primavera all'inverno, periodo durante il quale le femmine adulte depongono le uova sulla pagina inferiore della foglia, in prossimità della nervatura centrale. Le larve, durante l'attività trofica si spostano verso l'esterno della foglia colonizzando un'area circolare in prossimità del margine. Dopo l'impupamento, l'individuo adulto sfarfalla in luglio, per poi passare l'inverno al riparo nella lettiera (www.entom.unibo.it).

Cryptococcus fagisuga è un insetto emittero che, secondo Gwiazdowski *et al.* (2006), è originario della regione del Mar Nero. È presente sia nel continente europeo che in quello americano, dove probabilmente è stato importato accidentalmente alla fine del XIX secolo (Cale *et al.*, 2017). Possiede un apparato boccale di tipo succhiatore-pungente (stiletto), tipico degli Emitteri, che usa per forare la corteccia e nutrirsi dei contenuti delle cellule floematiche in ospiti giovani e dei costituenti del felloderma in quelli adulti (Cale *et al.*, 2017). Per ragioni ancora poco note, il suo ciclo biologico varia in funzione dell'areale di distribuzione, infatti, su *F. grandifolia* in Nord America *C. fagisuga* effettua una sola ovideposizione all'anno, mentre nell'areale d'origine due.

Nel continente americano trascorre il periodo invernale in fase di neanide, mentre in Europa in fase di adulto (Japoshvili *et al.*, 2015). Il ciclo biologico di questo insetto inizia con la ovideposizione sulla corteccia del faggio a metà della stagione estiva (giugno e luglio) (Cale *et al.*, 2012). Le uova si schiudono generalmente nella tarda estate fino all'inverno. Il primo stadio ninfa è caratterizzato da una certa motilità in quanto dotato di arti per lo spostamento ed antenne sensoriali. Nel secondo stadio ninfa, che dura fino a primavera inoltrata, *C. fagisuga*, perde la sua motilità, e si ricopre di un secreto dalla consistenza lanuginosa. La colonizzazione di nuovi ospiti, o nuove aree, è effettuata dall'adulto (Wainhouse, 1980).

1.3 Il Cancro del faggio

Il cancro del faggio conosciuto con l'acronimo di BBD derivante dal nome inglese della malattia *Beech Bark Disease* è una delle principali malattie del faggio in Europa e negli Stati Uniti d'America. Negli USA questa malattia è dovuta all'azione sinergica tra l'insetto *C. fagisuga* (entomo-vettore) e due specie fungine afferenti al genere *Neonectria* (Houston, 1998) (Figura 2).

Negli USA il cancro del faggio è stato ampiamente studiato in virtù del fatto che dalla fine dell'XIX secolo ad oggi, questa malattia ha avuto una espansione a carattere epidemico, spaziando dal Nord-Est del Canada (Nuova Scotia) verso Sud-ovest degli USA, e determinando gravi perdite fino all'80-90% (Houston e Houston, 1994).

Il modello di diffusione epidemica del BBD nelle faggete degli USA è possibile riassumerlo graficamente in tre fasi: “*Advance-front*”, “*Killing-front*” and “*Aftermath-forest*” (Figura 2), (Shigo, 1972; Cale *et al.*, 2017).

L’*Advance-front* rappresenta la fase iniziale della malattia in cui si assiste alla pullulazione dell’insetto *C. fagisuga*. In questa fase l’incidenza della malattia è bassa, e la mortalità del faggio è dovuta principalmente a fattori di senescenza.

Il *Killing-front* è la fase in cui, la mortalità del faggio è alta e le infezioni da *Neonectria* spp. coinvolgono circa il 90% del popolamento (Ehrlich, 1934; Shigo, 1972). La densità degli attacchi di *C. fagisuga* sui fusti è tale da far apparire le piante come tingeggiate di bianco (Ehrlich, 1934, Houston e Houston, 1994). In questa fase la mortalità delle piante è massima (Zabel *et al.*, 1958).

L’*Aftermath-forest* è la fase in cui si assiste a un decremento della malattia dovuto al numero limitato di individui ancora vivi e a fattori naturali di resistenza dell’ospite.

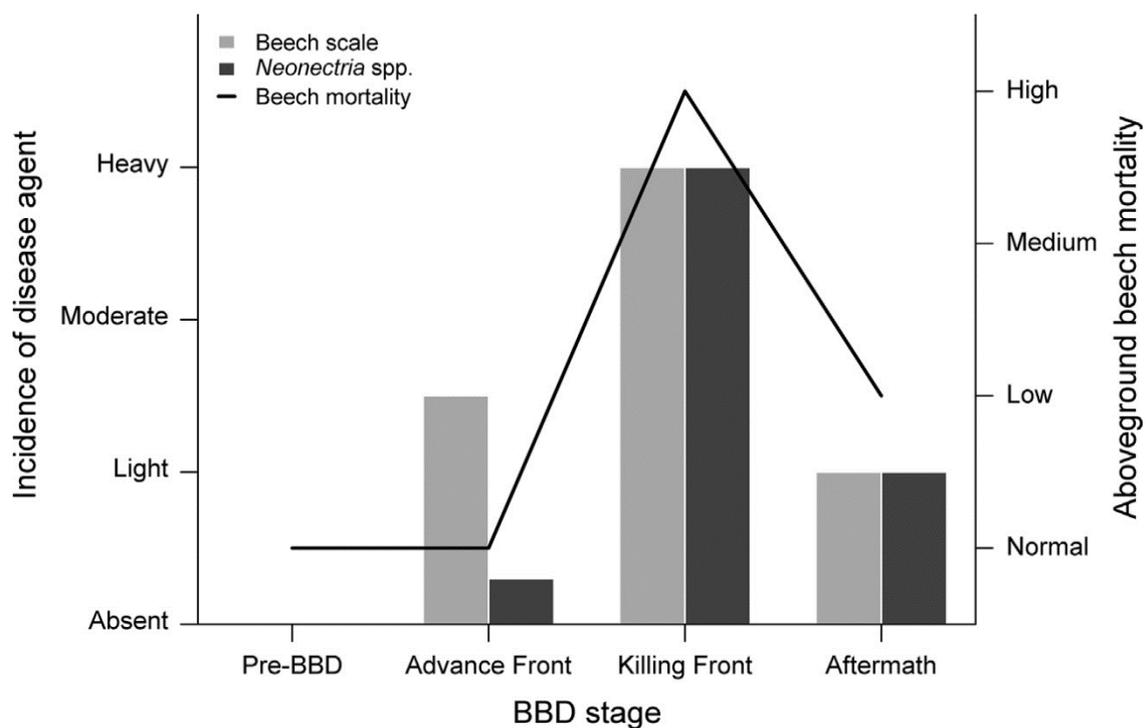


Figura 2: Incidenza relativa di *Neonectria* spp. e *C. fagisuga* nelle faggete del Nord America interessate dalla malattia (Fonte: Cale *et al.*, 2017)

Anche i mammiferi possono avere un ruolo chiave nel complesso della BBD, come recentemente dimostrato per il ghio (*Glis glis* L.) da Montecchio *et al.*, (2011) nelle faggete della Foresta del Cansiglio.

1.3.1 Etiologia

Dal punto di vista eziologico differenti specie del genere *Neonectria* sono coinvolte nell'insorgenza della malattia:

- *Neonectria faginata* Castlebury *et al.* (\equiv *Nectria coccinea* [Pers.:Fr.] Fr. var. *faginata* Lohman *et al.*) (anamorfo *Cylindrocarpon faginatum*);

- *Neonectria ditissima* (Tul. & C. Tul.) Samuels & Rossman (\equiv *Nectria galligena* Bres.) (anamorfo *Cylindrocarpon heteronema*)

- *Neonectria coccinea* (Pers.) Rossman (anamorfo *Cylindrocarpon candidum*) (Castlebury *et al.* 2006; Hirooka *et al.* 2013).

Il genere *Neonectria* appartiene alla famiglia delle *Nectriaceae* (composta da 55 generi e approssimativamente 900 specie) e all'ordine delle *Hypocreales*, (composto da 8 famiglie, 240 generi e circa 2700 specie) (Lombard *et al.*, 2015). È un raggruppamento molto variegato di funghi che racchiude specie patogene con diversi gradi di virulenza nei confronti delle piante (Lombard *et al.*, 2015).

Inizialmente tutte le specie fungine che presentavano periteci subglobosi, uniloculati e di colore rosso con ascospore bicellulari erano inserite nel grosso contenitore tassonomico del genere *Nectria*, che, nel corso del tempo, è stato profondamente rivisitato (Castlebury *et al.*, 2006).

Nel 1934 Ehrlich accertò il legame tra il cancro del faggio e la presenza sui tessuti di *Nectria* spp.; successivamente nel 1943 Lohman e Watson hanno descritto il patogeno identificandolo come *Nectria coccinea* var. *faginata*. Booth, attraverso studi effettuati tra il 1959 e il 1966, ha revisionato i generi *Nectria* spp. e *Cylindrocarpon* suddividendoli in quattro gruppi in base alle caratteristiche morfologiche, che riguardavano la presenza o l'assenza di micro-conidi e clamidospore.

Chaverri *et al.* (2011) e Gonzalez *et al.* (2017), attraverso un approccio di tipo sia filogenetico che morfologico, hanno ulteriormente rivisitato il genere *Neonectria* è trasferito numerose specie nei nuovi generi: *Ilyonectria*, *Rugonectria*, *Thelonectria* e *Corinectria*.

Per quanto riguarda più da vicino le specie coinvolte nella malattia, *N. ditissima* è una specie polifaga riportata su *F. sylvatica* in Europa e *F. grandifolia* in Nord America. Oltre al faggio *N. ditissima* è nota per infettare varie specie arboree (Kasson e Livingston, 2009).

Neonectria faginata, è la specie chiave nell'eziologia del BBD in Nord America (Kasson e Livingstone 2009). *Neonectria faginata* rispetto a *N. ditissima* è una specie più virulenta su faggio, e nei siti infetti le due specie possono coesistere. Tuttavia, Kasson e Livingston (2009) indagando su questo tema hanno riscontrato che solo raramente i due patogeni colonizzano la stessa pianta.

Neonectria coccinea è il patogeno responsabile della BBD in Europa, ed è stato isolato sia da piante vive che da piante abbattute nell'intero l'emisfero Nord (Hirooka *et al.*, 2013).

Secondo gli studi di Chapela e Boddy (1988) e di Hendry *et al.* (2002), *N. coccinea* è un micete endofita che colonizza in forma parassitaria il faggio. Fino al 2013 *N. coccinea* e *N. faginata* sono state isolate soltanto da *Fagus* spp. Di recente *Neonectria coccinea* è stata riscontrata anche su *Fagus crenata* in Giappone (Hirooka *et al.*, 2013).

Studi filogenetici considerano *N. coccinea* nativa del continente europeo, mentre *N. ditissima* nativa del continente americano. L'origine di *Neonectria faginata* è ancora incerta.

1.3.2 Sintomi e segni della malattia

I sintomi della malattia sono rappresentati dalle lesioni cancerose sul fusto e sulle branche e i conseguenti disseccamenti (Figura 3). Le lesioni cancerose che interessano le branche riducono il flusso linfatico e causano una perdita di vigoria. Quando queste circoscrivono la branca sono visibili dei disseccamenti settoriali (Weber, 2014), talvolta le parti disseccate vanno incontro a stroncamento per effetto degli agenti atmosferici. I segni della presenza del patogeno sono costituiti da numerosi periteci di colore rosso, visibili nel periodo autunno-invernale (fase teleomorfa). Nel periodo primaverile-estivo il fungo invece differenzia le strutture di moltiplicazione agamica (fase anamorfa) (Weber, 2014).

Secondo la descrizione proposta da Castlebury *et al.* (2006), *N. ditissima* e *N. faginata* producono dei periteci in gruppo erompenti in uno stroma ben sviluppato, invece *N. coccinea* possiede periteci erompenti in uno stroma sottile. Le infezioni delle tre specie di *Neonectria* determinano la comparsa di cancri annuali dalla tipica forma a bersaglio.



Figura 3: Sintomi e segni di BBD. Fonte: USDA - Joseph Obrien (forestryimages.org)

1.3.3 Controllo della malattia

Nel continente europeo gli effetti della BBD sono trascurabili in virtù del carattere endemico della malattia, mentre nel continente americano sono state sviluppate strategie di controllo per limitarne la diffusione epidemica. Nel tempo sono stati proposti diversi approcci di controllo dell'epidemia: biologico, chimico, selvicolturale, e miglioramento genetico delle piante (Cale *et al.*, 2017).

Sul controllo biologico sono stati studiati entomofagi (acari, coccinellidi) ed entomoparassiti (micoparassiti), riscuotendo pochi ed insufficienti risultati sul controllo della malattia a livello

di popolamento (Cale *et al.*, 2017). Gli interventi di tipo chimico hanno riguardato principalmente l'impiego di insetticidi per il contenimento delle infestazioni di *C. fagisuga*, mentre pochi studi hanno valutato l'efficacia di fungicidi nei confronti di *Neonectria* spp.

Trattamenti di tipo fisico sono stati eseguiti su marze e portinnesto di *Malus* spp. da Ampo-sah *et al.* (2016), valutando la termo resistenza di *N. ditissima*, attraverso esposizione dei tessuti ad acqua calda, (50°C per 15-25 minuti) tuttavia i risultati non sono stati soddisfacenti (Am-ponsah *et al.*, 2016).

Dal punto di vista selvicolturale sulle faggete americane sono state adottate diverse misure volte a ridurre la mortalità, e a favorire la sopravvivenza degli individui più resistenti. Alcune di queste non hanno avuto esito positivo, specialmente quelle che si basavano su un approccio diretto nei confronti del faggio. Tentativi di diradamento ed eliminazione di materiale infetto di faggio non hanno prodotto effetti rilevanti sulla diffusione della malattia in campo. Mentre la rimozione delle specie ospiti di *N. ditissima*, o di piante già infestate da *X. Cocculus*, nell'*Advance-front*, ha ridotto i livelli di mortalità (Cale *et al.*, 2017; Houston, 1994; Kasson e Living-ston, 2009).

Sul faggio americano sono stati effettuati anche dei tentativi di miglioramento genetico. In particolare, in Michigan dal 2011 sono stati avviati campi sperimentali utilizzando materiale di propagazione resistente a *C. fagisuga*. Questo approccio ha avuto origine dall'osservazione che nell'*Aftermath-forest* circa l'1% della popolazione di faggio non è suscettibile all'attività dell'insetto (Houston, 1998).

2. Scopo della tesi

Alla luce di quanto finora esposto sulle malattie del faggio in Europa e negli USA ed in particolare sul cancro da *Neonectria* spp., l'assenza di informazioni sull'eziologia di questa malattia in Italia e la grande valenza ecologica delle faggete in Veneto, si è ritenuto opportuno svolgere un'indagine al fine di:

- I) valutare il grado di diffusione ed incidenza della malattia in una delle faggete più importanti del Veneto, quella del Pian del Cansiglio;
- II) caratterizzare sotto il profilo morfologico, genetico e patogenetico le specie di *Neonectria* coinvolte nella eziologia della malattia.

3. Materiali e metodi

3.1 Sito d'indagine

Le indagini sono state effettuate nella Foresta del Cansiglio, situata nella parte est dell'arco alpino. La Foresta del Cansiglio è incastonata in un altopiano conosciuto con il nome di "Pian del Cansiglio". L'area boschiva si sviluppa fra due regioni: il Veneto e il Friuli Venezia Giulia. La parte di territorio ricadente in Veneto appartiene alle province di Belluno (Comune di Tambre e Comune di Farra d'Alpago) e Treviso (Comune di Fregona). Mentre la parte ricadente in Friuli Venezia Giulia interessa la provincia di Pordenone e i comuni di Caneva, Polcenigo, Budoia, Aviano, Barcis, Claut ed Erto e Casso.

L'accesso all'area della Foresta del Cansiglio è servito dalla SS 422, che attraversa il "Pian del Cansiglio" da Sud a Nord, sino a giungere, attraverso i punti di sella di Pian Osteria e Campon, alle cittadine di Spert, Broz e Tambre.

Dal un punto di vista geo-morfologico, Pian del Cansiglio è un altopiano delle Pre-alpi venete che raggiunge quote attorno ai 1000 m nella parte pianeggiante, e 1500 m nelle cime dei rilievi che la coronano. La corona di cinta è rappresentata dalle cime del Monte Pizzoch a Sud, del Monte Millinfret a Sud-Ovest, e del Monte Costa e Toset ad Ovest. A Nord-Est e ad Est sono prominenti le cime friulane del Monte Candaglia, Col Zambul, Col de le Tiede, Monte Croseraz e Monte Forcella.

Il clima è di tipo temperato freddo con estati fresche. Nei tratti pianeggianti sono frequenti fenomeni di inversione termica, che influenzano anche la presenza di formazioni forestali. A ridosso delle aree del piano, infatti, trova migliore adattamento il *Picea abies*. L'inversione termica è dovuta a flussi di aria fredda provenienti dalle aree a clima più (Veneto Agricoltura).

Dal punto di vista storico, la foresta ha subito numerosi cambiamenti per quel che riguarda la sua destinazione d'uso. Le diverse dominazioni hanno influenzato il soprassuolo arboreo in base agli usi del tempo.

Fu la Repubblica di Venezia a porre il veto di sfruttamento nell'area del Cansiglio, impedendo qualsiasi tipo di taglio forestale. Al tempo della Serenissima, l'area della Foresta del Cansiglio era una importante fonte di materie prime legnose, in particolare era conosciuta come "il bosco dei remi", le piante di faggio presenti erano destinate alla produzione di legname per la realizzazione di remi per la flotta della Repubblica veneziana (Bessega, 2008). Attualmente nell'area insistono ancora dei villaggi di matrice cimbra (una antica popolazione germanica insediatasi sull'altopiano del Cansiglio agli albori del XIX secolo), oggi orientati ad attività di ricezione turistica e ricreativa (<http://cimbridelcansiglio.it/>).

Le attività attuali della foresta sono orientate alla conservazione naturalistica del sito attraverso l'istituzione di aree protette quali la Riserva naturale di Pian di Landro-Baldassare, la Riserva Statale Campo di Mezzo-Pian di Parrocchia, la Riserva integrale Piaie Longhe-Millinfret istituite nella seconda parte del XX secolo (Regione Veneto).

Sull'area oggetto di studio è censito a livello europeo il SIC-ZPS IT3230077 "Foresta del Cansiglio", di cui fanno parte i seguenti Habitat Natura 2000:

- 9130 Faggete dell'*Asperulo-Fagetum* (abieteteto)
- 9130 Faggete dell'*Asperulo-Fagetum* (faggeta montana e altimontana)
- 9140 Faggete subalpine dell'Europa centrale con *Acer* e *Rumex arifolius*
- 9180 Foreste di versanti, ghiaioni e valloni del *Tilio-Acerion* (Faggeta)
- 9410 Foreste acidofile montane e alpine di *Picea* (*Vaccinio-Piceetea*) (Pecceta di dolina)
- 9420 Foreste alpine di *Larix decidua* e/o *Pinus cembra* (lariceto)

Le tipologie forestali di pertinenza rilevate dalla Regione Veneto sono:

- Abieteteto eso-mesalpico montano
- Pecceta secondaria montana
- Faggeta montana tipica eso-mesalpica
- Faggeta montana tipica mesalpica

Le formazioni forestali a faggio riguardano sia popolamenti puri, che misti ad abete rosso (*Picea abies*) ed abete bianco (*Abies alba*) (Figura 4).

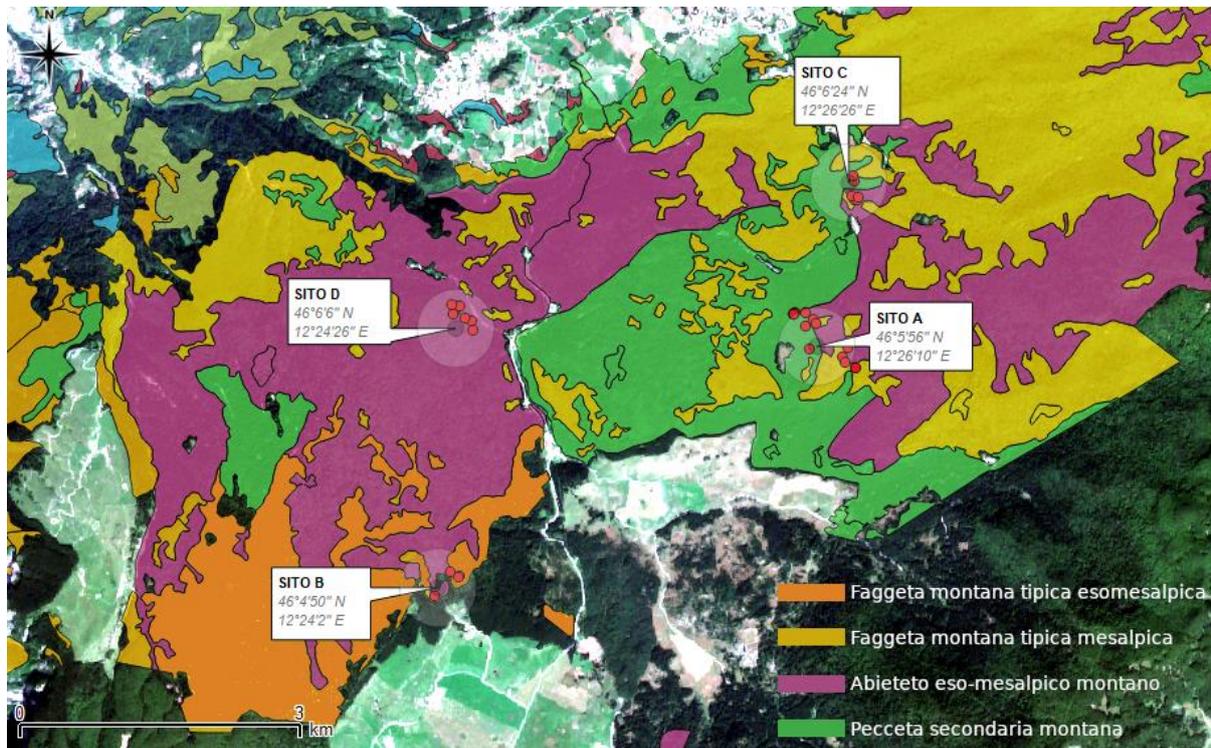


Figura 4: Tipi forestali presenti nell'area di campionamento. Elaborazione attraverso QGIS. (Fonte Shapefile: Regione Veneto – Fonte Raster: ESA).

3.2 Monitoraggio fitosanitario e campionamenti

Al fine di valutare la presenza e incidenza della malattia sono stati individuati 4 siti (denominati: SITO A, SITO B, SITO C e SITO D) con piante di faggio sintomatiche. In ognuno di essi è stata investigata un'area di saggio di circa 1 ha (Figura 4). In considerazione del fatto che tutte le piante all'interno delle aree di saggio mostravano gli stessi sintomi, sono state scelte *at random* complessivamente 32 piante: 13 nel SITO A, 4 nel SITO B, 6 nel SITO C e 9 nel SITO D. Queste sono state monitorate in primavera prelevando, dalla parte basale del fusto di ciascuna pianta porzioni di tessuto legnoso e corticale da cancri e necrosi corticali tipici della malattia. È stato campionato un solo cancro per pianta.

Tutti i campioni prelevati nel corso delle indagini sono stati posti in buste di plastica siglate con i riferimenti del prelievo e trasferiti in giornata in laboratorio per essere conservati in cella fredda a 15°C fino al loro impiego per gli isolamenti.

Allo stesso tempo all'interno di ciascun sito è stata allestita, *at random*, un'area di saggio circolari di 10 m di diametro.

In ciascuna area è stato rilevato il numero di piante presenti e valutato il loro stato sanitario, ponendo particolare attenzione alla presenza e natura dei sintomi della malattia nella chioma (ingiallimenti, microfillia e rarefazione), e nelle branche e nel fusto (disseccamenti, essudati,

cancro necrosi e rami epicormici). I dati raccolti in ciascuna area di saggio sono stati utilizzati per calcolare:

- Diffusione (D%) della malattia, applicando la formula:

$$D (\%) = \left(\frac{Nm}{N} \right) * 100$$

dove “Nm” rappresenta il numero di alberi malati e “N” il numero totale di alberi esaminati;

- Mortalità (M%) delle piante, dividendo il numero di piante morte (d) per il numero totale di piante esaminate:

$$M (\%) = \left(\frac{d}{N} \right) * 100$$

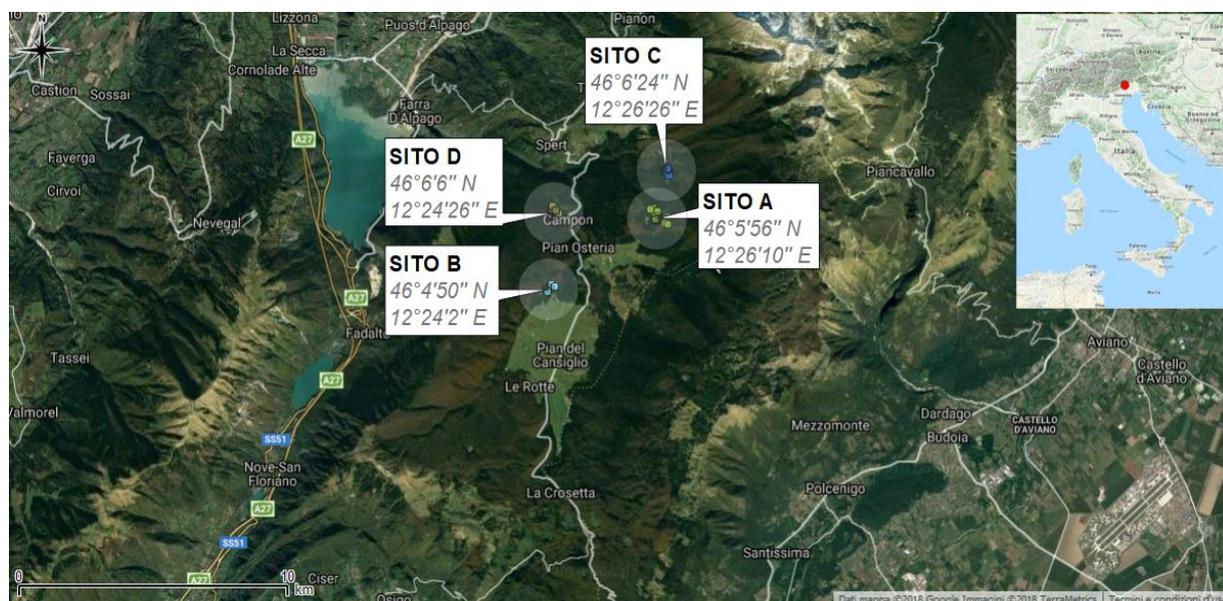


Figura 5: Inquadramento geografico dei siti di monitoraggio.

3.3 Isolamento del patogeno

Tutti i campioni prelevati sono stati utilizzati per gli isolamenti entro 48 ore dalla loro raccolta. Dopo un attento esame allo stereo-microscopio volto ad accertare l'eventuale presenza e natura di strutture riproduttive fungine, i campioni sono stati disinfettati in superficie con etanolo al 90% per 30 sec., e successivamente posti ad asciugare in ambiente asettico. Da ogni campione sono stati prelevati frammenti di circa 3-4 mm² di tessuto corticale e legnoso e posti in piastre Petri contenenti un substrato a base di patata-destrosio-agar (PDA, Oxoid) alla concentrazione di 39 g/L. Tutte le piastre sono state quindi trasferite in termostato e mantenute per 5 giorni a 25°C, al buio.

Le colonie sviluppatesi sono state trapiantate in coltura pura su tre differenti substrati: PDA, estratto di malto agar (MEA, Difco™) alla concentrazione di 20 g/L e su farina d'avena agar (OA, Difco™) alla concentrazione di 72,5 g/L. Le colonie pure sono state conservate in termostato a 25°C fino alla differenziazione dei caratteri morfologici idonei per l'identificazione.

3.4 Identificazione morfologica

Dagli isolamenti effettuati sono state costantemente isolate colonie fungine appartenenti al genere *Neonectria*. Tutte le colonie sono state identificate sulla base dei principali caratteri morfo-colturali quali la crescita e la colorazione della colonia, la struttura del micelio, la produzione di pigmenti diffusibili su agar, la forma e la dimensioni dei conidi, in accordo con le recenti descrizioni morfologiche riportate per le specie di questo raggruppamento (Castlebury *et al.*, 2006; Hirooka *et al.*, 2013). Per le analisi morfo-colturali sono stati impiegati quattro substrati: Carrot Agar (CA, Carote BIO 25% + Agar Tech Difco™), PDA, MEA, OA. A tal fine sono stati prelevati dal margine di colonie di 5 giorni di età dischetti di micelio ($\varnothing = 5$ mm) e posizionati in piastre Petri (90 mm) contenenti i 4 substrati di crescita. Le colonie sono state trasferite in termostato a 25°C al buio per due settimane.

Alla fine del periodo di incubazione è stato misurato all'accrescimento miceliale delle colonie ed effettuate delle foto utilizzando una camera Nikon D300. Sono state effettuate 6 repliche per ciascun substrato di crescita. Per stimolare la produzione conidica, gli isolati di *N. coccinea* sono stati trasferiti su SNA (Nirenberg, 1976) e mantenuti a temperatura ambiente e luce naturale.

Le indagini micro-morfologiche e biometriche dei conidi degli isolati di *Neonectria* sono state effettuate utilizzando un microscopio ottico Leica DMRB, e il software Leica Application Suite v4.6.1.

3.5 Identificazione molecolare

3.5.1 Identificazione degli isolati

Tutte le colonie fungine ottenute nel corso delle indagini sono state identificate su base genetica attraverso l'analisi delle sequenze nucleotidiche dell'intera regione degli spaziatori interni trascritti (ITS1 e ITS2) incluso il gene 5.8S del rDNA.

L'estrazione del DNA fungino è stata effettuata da colonie pure su PDA di 4-7 giorni di età utilizzando il kit Instagene Matrix (BioRad Laboratories, Hercules, CA), secondo le istruzioni della casa produttrice. Gli estratti sono stati quindi conservati a -20°C fino al loro successivo

utilizzo. Con la reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata amplificata la regione ITS utilizzando i primers universali ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). La reazione è stata realizzata in un volume totale di 50 µl contenente: 18,7 µl di H₂O; 10 µl di Buffer 5x; 5 µl di dNTPs; 5 µl di BSA; 5 µl di ciascun primer; 0,3 µl di GoTaq polymerase (Promega); 1 µl di DNA.

La reazione d'amplificazione è stata eseguita con un termociclatore (Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler), utilizzando i cicli termici riportati da Linaldeddu *et al.* (2013). Aliquote di 5 µl di ciascun prodotto di amplificazione e dello standard costituito dal 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™) sono stati fatti migrare mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% in tampone TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3), usando come tracciante molecolare il SYBR-Safe (Invitrogen™). La dimensione degli ampliconi (bp) così come la loro concentrazione (ng/µl) è stata determinata attraverso il Gel documentation systems, VWR® Imager2. I prodotti PCR sono stati quindi purificati utilizzando il Kit EUROGOLD Gel Extraction (EuroClone), seguendo le istruzioni riportate dalla casa produttrice.

I purificati sono stati quindi quantificati ed una aliquota è stata spedita presso i laboratori della BMR Genomics s.r.l. (www.bmr-genomics.it), spin-off dell'Università di Padova per essere sequenziata. Gli elettroferogrammi delle sequenze ottenute, sia in forward che in reverse, sono stati letti separatamente e poi confrontati, al fine di ottenere una sequenza consenso attraverso il programma FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc.; <http://www.geospiza.com/finchtv>). La sequenza consenso di ciascun isolato è stata infine confrontata con le sequenze disponibili nel database online GenBank utilizzando il programma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.5.2 Analisi filogenetiche

Le sequenze ITS di 10 isolati ottenuti in questo studio sono state combinate e inserite in un data-set con altre 10 sequenze rappresentative di tutte le specie di *Neonectria* finora conosciute. Nel data-set sono state inserite anche le sequenze di *Corinectria fuckeliana* e di un isolato (FC8) raccolto da una lesione cancerosa su *Picea abies* campionata sul SITO A (Tabella 1).

Le sequenze sono state allineate utilizzando il programma ClustalX v 1.83 (Thompson *et al.*, 1997), con i seguenti parametri: pairwise alignment parameters (gap opening = 10, gap extension = 0,1) e multiple alignment parameters (gap opening = 10, gap extension = 0,2, transition weight = 0,5, delay divergent sequences = 25 %).

La ricostruzione filogenetica è stata eseguita secondo il principio della massima verosimiglianza (*Maximum Likelihood*) (ML; Felsenstein, 1981) utilizzando il programma MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). All'analisi è stato applicato il *general time-reversible model* (Rodriguez *et al.*, 1990), che include la stima dei siti invariabili assumendo una distribuzione gamma discreta con sei categorie (GTR + G + I). Tutti i gaps sono stati esclusi nelle analisi. La

robustezza degli alberi ML è stata testata tramite 1000 repliche di bootstrap (Felsenstein, 1985). Gli alberi sono stati visualizzati con il programma TreeView (Page, 1996).

Tabella 1: Isolati utilizzati nelle analisi filogenetiche.

Specie	Ospite	Cod. campione	Cod. di accesso GenBank ITS
<i>Neonectria faginata</i>	<i>Fagus grandifolia</i>	CBS 217.67	HQ840385.1
<i>Neonectria faginata</i>	<i>F. grandifolia</i>	CBS 118983	KC660498.1
<i>Neonectria punicea</i>	<i>Rhamnus sp.</i>	CBS 242.29	KC660522.1
<i>Neonectria punicea</i>	<i>Frangula alnus</i>	CBS 119724	KC660496.1
<i>Neonectria ditissima</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	CBS 226.31	JF735309.1
<i>Neonectria ditissima</i>	<i>Salix cinerea</i>	CBS 835.97	JF735310.1
<i>Neonectria neomacrospora</i>	<i>Abies concolor</i>	CBS 324.61	JF735312.1
<i>Neonectria neomacrospora</i>	<i>Abies concolor</i>	CBS 198.62	AJ009255.1
<i>Neonectria candida</i>	<i>Malus sylvestris</i>	CBS 182.36	JF735314.1
<i>Neonectria candida</i>	<i>Malus sylvestris</i>	CBS 151.29	AY677291.1
<i>Neonectria coccinea</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	CBS 119158	JF268759.1
<i>Corinectria fuckeliana</i>	<i>Picea abies</i>	AR3103	HM364291.1

3.6 Saggi di patogenicità

I saggi di patogenicità sono stati effettuati su astoni di circa 2-4 cm di diametro e 50 cm di lunghezza, ottenuti da piante di faggio asintomatiche. Prima dell'inoculazione gli astoni sono stati disinfettati in superficie con alcool etilico al 90% e le due estremità sigillate con della cera.

Attraverso l'ausilio di un carotatore è stata effettuata un'incisione di circa 0,7 cm di diametro, asportata la corteccia, ed è stato quindi posizionato sulla lesione un dischetto di micelio e agar del patogeno prelevato da culture 5-7 giorni su PDA. Il punto di inoculo è stato quindi avvolto con del cotone idrofilo, inumidito con acqua distillata sterile e in fine avvolto con carta stagnola e sigillato con del nastro isolante. Cinque astoni sono stati inoculati con un dischetto di PDA sterile (testimone). La prova è stata effettuata utilizzando 10 repliche.

Una volta inoculati gli astoni sono stati posizionati all'interno di buste di plastica e incubate ad una temperatura di circa 25°C per 50 giorni. Trascorso tale periodo gli astoni sono stati scortecciati intorno al punto di inoculazione ed è stata misurata la lunghezza delle lesioni.

Il re-isolamento dei patogeni inoculati è stato effettuato trasferendo su piastre Petri contenenti PDA frammenti di corteccia prelevati dal margine della lesione necrotica presente su ciascun astone.

4. Risultati

4.1 Sintomatologia e diffusione della malattia

Dai sopralluoghi effettuati nelle faggete del Pian del Cansiglio è emerso che una vasta superficie, di rilevante valenza naturalistica, popolata da faggi di differente età, è interessata dalla presenza della malattia che ha assunto carattere endemico e sta progressivamente interessando l'intero soprassuolo arboreo.

In particolare, le piante di faggio, sia giovani che adulte, mostravano sintomi di un graduale declino vegetativo con disseccamenti più o meno ampi della chioma (Figura 6).

Le piante deperenti mostravano a livello delle branche ma soprattutto lungo il fusto, aree necrotiche più o meno ampie, cancri umidi per l'emissione di essudati brunastri (Figura 6), e cancri dalla tipica forma a bersaglio in vari stadi di sviluppo. In seguito alla rimozione dei tessuti corticali, tramite uno scalpello, erano visibili in corrispondenza dei cancri necrosi del legno di dimensioni maggiori rispetto a quella del cancro sovrastante (Figura 6, g – i). Osservate in sezione trasversale le necrosi in corrispondenza dei cancri si estendevano fino al midollo con una caratteristica forma a “V” (Figura 6, h).

Dal punto di vista fitosanitario è importante sottolineare la presenza di numerose piante con sbrancamenti o rottura del cimale in corrispondenza dei cancri (Figura 6, c).

Per quanto riguarda più nello specifico la diffusione della malattia, nel sito A il 100% delle piante erano sintomatiche e il 60% mostrava sintomi anche sulle branche, il 40% mostravano sintomi di disseccamento della chioma (Figura 7).

Nel sito B solo l'8% delle piante erano asintomatiche mentre il 92% mostrava cancri diffusi sulla chioma (Figura 7).

Nel sito C il 57,1% delle piante erano sintomatiche, l'8,6% asintomatiche e il 14,3% disseccate. Il 60% delle piante sintomatiche mostrava cancri anche sulle branche e disseccamenti diffusi (Figura 7).

Nel sito D il 22,2% delle piante erano asintomatiche, il 66,7% sintomatiche e l'11,1% disseccate. Il 42,9% delle piante sintomatiche presentava sia cancri sulle branche sia il cimale spezzato per stroncamento in prossimità di un cancro (Figura 7).



Figura 6: Piante di faggio con sintomi tipici della malattia: pianta disseccata con vistosi cancri a bersaglio (a), cancro circoscrivente il fusto (b), modificazione del fusto in seguito allo stroncamento del cimale originale in prossimità di un cancro (c), cancro in fase iniziale caratterizzato dalla presenza di essudati neri (d), cancro aperto con esposizione del durame (e), fusto profondamente alterato dalla presenza di un cancro (f), particolare delle necrosi interne associate a cancri da *Neonectria* (g,h,i).

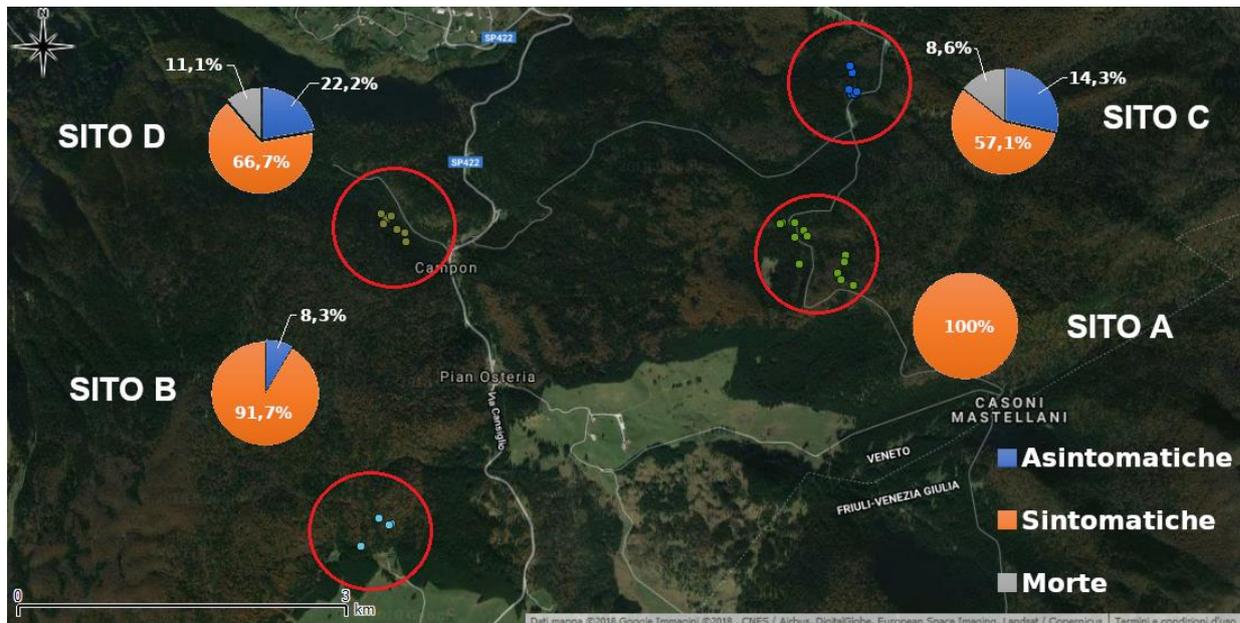


Figura 7: Incidenza della malattia nei siti di campionamento.

4.2 Eziologia

Dagli isolamenti effettuati sui 32 cancri prelevati dalle piante di faggio sintomatiche sono state ottenute complessivamente 24 colonie fungine che sulla base dei caratteri morfologici sono state suddivise in 5 gruppi appartenenti rispettivamente alle specie: *Neonectria coccinea* (31,3%), *Fusarium* sp. (18,7%), *Parapheospheria neglecta* (12,5%), *Pezicula livida* (9,3%) e *Pezicula sporulosa* (3,1%) (Figura 9 e 10).

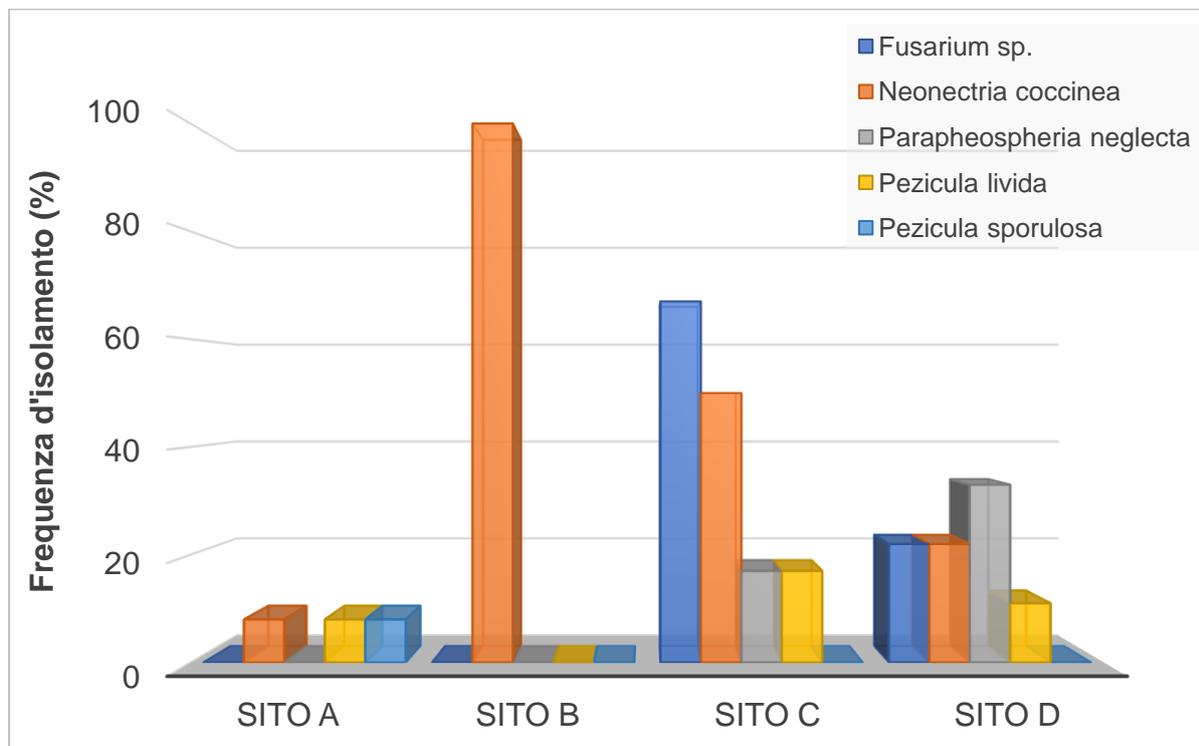


Figura 8: Frequenza d'isolamento degli isolati fungini nei 4 Siti.

4.2.1 Caratterizzazione morfologica

Gli isolati di *Neonectria coccinea* sono stati caratterizzati morfologicamente in accordo con Castlebury *et al.* (2006).

L'accrescimento miceliale delle colonie di *N. coccinea* variava ampiamente in funzione del substrato di crescita (Tabella 2). Su PDA le colone erano caratterizzate da un micelio radente chiaro-ambrato che, dopo 10-14 giorni di incubazione, differenziava screziature arancio-rossastre spesso settoriali (Figura 9, a). Su OA il micelio si sviluppava rapidamente e radente al substrato con una colorazione giallo-rossastra uniformemente distribuita nella colonia (Figura 9, b). Su CA il micelio era bianco con poche screziature radiali di colore giallo-rossastro (Figura 9, c). Su MEA l'accrescimento era lento con una pigmentazione giallo-rossastra spesso settoriale (Figura 9, d).

Tabella 2: Accrescimento diametrale delle colonie di *N. coccinea* dopo 14 giorni al buio a 25 °C.

	<i>OA</i>	<i>PDA</i>	<i>CA</i>	<i>MEA</i>
<i>N. coccinea</i>	>90 mm	65,96 mm	>90 mm	59,31 mm

Per quanto riguarda gli aspetti micro-morfologici le colonie di *N. coccinea* hanno differenziato cellule conidiogene di tipo mono-fialidico, con microconidi prodotti all'apice in agglomerati sferici (Figura 9, h-i). Su PDA sono stati osservati conidiofori ramificati (Figura 9, l). Nel micelio erano spesso presenti rigonfiamenti ifali caratterizzati dalla presenza di 4-5 clamidospore disposte in sequenza (Figura 9, e-f).

I microconidi molto abbondanti erano unicellulari, ialini, con estremità arrotondate. I macroconidi differenziati raramente in coltura erano 1-settati, ialini, con estremità arrotondate. (Figura 9, g). I microconidi misuravano (5,04-) 5,96-8,90 (-12,63) x (2,11-) 2,91-3,82 (-4,44) μm mentre i macroconidi (13,63-) 15,15-20,72 (-25,64) μm x (2,91-) 3,59-4,51 (-5,10) μm .

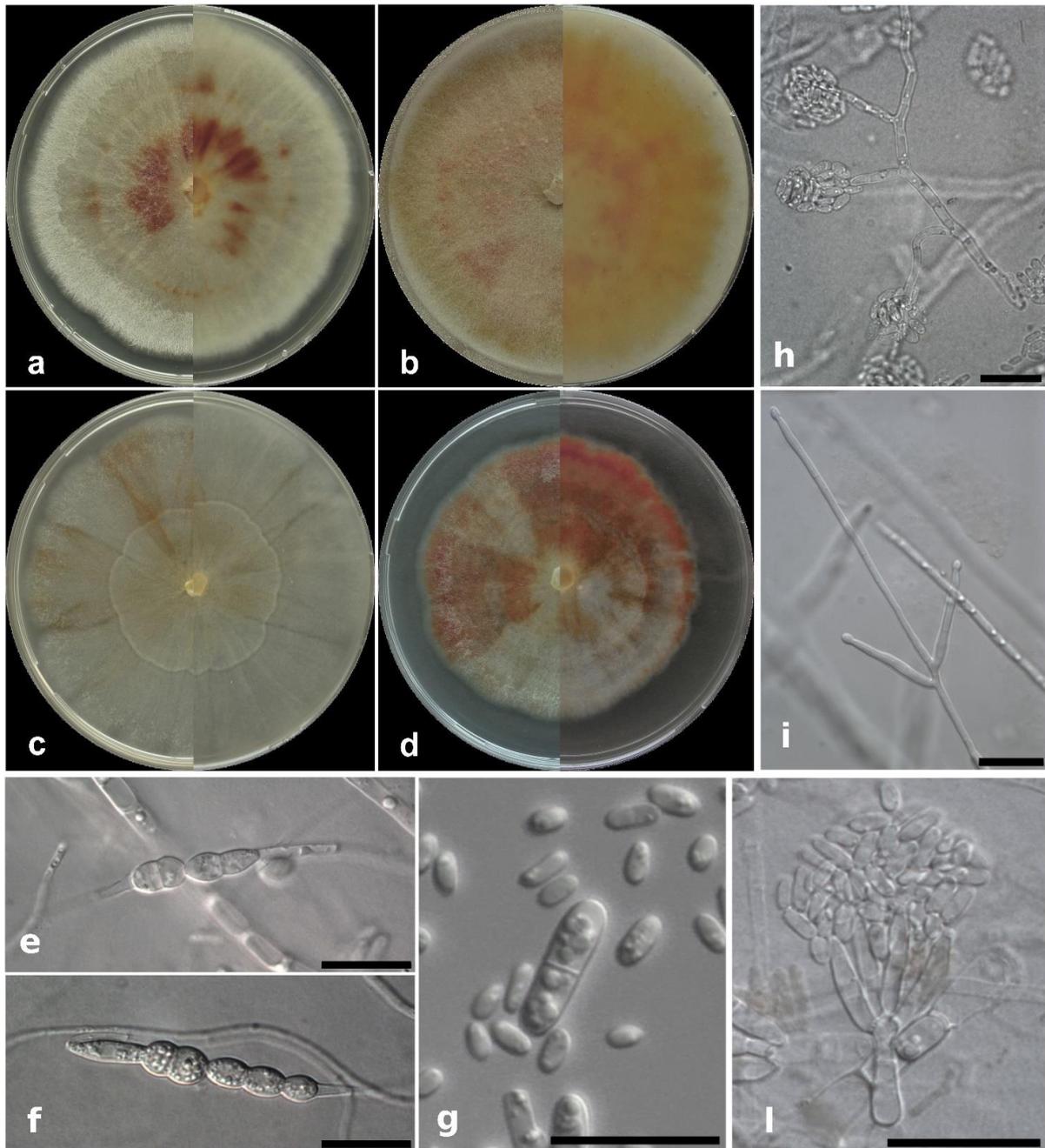


Figura 9: *Neonectria coccinea*: aspetto della colonia su PDA (a), OA (b), CA (c) e MEA (d) dopo 14 giorni a 25°C. Immagini microscopiche di clamidospore osservate su PDA (e-f), microconidi e macroconidi prodotti su SNA (g), ife con conidiofori (h), conidiofori in formazione (i), conidiofori ramificati (l). La barra di riferimento è di 20 μm .

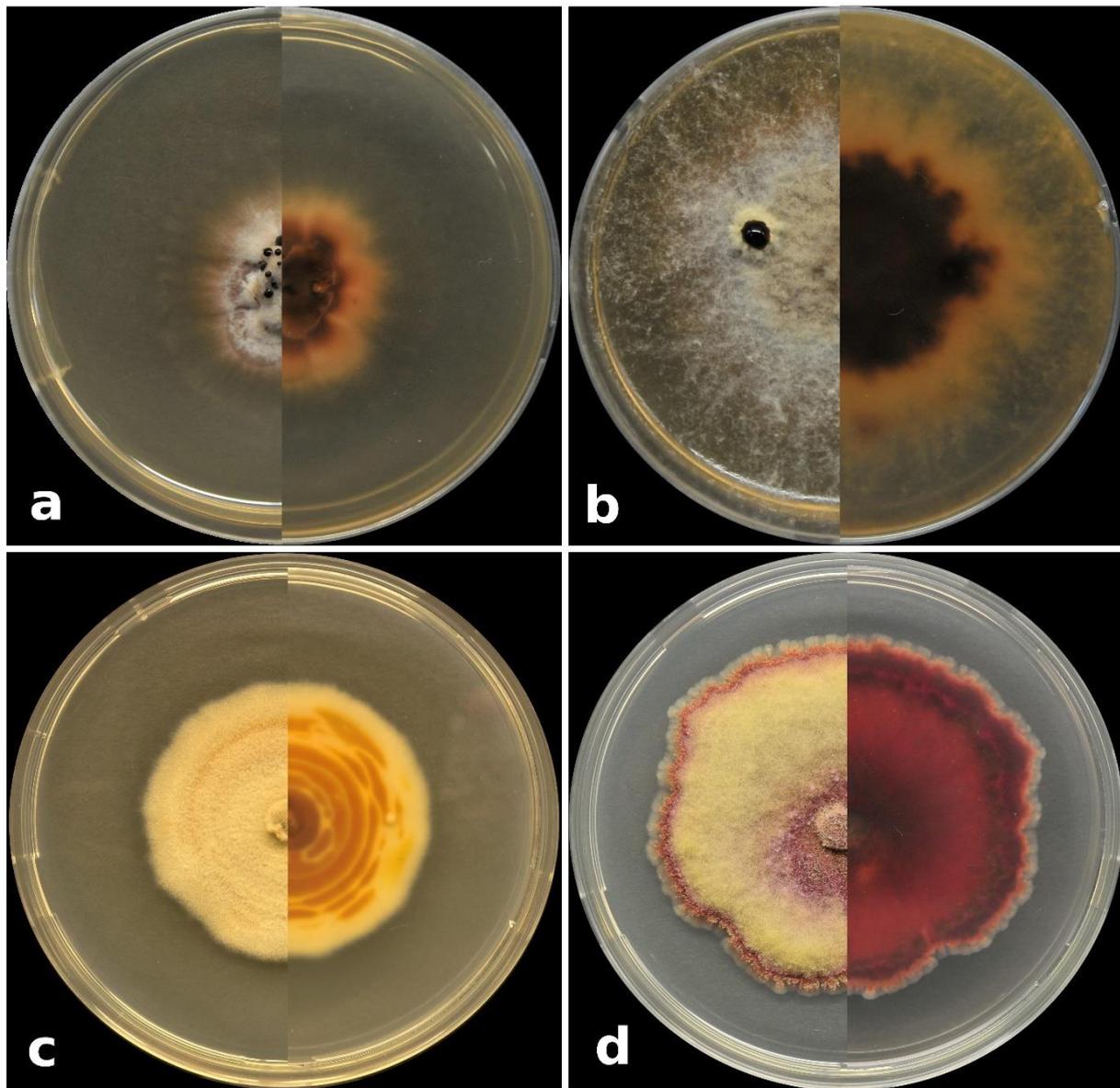


Figura 10: Aspetto delle colonie fronte e retro di *Pezicula sporulosa* (a), *Pezicula livida* (b), *Parapheospheria neglecta* (c), *Fusarium* sp. (d) su PDA.

4.2.2 Caratterizzazione molecolare

L'identificazione degli isolati di *Neonectria coccinea* è stata confermata attraverso l'analisi delle sequenze nucleotidiche della regione ITS dell'rDNA. Attraverso la reazione PCR sono stati ottenuti frammenti di circa 500 bp. La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze degli isolati di *Neonectria coccinea* depositati in GenBank tra cui la sequenza dell'isolato tipo CBS 119158.

L'identificazione è stata inoltre confermata dall'analisi filogenetica. Nello specifico l'analisi ML condotta utilizzando le sequenze della regione ITS, ha prodotto un albero filogenetico con una distribuzione spaziale dei clade in funzione delle differenti specie esaminate (Figura 11).

Gli isolati ottenuti in questo studio si inserivano in un sub-clade unitamente con l'isolato tipo della specie.

Anche per le altre specie fungine ottenute nel corso delle indagini l'identificazione è stata confermata attraverso il confronto delle sequenze ITS con quelle depositate in GenBank (Tabella 3).

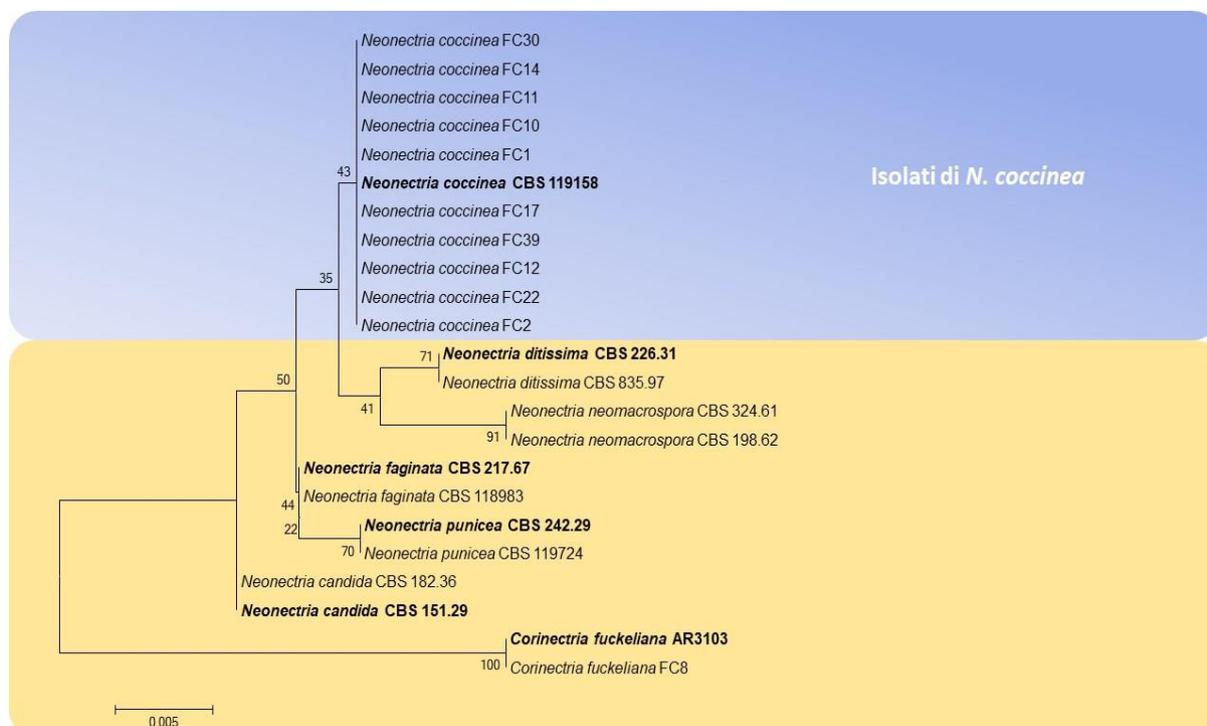


Figura 11: Relazioni evolutive dei taxa di *Neonectria*. L'albero filogenetico è stato prodotto utilizzando il metodo Neighbor-Joining (Saitou *et al.*, 1987). I valori di bootstrap (1000 repliche) sono riportati ai nodi (Felsenstein, 1985). L'albero è in scala e le distanze evolutive sono state calcolate usando il metodo della Massima Verosimiglianza (Tamura *et al.*, 2004). In grassetto l'isolato tipo di ciascuna specie.

Tabella 3: Valori di identità ottenuti tramite la *Blast Analysis* per gli isolati di *Fusarium* sp., *Parapheospheria neglecta*, *Pezicula livida* e *Pezicula sporulosa*.

Specie fungina	Frequenza	Identità	Cod. di accesso GenBank	ITS
<i>Pezicula sporulosa</i>	1	99%	CBS 224.96	NR_137161
<i>Pezicula livida</i>	3	100%	CBS 939.70	KR859162
<i>Fusarium</i> sp.	2	100%	-	-
<i>Parapheospheria neglecta</i>	4	100%	CBS 124078	NR_155629

4.3 Saggi di patogenicità

Cinquanta giorni dopo l'inoculazione, tutti gli astoni di faggio infettati con l'isolato FC12 di *N. coccinea* mostravano in prossimità del punto di inoculo ampie lesioni necrotiche nei tessuti corticali e legnosi con margine ben definito.

Gli astoni testimoni, inoculati solo con un frammento di PDA sterile, mostravano un piccolo imbrunimento superficiale in prossimità del punto di inoculo (Figura 12 e 13).

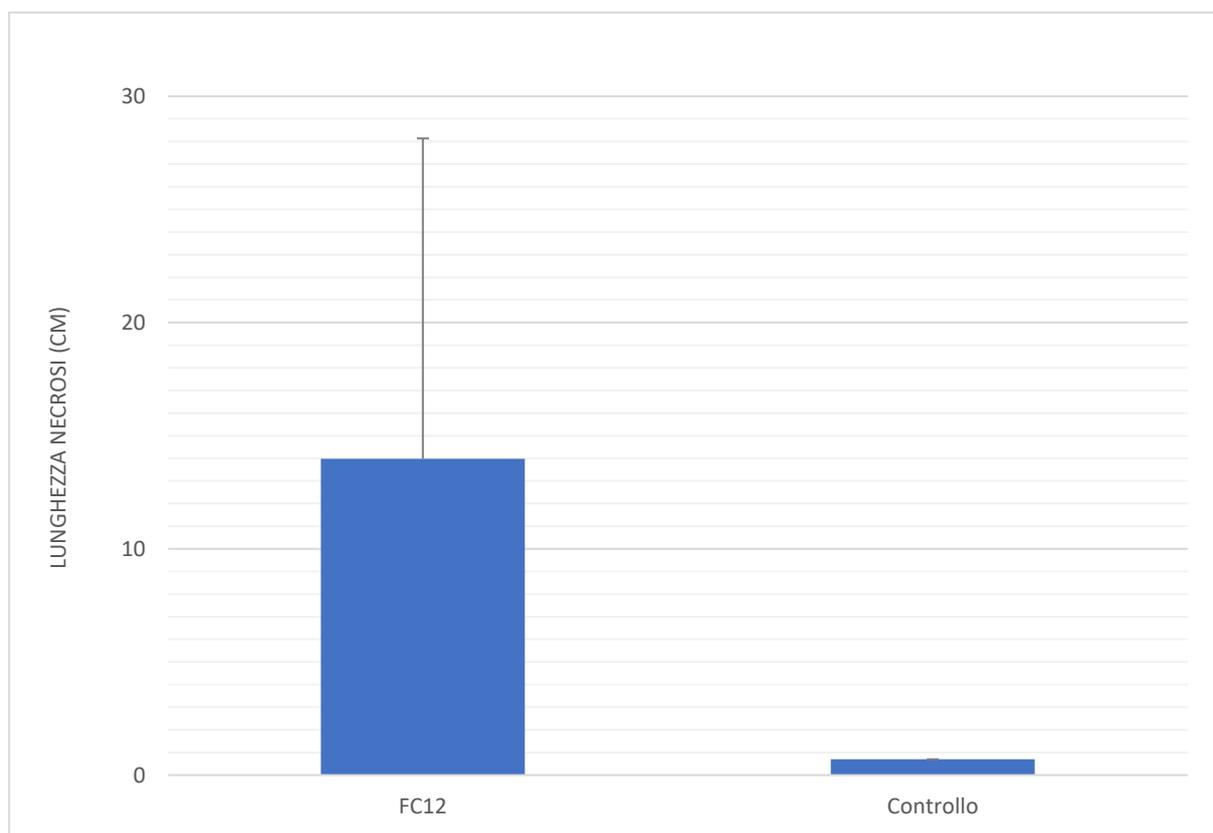


Figura 12: Lunghezza delle necrosi causate dall'isolato FC12 di *N. coccinea* su astoni di faggio. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

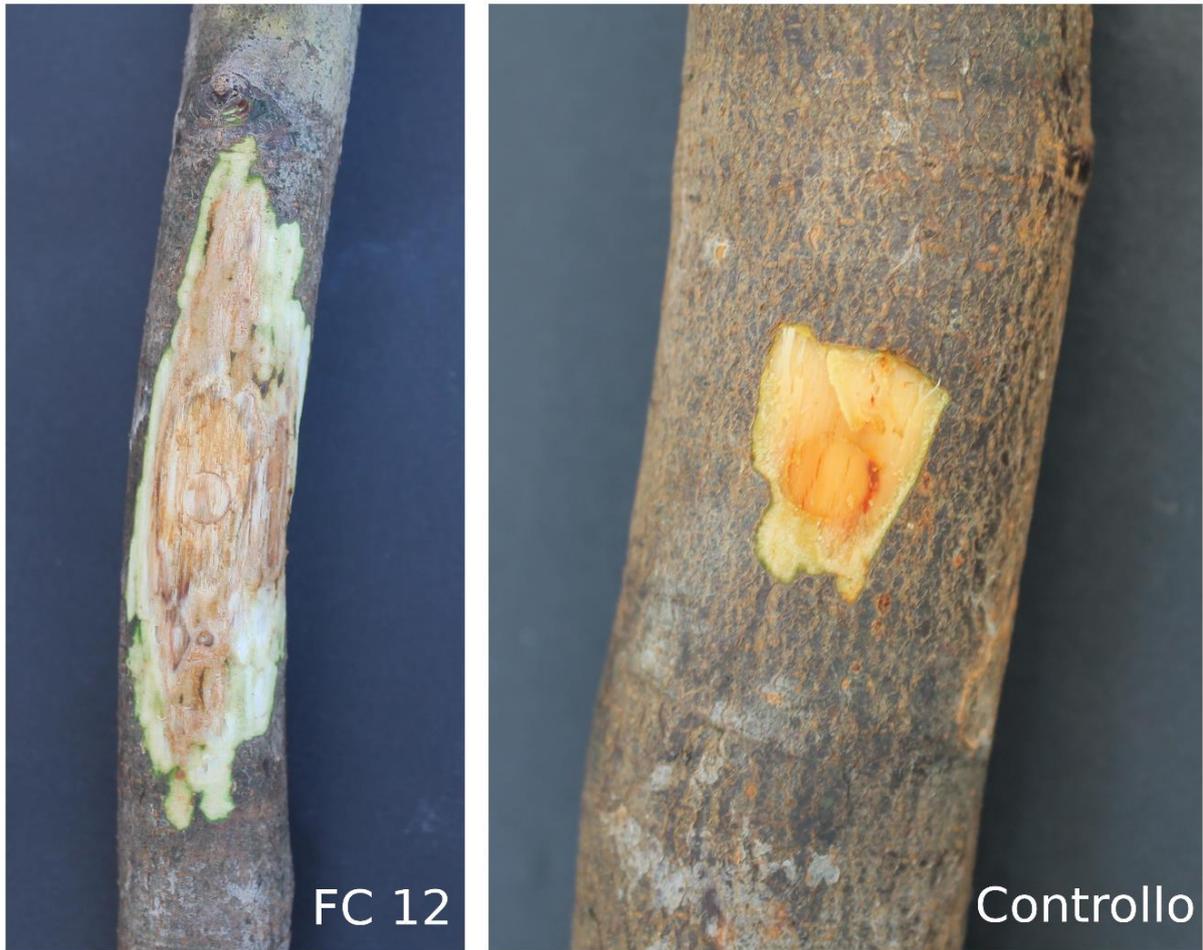


Figura 13: Necrosi sottocorticali causate dall'isolato FC 12 di *Neonectria coccinea* su astoni di faggio. A destra il controllo con un piccolo imbrunimento confinato al punto di inoculo.

5. Discussione e conclusioni

Le ricerche condotte nell'ambito di questa tesi hanno permesso di ampliare le conoscenze sulla presenza e diffusione del cancro del faggio in Veneto, e di identificare e caratterizzare il patogeno, completando gli obiettivi prefissati.

L'attività di monitoraggio ha consentito di individuare la presenza diffusa su tutto l'areale del Cansiglio di piante di faggio con i sintomi tipici della malattia, i cancri aperti a bersaglio. Le piante sintomatiche mostravano un generale stato di declino vegetativo. Allo stesso tempo la loro stabilità meccanica era spesso compromessa a causa dei cancri. Infatti, in tutti i siti è stata riscontrata la presenza di piante con rami, branche e/o il cimale spezzati in prossimità dei cancri.

Anche se i focolai infettivi (*hot-spot*) erano ampiamente diffusi su tutto il territorio, nel complesso è emerso un basso livello di mortalità delle piante. Questi focolai, spesso di notevole estensione, comprendono un elevato numero di piante sintomatiche e una bassa percentuale di piante morte, distribuite *at random*. Questo quadro epidemiologico delinea un carattere endemico della malattia nel Pian del Cansiglio. Questa natura endemica è in accordo con quanto riportato in letteratura per gli altri paesi Europei dove la malattia è presente (Cale *et al.*, 2017; Hirooka *et al.*, 2013).

Il carattere endemico è probabilmente dovuto al coinvolgimento di una sola specie nell'eziologia della malattia, la *Neonectria coccinea*. Mentre in Nord America dove la malattia è caratterizzata da un andamento epidemico sono due le specie coinvolte, la *N. faginata* e la *N. ditissima*.

Dai cancri esaminati oltre a *Neonectria coccinea* sono state isolate, anche se con minore frequenza, altre 4 specie fungine. *Fusarium avenaceum* è un patogeno polifago e cosmopolita già riportato su semenzali di faggio in Polonia (Okorski *et al.*, 2015), mentre *Pezizula livida* è stata isolata come endofita su faggio in Italia (Danti *et al.*, 2002). Il genere *Pezizula* include al suo interno numerose specie ad habitus endofitico con attitudine parassitaria (Sieber, 2007). Sono necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo di questi microrganismi nell'eziologia della malattia ed un eventuale effetto sinergico con *Neonectria coccinea*.

In conclusione, i risultati ottenuti nell'ambito di questa tesi hanno consentito di ampliare le conoscenze sulla bio-ecologia della *Neonectria coccinea*, una specie per la quale le conoscenze scientifiche sono ancora limitate e lacunose; conoscenze che meriterebbero di essere ulteriormente investigate soprattutto per quanto riguarda le barriere e i corridoi naturali che possono impedirne e/o favorirne l'insediamento, lo sviluppo e la diffusione nelle faggete italiane. Dal punto di vista epidemiologico sarebbe inoltre interessante studiare se esiste una

eventuale interazione tra *N. coccinea* e l'insetto *C. fagisuga* rinvenuto nel Pian del Cansiglio da Gwiazdowski *et al.* (2015). Risposte concrete in tal senso sono essenziali per poter definire interventi efficaci e linee guida di salvaguardia della biodiversità di questi importanti ecosistemi forestali.

6. Bibliografia

- ❖ Amponsah, N. T., B. M. Fisher, M. Walter, L. Frijters, D. I. Hedderley, and R. W.A. Scheper. 2016. “Hot Water Disinfection Treatment to Eliminate *Neonectria Ditissima* Latent Infections in Apple Scion Wood.” *New Zealand Plant Protection* 69 (October): 221–29.
- ❖ Baum, Sebastian, Thomas N. Sieber, Francis W. M. R. Schwarze, and Siegfried Fink. 2003. “Latent Infections of *Fomes Fomentarius* in the Xylem of European Beech (*Fagus Sylvatica*).” *Mycological Progress* 2 (2): 141–48. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0052-5>.
- ❖ Bernetti, Giovanni. 1995. *Selvicoltura Speciale*. Edited by UTET.
- ❖ Bernetti, Giovanni. 2015. *Le Piante Del Bosco. Forme, Vita e Gestione*. Edited by Compagnia delle foreste.
- ❖ Bessega, Annalisa. 2008. “Evoluzione Storica Delle Tecniche Selvicolturali Nella Foresta Del Cansiglio.” *Università Degli Studi Di Udine*.
- ❖ Cale, J. A., S. K. Letkowski, S. A. Teale, and J. D. Castello. 2012. “Beech Bark Disease: An Evaluation of the Predisposition Hypothesis in an Aftermath Forest.” *Forest Pathology* 42 (1): 52–56. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2011.00722.x>
- ❖ Cale, Jonathan A., Mariann T. Garrison-Johnston, Stephen A. Teale, and John D. Castello. 2017. “Beech Bark Disease in North America: Over a Century of Research Revisited.” *Forest Ecology and Management* 394: 86–103. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.03.031>.
- ❖ Capretti, Paolo, and Alessandro Ragazzi. 2009. *Elementi Di Patologia Forestale*. Edited by Pàtron.
- ❖ Castlebury, Lisa A., Amy Y. Rossman, and Aimee S. Hyten. 2006. “Phylogenetic Relationships of *Neonectria/Cylindrocarpon* on *Fagus* in North America Mention of Trade Names or Commercial Products in This Article Is Solely for the Purpose of Providing Specific Information and Does Not Imply Recommendation or E.” *Canadian Journal of Botany* 84 (9): 1417–33. <https://doi.org/10.1139/b06-105>.
- ❖ Caudullo, G., Welk, E., San-Miguel-Ayanz, J., 2017. Chorological maps for the main European woody species. *Data in Brief* 12, 662-666. DOI: doi.org/10.1016/j.dib.2017.05.007
- ❖ Chapela, I H, and Lynne Boddy. 1988. “Different Moisture Regimes Fungal Colonization of Attached Beech Branches” 110 (1): 47–57.
- ❖ Chaverri, P., C. Salgado, Y. Hirooka, A. Y. Rossman, and G. J. Samuels. 2011. “Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and Related Genera with *Cylindrocarpon*-like Anamorphs.” *Studies in Mycology* 68: 57–78. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.68.03>.
- ❖ Danti, Roberto, Thomas N. Sieber, and Giovanni Sanguineti. 2002. “Endophytic Mycobiota in Bark of European Beech (*Fagus Sylvatica*) in the Apennines.” *Mycological Research* 106 (11): 1343–48. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006779>.
- ❖ Del Favero, Roberto. 2004. *Boschi Delle Regioni Alpine Italiane. Tipologia, Funzionamento, Selvicoltura*. Edited by CLEUP.
- ❖ Del Favero, Roberto. 2008. *Boschi Delle Regioni Meridionali Ed Insulari d’Italia*. Edited by CLEUP.
- ❖ Erlich, John. 1934. “The Beech Bark Disease: A Nectria Disease of *Fagus*, Following *Cryptococcus Fagi* (Baer.).” *Canadian Journal of Research* 10: 593–692. <https://doi.org/10.1139/cjr34-070>
- ❖ Felsenstein J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.
- ❖ Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

- ❖ Gellini, Romano, and Paolo Grossoni. 1998. *Botanica Forestale*. Vol.2 - Angiosperme. Edited by CEDAM.
- ❖ González, Cristian D., and Priscila Chaverri. 2017. “Corinetria, a New Genus to Accommodate *Neonectria Fuckeliana* and *C. Constricta* Sp. Nov. from *Pinus Radiata* in Chile.” *Mycological Progress* 16 (11–12): 1015–27. <https://doi.org/10.1007/s11557-017-1343-8>.
- ❖ Granata, G, and A Sidoti. 2004. “Biscogniauxia Nummularia: Pathogenic Agent of a Beech Decline.” *For Pathol* 34: 363–67.
- ❖ Granata, G, and J.S.A Whalley. 1994. “Decline of Beech Associated to Biscogniauxia Nummularia in Italy.” *Petria* 4: 111–16.
- ❖ Gwiazdowski, Rodger A., Roy G. Van Driesche, Adrienne Desnoyers, Suzanne Lyon, San an Wu, Naotoa Kamata, and Benjamin B. Normark. 2006. “Possible Geographic Origin of Beech Scale, *Cryptococcus Fagisuga* (Hemiptera: Eriococcidae), an Invasive Pest in North America.” *Biological Control* 39 (1): 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.04.009>.
- ❖ Hendry, Steven J., Lynne Boddy, and D. Lonsdale. 2002. “Abiotic Variables Effect Differential Expression of Latent Infections in Beech (*Fagus Sylvatica*).” *New Phytologist* 155 (3): 449–60. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00473.x>.
- ❖ Hirooka, Yuuri, Amy Y. Rossman, Wen-Ying Zhuang, Catalina Salgado-salazar, and Priscila Chaverri. 2013. “Species Delimitation for *Neonectria Coccinea* Group Including the Causal Agents of Beech Bark Disease in Asia, Europe, and North America.” *Mycosystema* 32 (May): 485–517.
- ❖ Houston DR, Valentine HT 1988 Beech bark disease: the temporal pattern of cankering in aftermath forests of Maine. *Canadian Journal of Forest Research*, 18, 38–42.
- ❖ Houston Durrant, T., D. de Rigo, and G Caudullo. 2016. “*Fagus Sylvatica* and Other Beeches in Europe: Distribution, Habitat, Usage and Threats.” *European Atlas of Forest Tree Species*, no. April: 130–31. <https://doi.org/10.2788/038466>.
- ❖ Houston, D.B., Houston, D.R., 1994. Variation in American beech (*Fagus grandifolia* Ehrh.): isozyme analysis of genetic structure in selected stands. *Silvae Genet.*43, 277–284.
- ❖ Ingold, C.T., and H. J. Hudson. 1993. *The Biology of Fungi*. Chapman &. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-1496-7>.
- ❖ Japoshvili, George, Michael Fizdale, Roy G Van Driesche, and Giorgi Kirkitadze. 2015. “Comparative Phenology and Cohort Survival of Beech Scale (Hemiptera: Eriococcidae) in Part of Its Native Range (Caucasus Mountains, Georgia) and in an Invaded Area (Massachusetts, USA).” *Florida Entomologist* 98 (4): 1193–98. <https://doi.org/10.1653/024.098.0427>.
- ❖ Jung, T. 2009. “Beech Decline in Central Europe Driven by the Interaction between Phytophthora Infections and Climatic Extremes.” *Forest Pathology* 39 (2): 73–94. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2008.00566.x>.
- ❖ Kasson, Matthew T., and William H. Livingston. 2009. “Spatial Distribution of *Neonectria* Species Associated with Beech Bark Disease in Northern Maine.” *Mycologia* 101 (2): 190–95. <https://doi.org/10.3852/08-165>.
- ❖ Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- ❖ Linaldeddu B.T., Franceschini A., Alves A., Phillips A.J.L. (2013). *Diplodia quercivora* sp. nov.: a new species of *Diplodia* found on declining *Quercus canariensis* trees in Tunisia. *Mycologia* 105 (5): 1266-1274.
- ❖ Lombard, L., N. A. van der Merwe, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2015. “Generic Concepts in Nectriaceae.” *Studies in Mycology* 80: 189–245. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.002>.

- ❖ Luchi, N., P. Capretti, A. M. Vettraino, A. Vannini, P. Pinzani, and M. Pazzagli. 2006. “Early Detection of *Biscogniauxia nummularia* in Symptomless European Beech (*Fagus sylvatica* L.) by TaqMan™ Quantitative Real-Time PCR.” *Letters in Applied Microbiology* 43 (1): 33–38. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01920.x>.
- ❖ Montecchio, L., L. Scattolin, and R. De Battisti. 2011. “Dormouse Injuries Predispose Beech to Infection by *Neonectria ditissima*.” *Forest Pathology* 41 (2): 114–19. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2010.00643.x>.
- ❖ Nirenberg, H., 1976. Untersuchungen über die Morphologische und Biologische Differenzierung in der Fusarium-Sektion *Liseola*. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstw. Berlin-Dahlem, 169: 1-116.
- ❖ Okorski A, A Pszczółkowska, S Okorska, and G Fordoński. 2015. “First Report of *Fagus sylvatica* Infection by *Fusarium avenaceum* in Forest Container Nurseries in Northeastern Poland.” *Plant Disease* 99 (0191-2917): 420. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0899-PDN>.
- ❖ Page R.D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357-358.
- ❖ Rodriguez F., Oliver J.F., Marin A., Medina J.R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitutions. *Journal of Theoretical Biology* 142, 485-501.
- ❖ Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- ❖ Service, Canadian Forest. 2011. “Atlantic Forestry Centre – Making a Difference,” no. 61.
- ❖ Shigo Alex L. 1972; The Beech Bark Disease Today in the Northeastern U.S., *Journal of Forestry*, Pages 286–289, <https://doi.org/10.1093/jof/70.5.286>
- ❖ Song, Zewei, Peter G. Kennedy, Feng J. Liew, and Jonathan S. Schilling. 2017. “Fungal Endophytes as Priority Colonizers Initiating Wood Decomposition.” *Functional Ecology* 31 (2): 407–18. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12735>.
- ❖ Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- ❖ Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
- ❖ Wainhouse, D. 1980. Dispersal of first instar larvae of the felted beech scale, *Cryptococcus fagisuga*. *Journal of Applied Ecology*, 523-532.
- ❖ Weber, R.W.S. 2014. “Biology and Control of the Apple Canker Fungus *Neonectria ditissima* (Syn. *N. Galligena*) from a Northwestern European Perspective.” *Erwerbs-Obstbau* 56 (3): 95–107. <https://doi.org/10.1007/s10341-014-0210-x>.
- ❖ White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplified and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*.
- ❖ Zabel, A. Robert, Savel B Silverborg, and Marvin E Fowler. 1958. “A Survey Of Forest Tree Diseases In the Northeast-1957.”

7. Sitografia

<http://www.unipd.it/esterni/wwwfitfo/>

<http://www.entom.unibo.it/Insetti%20Alberi/Faggio/R.%20fagi.htm>

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

<http://cimbridelcansiglio.it/>

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

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

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/?>

http://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/Guida_riserve_naturali_SC44/Guida_alle_riservenaturali_SC44_1_PiaieLonghe.pdf

http://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/Guida_riserve_naturali_SC44/Guida_alle_riservenaturali_SC44_2_Pian_di_Landro.pdf

<http://idt.regione.veneto.it/app/metacatalog/index?deflevel=165>

<https://www.forestryimages.org>

<https://scihub.copernicus.eu/dhus/#/home>

ALLEGATI

ALLEGATO 1. Tabella di campionamento

SITO	ID PIANTA	Coordinate	Tipo forestale	Elevazione [m]	Diametro [cm]	Circonferenza [cm]
A	1	46°6'16,24 N 12°25'37,52" E	Pecceta secondaria montana	1130	8,28	26
A	2	46°5'56,65 N 12°26'6,46" E	Pecceta secondaria montana	1120	10,64	33,4
A	3	46°5'56,72 N 12°26'6,46" E	Pecceta secondaria montana	1096	2,87	9
A	4	46°5'56,88" N 12°26'7,23" E	Pecceta secondaria montana	1094	10,96	34,4
A	5	46°5'56,97" N 12°26'10,81" E	Pecceta secondaria montana	1089	11,31	35,5
A	6	46°5'53,88" N 12°26'10,89" E	Pecceta secondaria montana	1071	14,17	44,5
A	7	46°5'55,32" N 12°26'13,54" E	Abietetto eso-mesal- pico montano	1088	12,74	40
A	8	46°5'54,32" N 12°26'14,54" E	Abietetto eso-mesal- pico montano	1097	8,92	28
A	9	46°5'50,30" N 12°26'24,73" E	Abietetto eso-mesal- pico montano	1118	29,14	91,5
A	10	46°5'48,54" N 12°26'25,55" E	Abietetto eso-mesal- pico montano	1120	15,45	48,5
A	11	46°5'46,63" N 12°26'23,46" E	Faggeta montata ti- pica eso-mesalpica	1116	14,33	45
A	12	46°5'45,11" N 12°26'24,26" E	Faggeta montata ti- pica eso-mesalpica	1106	12,1	38
A	13	46°5'44,04" N 12°26'27,91" E	Faggeta montata ti- pica eso-mesalpica	1103	13,44	42,2
A	Abete Rosso	46°5'56,68" N 12°26'6,54" E	Faggeta montata ti- pica eso-mesalpica	1109	14,17	44,5
B	1	46°4'50,15" N 12°24'2,62" E	Abietetto eso-mesal- pico montano	1111	9,87	31
B	2	46°4'55,98" N 12°24'7,98" E	Faggeta montata ti- pica eso-mesalpica	1122	46,18	145
B	3	46°4'54,87"N 12°24'11,50"E	Faggeta montata ti- pica eso-mesalpica	1130	48,73	153
B	4	46°4'54,67" N 12°24'10,99" E	Faggeta montata ti- pica eso-mesalpica	1153	4,46	14
C	1	46°6'23,47" N 12°26'27,48" E	Faggeta montata ti- pica eso-mesalpica	1074	13,38	42
C	2	46°6'23,59" N 12°26'28,46" E	Faggeta montata ti- pica eso-mesalpica	1077	13,69	43

C	3	46°6'24,45" N 12°26'26,67" E	Faggeta montata tipica eso-mesalpica	1075	6,69	21
C	4	46°6'23,96" N 12°26'28,97" E	Faggeta montata tipica eso-mesalpica	1077	8,28	26
C	5	46°6'28,00" N 12°26'27,60" E	Pecceta secondaria montana	1069	2,87	9
C	6	46°6'29,24" N 12°26'27,05" E	Faggeta montata tipica eso-mesalpica	1067	4,46	14
D	1	46°6'6,46" N 12°24'29,96" E	Abieteto eso-mesalpico montano	1048	11,46	36
D	2	46°6'6,58" N 12°24'26,08" E	Abieteto eso-mesalpico montano	1058	7,64	24
D	3	46°5'57,80"N 12°24'9,74"E	Abieteto eso-mesalpico montano	1112	5,25	16,5
D	4	46°5'56,72" N 12°24'9,20" E	Abieteto eso-mesalpico montano	1111	11,31	35,5
D	5	46°5'58,36"N 12°24'11,42"E	Abieteto eso-mesalpico montano	1115	5,57	17,5
D	6	46°5'58,87" N 12°24'8,60" E	Abieteto eso-mesalpico montano	1111	6,05	19
D	7	46°5'54,90"N 12°24'15,56"E	Abieteto eso-mesalpico montano	1058	8,92	28
D	8	46°5'52,94" N 12°24'15,78" E	Abieteto eso-mesalpico montano	1070	8,28	26
D	9	46°5'55,53" N 12°24'13,07" E	Abieteto eso-mesalpico montano	1115	6,37	20

ALLEGATO 2. Sequenze nucleotidiche (formato FASTA) usate nelle analisi molecolari

>*Neonectria_coccinea*_FC1

```
GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCATCGTTGCCTCGGCGGGCCCCG
CTCCGGCGGGCCCGCCAGAGGACCCCAAACTCTTTGTTTATTACAGTATCTTCTGAGTAACACGATT
AAATAAATCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCCGGGGCTTGGTGTGGGG
ATC
```

>*Neonectria_coccinea*_FC2

```
GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCATCGTTGCCTCGGCGGGCCCCG
CTCCGGCGGGCCCGCCAGAGGACCCCAAACTCTTTGTTTATTACAGTATCTTCTGAGTAACACGATT
AAATAAATCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCCGGGGCTTGGTGTGGGG
ATCGG
```

>*Neonectria_coccinea*_FC10

```
GATCATTACCGAGYTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCATCGTTGCCTCGGCGGGCCCCG
CTCCGGCGGGCCCGCCAGAGGACCCCAAACTCTTTGTTTATTACAGTATCTTCTGAGTAACACGATT
AAATAAATCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCCGGGGCTTGGTGTGGGG
ATC
```

>*Neonectria_coccinea*_FC11

```
GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCATCGTTGCCTCGGCGGGCCCCG
CTCCGGCGGGCCCGCCAGAGGACCCCAAACTCTTTGTTTATTACAGTATCTTCTGAGTAACACGATT
AAATAAATCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCCGGGGCTTGGTGTGGGG
ATC
```

>*Neonectria_coccinea*_FC12

```
GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCATCGTTGCCTCGGCGGGCCCCG
CTCCGGCGGGCCCGCCAGAGGACCCCAAACTCTTTGTTTATTACAGTATCTTCTGAGTAACACGATT
AAATAAATCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCCGGGGCTTGGTGTGGGG
ATCGGCCCCCCCCCGGGCGGGCCGTCCCCCAAATCCAGTGGCGGTCTCGCTGCAGTCTCTCCCGC
GTAGTAGCAAACTCGCGCTGGAGCGCAGCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCCACTTCTGAAAGGT
TGACCTCGG
```

>*Neonectria_coccinea*_FC14

```
GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCATCGTTGCCTCGGCGGGCCCCG
CTCCGGCGGGCCCGCCAGAGGACCCCAAACTCTTTGTTTATTACAGTATCTTCTGAGTAACACGATT
AAATAAATCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCCGGGGCTTGGTGTGGGG
ATCG
```

>*Neonectria_coccinea*_FC17

```
GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCATCGTTGCCTCGGCGGGCCCCG
CTCCGGCGGGCCCGCCAGAGGACCCCAAACTCTTTGTTTATTACAGTATCTTCTGAGTAACACGATT
AAATAAATCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCCGGGGCTTGGTGTGGGG
ATCGGCCCCCCCCCGGGCGGGCCGTCCCCCAAATCCAGTGGCGGTCTCGCTGCAGTCTCTCCCGC
GTAGTAGCAAACTCGCGCTGGAGCGCAGCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCCACTTCTGAAAGGT
TGACCTCGG
```

>*Neonectria_coccinea_FC2*

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCATCGTTGCCTCGGCGGGCGCCG
CTCCGGCGGGCCGAGAGGACCCCAAACCTCTTTGTTTATTACAGTATCTTCTGAGTAACACGATT
AAATAAATCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCCCCGGGCTTGGTGTGGGG
ATC

>*Neonectria_coccinea_FC30*

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCATCGTTGCCTCGGCGGGCGCCG
CTCCGGCGGGCCGAGAGGACCCCAAACCTCTTTGTTTATTACAGTATCTTCTGAGTAACACGATT
AAATAAATCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCCCCGGGCTTGGTGTGGGG
ATCG

>*Neonectria_coccinea_FC39*

CGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCATCGTTGCCTCGGCGGYGCCCGCTCCGCGG
CCCGCCAGAGGACCCCAAACCTCTTTGTTTATTACAGTATCTTCTGAGTAACACGATTAAYAAATC
AAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGG
CGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCCCCGGGCTTGGTGTGGGGATCGCCCCG
CCCCCGCGGGGGCCGTCACCAATCCAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCTCCGCGTAGTAGCA
ACACTCGCGCTGGAGCGCAGCGCGGCCACGCCGTTAAA

>*Pezicula_sporulosa_FC3*

GATCATTACAGAGACTCTGCCCTTTGGGTAGACCTCCCACCCTGTGTCGTTATACCTTTGTTGCTTTG
GCGGGCCGCGGGGCTCCGGCCCTGCCCTGGCTCCGGCTAGGGCGCGCCCGCCAGAGGACTCCAAA
ACCTGAATGTTAGTGTCTGCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTT
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACA
ACCCTCAAGCTCTGCTTGGCCTTGGGCGTCACCGGTCCCCGGTGTGCCTTAAAACAGTGGCGGGCGC
CGTCTGGCTCTAAGCGTAGTAAAACACTCTCGCTACAGACGCCCGGGGATGCTGGCCAGCAACCCCA
CAATCTATCAAGGTTGACCTCGG

> *Pezicula_livida_FC4*

GATCATTACAGAGACTCTGCCCTTTGGGTAGACCTCCCACCCTGTGTCGTTATACCTTTGTTGCTTTG
GCGGGCCGCGGGGCTCCGGCCCTGCCCTGGCTCCGGCTAGGGCGTGCCCGCCAGAGGACTCCAAA
ACCTGAATGTTAGTGTCTGCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTT
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACA
CCCTCAAGCTCTGCTTGGTCTTGGGCGTCACCGGTCCCCGGTGTGCCTTAAAACAGTGGCGGGCGC
ATCTGGCTCTAAGCGTAGTACATACTCTCGCTACAGACGCCCGGTGGATGCTGGCCAGCAACCCCA
ATCTATCAAGGTTGACCTCGG

> *Parapheospheria_neglecta_FC15*

GATCATTATCCATCTCAAACCAGGTGCGGTGCGGGCCCCCGGGGGCTTGTCCCGGGTGGTAGGGG
TAACACCTGCACGCGCCGCCTGCCTGTACCCTTTTTTACGAGCACCTTTTCGTTCTCCTTCGGCGGGG
CAACCTGCCGCTGGAACCAAAAACAAAACCTTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATACAAACAA
TCGTTACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATT
CCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGCGTCTGTCC
CGCCTCTGCGCGCGGACTCGCCCCAAATTCATTGGCAGCGGTCTTTGCCTCCTCTCGCGCAGCACAA
TTGCGTCTGCGGGGGGGCGTGGCCCCGCTCCACGAAGCAACATTACCGTCTTTGACCTCGG

> *Parapheospheria_neglecta_FC29*

GATCATTATCCATCTCAAACCAGGTGCGGTGCGGGCCCCCGGGGGCTTGTCCCGGGTGGTAGGGG
TAACACCTGCACGCGCCGCCTGCCTGTACCCTTTTTTACGAGCACCTTTTCGTTCTCCTTCGGCGGGG
CAACCTGCCGCTGGAACCAAAAACAAAACCTTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATACAAATAA
TCGTTACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATT
CCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGCGTCTGTCC
CGCCTCTGCGCGCGGACTCGCCCCAAATTCATTGGCAGCGGTCTTTGCCTCCTCTCGCGCAGCACAA
TTGCGTCTGCGGGGGGGCGTGGCCCCGCTCCACGAAGCAACATTACCGTCTTTGACCTCGG

> *Parapheospheria_neglecta_FC32*

GATCATTATCCATCTCAAACCAGGTGCGGTGCGGGCCCCCGGGGGCTTGCTCCCGGGTGGTAGGGG
TAACACCCGCACGCGCCCTGCCTGTACCCTCTTTTACGAGCACCTTTCGTTCTCCTTCGGCGGGG
CAACCTGCCGCTGGAACCAAAAACAAAACCTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATACAAACAA
TCGTTACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATT
CCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCGTCTGTCC
CGCCTCTGCGCGCGGACTCGCCCCAAATTCATTGGCAGCGGTCTTGCCTCCTCTCGCGCAGCACAT
TGCGTCTGCGGGGGGGCGTGGCGCGTCCACGAAGCAACATTACCGTCTTTGACCTCGG

> *Parapheospheria_neglecta_FC33*

GATCATTATCCATCTCAAACCAGGTGCGGTGCGGGCCCCCGGGGGCTTGCTCCCGGGTGGTAGGGG
TAACACCCGCACGCGCCCTGCCTGTACCCTCTTTTACGAGCACCTTTCGTTCTCCTTCGGCGGGG
CAACCTGCCGCTGGAACCAAAAACAAAACCTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATACAAACAA
TCGTTACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATT
CCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCGTCTGTCC
CGCCTCTGCGCGCGGACTCGCCCCAAATTCATTGGCAGCGGTCTTGCCTCCTCTCGCGCAGCACAA
TTTGGCTCTGCGGGGGGGCGTGGCCCGCGTCCACGAAGCAACATTACCGTCTTTGACCTCGG

> *Fusarium_sp._FC20*

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTTAATGTTGCCTCGGCGGATCAG
CCCAGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCAAACTCTAATGTTTCTTATTGTAACCTC
TGAGTAAAACAAAACAATAAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG
AACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCCTGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCG
GGTTTGGTGTGGGGATCGGCTCTGCCTTCTGGCGGTGCCGCCCCGAAATACATTGGCGGTCTCGC
TGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAACGCGGCGCGGCCATGCCGTA AAAAC
CCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGG

> *Fusarium_sp._FC21*

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTTAATGTTGCCTCGGCGGATCAG
CCCAGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCAAACTCTAATGTTTCTTATTGTAACCTC
TGAGTAAAACAAAACAATAAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG
AACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCCTGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCG
GGTTTGGTGTGGGGATCGGCTCTGCCTTCTGGCGGTGCCGCCCCGAAATACATTGGCGGTCTCGC
TGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAACGCGGCGCGGCCATGCCGTA AAAAC
CCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGG

> *Fusarium_sp._FC26*

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTTAATGTTGCCTCGGCGGATCAG
CCCAGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCAAACTCTAATGTTTCTTATTGTAACCTC
TGAGTAAAACAAAACAATAAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG
AACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCCTGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCG
GGTTTGGTGTGGGGATCGGCTCTGCCTTACGGCGGTGCCGCCCCGAAATACATTGGCGGTCTCGC
TGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAACGCGGCGCGGCCATGCCGTA AAAAC
CCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGG

> *Fusarium_sp._FC36*

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTTAATGTTGCCTCGGCGGATCAG
CCCAGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCAAACTCTAATGTTTCTTATTGTAACCTC
TGAGTAAAACAAAACAATAAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG
AACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCCTGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCG
GGTTTGGTGTGGGGATCGGCTCTGCCTTCTGGCGGTGCCGCCCCGAAATACATTGGCGGTCTCGC
TGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAACGCGGCGCGGCCATGCCGTA AAAAC
CCCAACTTCTGA