



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

TESI DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

**Diagnosi molecolare e associazione di funghi di
azzurramento del legno a insetti vettori in pinete
alpine**

Relatore:

Prof. *Andrea Battisti*

Correlatore:

Dott. Massimo Faccoli

Dott.ssa Caterina Villari

Laureando:

Andrea Basso

Matricola n. 577845

ANNO ACCADEMICO 2010 - 2011

Indice

	Pag.
Riassunto	1
Abstract	2
1. La simbiosi	3
1.1. Ips acuminatus	5
1.2. Funghi di azzurramento associati	9
1.2.1. Ambrosiella macrospora	9
1.2.2. Ophiostoma ips e Ophiostoma brunneo-ciliatum.....	10
1.3. Danni economici da funghi di azzurramento.....	12
2. Obiettivi della tesi	13
3. Materiali e metodi.....	14
3.1. Estrazione e quantificazione del DNA.....	16
3.2. Verifica della specificità dei primers.....	17
3.3. Analisi dei campioni.....	20
3.4. Prova di sensibilità	21
3.5. Analisi statistica	22
4. Risultati.....	23
4.1. Quantificazione e diluizione del DNA	23
4.2. Verifica della specificità dei primers.....	23
4.3. Prova di sensibilità	23
4.4. Risultati Nested PCR	24
5. Discussione e Conclusione	34
6. Bibliografia	36
Ringraziamenti	43

Riassunto

Il presente lavoro, svolto presso i laboratori del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali, situato nel campus di Agripolis, si pone l'obiettivo di studiare, tramite l'utilizzo di tecniche molecolari, la composizione della flora fungina associata ad *Ips acuminatus* nelle popolazioni dell'arco alpino. Questo piccolo scolitide, infatti è tipicamente associato a tre specie fungine: *Ophiostoma brunneo-ciliatum*, *O. ips* e *Ambrosiella macrospora*.

In particolare, in questo lavoro si è cercato di mettere appunto una reazione di PCR di tipo "Nested" per poter determinare la frequenza delle specie associate presenti sull'esoscheletro dell'insetto, amplificando solo i funghi di interesse. I campioni sono stati raccolti da due piante in sei diverse località dell'arco alpino; il DNA fungino è stato estratto mediante un protocollo di salting out per i campioni museali e quindi amplificato mediante primers specifici. I risultati sono stati resi visibili con una corsa elettroforetica e quindi analizzati statisticamente per mezzo di un modello lineare generalizzato ad effetti misto. L'analisi ha potuto riguardare solo una delle due specie di *Ophiostoma* in quanto la reazione di Nested PCR non è risultata specifica per *O. brunneo-ciliatum*.

L'analisi statistica mostra come la specie *A. macrospora* sia significativamente più presente rispetto *O. ips*. I risultati sono stati analizzati anche tenendo conto del sesso dell'insetto e del sito da cui provenivano i campioni, non trovando però differenze significative. I risultati possono essere interpretati come una maggiore necessità da parte dello scolitide di avere una simbiosi trofica, piuttosto che una simbiosi con un fungo di azzurramento, coinvolto nel facilitare il successo dell'attacco deprimendo le difese degli alberi. La simbiosi trofica infatti è molto importante per lo sviluppo delle larve.

Abstract

This work, done in the laboratories of the Department of Environmental Agronomy and Crop Science, located on the campus of Agripolis, aims at studying, using molecular techniques, the composition of fungi associated to *Ips acuminatus* in several sites of the Alps. According to literature, this bark beetle is typically associated with three fungal species: *Ophiostoma brunneo-ciliatum*, *O. ips* and *Ambrosiella macrospora*.

In particular, this work uses a Nested PCR technique to characterize the frequency of associated species on the insect, only amplifying the species of interest. Samples were collected from two plants in six different locations, the fungal DNA was extracted using a salting out protocol for the museum samples and then amplified using specific primers. The results were visualized with electrophoresis and then analyzed using a generalized linear mixed model. The analysis has concerned only one of the two species of *Ophiostoma* because the primers designed for *O. brunneo-ciliatum* turned out to be unspecific in the Nested PCR reaction.

The statistical analysis showed that *A. macrospora* is significantly more associated to *Ips acuminatus* than *O. ips*. The results were also analyzed taking into account the sex of the insect and the site from which the samples but no significant differences were found. This can be explained as a greater need by the beetle to have a trophic symbiosis, rather than a symbiosis with a blue stain fungus, as *Ambrosiella* provides food for the larvae while *Ophiostoma* may reduce the tree defenses and facilitate the colonization of the bark by the beetle. The trophic symbiosis is indeed very important for the development of the larvae.

Introduzione

1. La simbiosi

La simbiosi è una stretta relazione di carattere biologico che può instaurarsi tra due o più individui. In particolare la simbiosi è di tipo mutualistico quando ognuno degli organismi coinvolti trae beneficio dalla presenza degli altri, senza però recare danno a quest'ultimo.

Il mutualismo è una condizione altamente diffusa tra gli esseri viventi e coinvolge organismi appartenenti a tutti i regni dei viventi. È provato inoltre che molte di queste simbiosi sono necessarie per la sopravvivenza stessa degli organismi coinvolti (Douglas, 2003).

Si sente molto spesso parlare di simbiosi fungo-pianta e in particolare si citano spesso le relazioni che avvengono tra organismi fotosintetici e funghi come micorizze e licheni, ma la simbiosi tra fungo e animale viene sempre meno menzionata e di solito si pensa a tale rapporto solo come ad un rapporto ospite-parassita. Tuttavia tali relazioni sono molteplici e il più delle volte non completamente note.

Un esempio di questo tipo di simbiosi, noto da tempo, è quella che si instaura tra numerose specie di insetti scolitidi e funghi. Questo tipo di simbiosi è ben descritto in letteratura, ad esempio da Schmidberger e da Hartig.

Fra gli scolitidi simbiotici si distinguono due gruppi, in base all'ambiente di crescita e alle abitudini alimentari delle larve, fattori da cui deriva la necessità o meno della simbiosi.

Il primo gruppo, detto "lignicolo dell'ambrosia" o "xylomycetopagous", nel quale rientra anche un platipodide, si accresce nei tessuti del legno (Kirisits, 2004), ma non è in grado di digerire lignina, cellulosa ed emicellulosa. Per ottenere il nutrimento necessario allo sviluppo, quindi, hanno sviluppato una simbiosi con dei funghi dell'ambrosia, che si sviluppano all'interno delle gallerie scavate dall'insetto. Durante il suo sviluppo l'insetto si alimenta del micelio e delle spore fungine, ottenendo così un alimento ad alto valore nutritivo. In questo caso, quindi, la simbiosi è necessaria per la

vita dell'insetto, e le specie che posseggono tale tipo di simbiosi hanno spesso sviluppato un modo per trasportare i funghi associati, e cioè all'interno di strutture tegumentali specializzate dette micangi. Queste strutture, associate ad apposite ghiandole secernenti sostanze utili alla sopravvivenza del fungo, consentono inoltre di effettuare una selezione dei microrganismi trasportati, favorendo le specie mutualistiche a quelle neutrali o detritivore (Beaver, 1989, Paine *et al.*, 1997; Kirisits, 2004; Batra 1967).

I micangi possono essere dislocati in varie parti del corpo, dalla testa, al torace, all'addome.

Il secondo gruppo, più consistente del primo, è detto "corticicolo" o "phloeophagus" e si accresce nel floema di latifoglie e conifere, alimento già di per sé sufficientemente ricco da non rendere necessaria per l'alimentazione dell'insetto l'associazione con le specie fungine. In questo caso, quindi, la simbiosi è di tipo facoltativo. Ciononostante, l'associazione tra scolitidi corticicoli e funghi, soprattutto quelli appartenenti al gruppo degli *Ophiostomatoidi*, è molto comune, dal momento che comunque fornisce un notevole vantaggio. In questo caso infatti, più che per scopo nutritivo, l'insetto ha sviluppato la simbiosi con il fungo affinché questi interagisca con le difese dell'ospite indebolendole. Considerando che il successo della colonizzazione delle conifere da parte degli scolitidi dipende in gran parte dalla loro capacità di superare la soglia critica oltre la quale le difese dell'ospite sono sopraffatte, l'associazione con funghi patogeni in grado di alterare le difese dell'ospite e abbassare tale soglia è molto utile per l'insetto (Paine *et al.*, 1997; Franceschi *et al.*, 2005; Villari, 2008). Negli scolitidi corticicoli i propaguli fungini non sono necessariamente trasportati in strutture specifiche, ma possono semplicemente aderire al corpo dell'insetto con varie modalità, ad esempio a contatto con peli, setole, appendici boccali oppure nelle piccole inflessioni dell'esoscheletro (Webber e Gibbs, 1989).

In entrambe le tipologie di simbiosi, l'associazione con gli scolitidi porta dei vantaggi per la diffusione dei funghi ed il loro ingresso nei tessuti sottocorticali. A dimostrazione di ciò si può considerare il fatto che le specie appartenenti al gruppo degli *Ophiostomatoidi*, tipicamente associati agli insetti, producono sostanze volatili attrattive per gli scolitidi ed hanno evoluto adattamenti morfologici, quali ascospore adesive e periteci generalmente a collo lungo, proprio per facilitare l'adesione dei

propaguli al corpo dei vettori (Beaver, 1989). Le ascospore di questi funghi, inoltre, spesso possiedono pareti particolarmente sviluppate, adatte a resistere alla digestione nello stomaco degli scolitidi (Malloch e Blackwell, 1993).

1.1. *Ips acuminatus*

Il coleottero scoltide *Ips acuminatus* (Gyllenhal), comunemente noto come bostrico acuminato, è fra i più comuni agenti parassitari che approfittano del deperimento delle pinete alpine. È una specie paleartica che tra gli anni '70 e '80 ha causato ingenti danni a vasti popolamenti di pino silvestre in Svezia e Norvegia (Stergulc e Frigmelica, 1996). È presente in Asia minore, Georgia, parte della Siberia, Giappone e Cina. Fino alla metà del '900 era considerato privo di interesse selvicolturale, ma a causa dei forti danni economici indotti dalle prime infestazioni, si è cominciato a prestarvi una forte attenzione (Ferraro, 2010). Questo insetto è grande solo pochi millimetri e colonizza la parte medio - alta dei tronchi di pini continentali, con preferenze verso il Pino silvestre, prediligendo piante già indebolite per vari motivi, come l'eccessiva densità del bosco, la siccità estiva, gli inverni particolarmente caldi e siccitosi o le carenze nutritive (Faccoli *et al.*, 2010).

Possiede una corazza chitinica a forma cilindrica di colore marrone scuro, le elitre sono rosso brune e il declivio lucido (Fig. 1a). Si riconosce dalle altre specie di *Ips* per le piccole dimensioni e per la presenza di tre denti ai bordi di ognuno dei due declivi: nei maschi quello più in basso è a due punte mentre nelle femmine, leggermente più grandi, tutti i denti sono semplici (Fig. 1b) (Nierhaus-Wunderwald e Forster, 2000).

La colonizzazione di una nuova pianta inizia nel periodo primaverile con l'arrivo del maschio che fora la corteccia e comincia a costruire una spaziosa camera nuziale attirando numerose femmine attraverso la produzione di feromoni di aggregazione. Queste vengono progressivamente fecondate, e a seconda del numero, vengono scavate e ampliate delle gallerie, larghe 2-3 mm e lunghe fino a 40 cm, a forma di stella che, vengono fornite di numerosi fori di aerazione (Fig. 1c). Da queste gallerie materne si ramificano corte gallerie larvali dove, nella parte più distale, si impupa la nuova generazione. Nell'arco di un anno si hanno fino a due generazioni. La prima

generazione sfarfalla piuttosto velocemente e sverna in nuove piante, nelle gallerie dove si nutre, mentre la seconda, che avviene solo nel caso in cui il clima sia caldo e secco, sverna come giovane adulto nelle gallerie in cui nasce, per poi sfarfallare durante la successiva primavera (Nierhaus-Wunderwald e Forster, 2000).

Gli attacchi portano rapidamente a morte le piante, che nel giro di poche settimane presentano chiome rosseggianti a seguito del disseccamento degli aghi (Fig. 2). Inoltre, sebbene le gallerie materne e larvali incidano il legno solo superficialmente, il materiale infestato subisce un danno tecnologico dovuto all'invasione dell'alburno da parte di funghi simbiotici agenti di azzurrimento (Faccoli *et al.*, 2010) (Fig. 2). *I. acuminatus* è infatti una specie fleomicetofaga, regolarmente associata con tre principali specie fungine: *Ophiostoma brunneo-ciliatum*, *O. ips* e *Ambrosiella macrospora*. Le prime due specie sono patogene e interagiscono con le difese della pianta limitando la possibilità di questa di difendersi dagli attacchi dello scolitide (Lieutier *et al.* 1991). *A. macrospora* è invece un fungo dell'ambrosia, fondamentale per l'alimentazione delle larve ma non patogeno per la pianta (Francke-Grosmann 1952), che viene trasportato dalle femmine all'interno di micangi mandibolari.

La pericolosità di *I. acuminatus* sembrerebbe quindi strettamente legata alla presenza di tali simbiosi, anche se i funghi trasportati non sono patogeni aggressivi. Un'eccessiva aggressività del fungo, infatti, porterebbe ad una riduzione troppo veloce della quantità e qualità dell'alimento disponibile per le larve. L'insetto attacca principalmente piante già indebolite, diffondendosi a macchia di leopardo, e l'infestazione nel giro di pochi anni può interessare anche un migliaio di alberi; il paesaggio quindi può apparire molto deturpato a causa delle vistose aree rossastre che si espandono nelle vallate (Dal Pont, 2008) (Fig. 2).

Gli attacchi sulle piante sane invece sono più rari e si manifestano solo in caso di forti infestazioni: i pini dapprima reagiscono producendo resina, poi con l'arrivo di nuovi individui non sono più in grado di tollerare l'attacco (Ferraro, 2010).

I danni prodotti dallo scolitide in assenza di interventi si ripercuotono sulla stabilità del terreno e sulla suscettibilità agli incendi boschivi. Infatti nelle aree boschive colpite, si formano delle vaste aree vuote che aumentano il rischio di frane e valanghe oltre a provocare una sorta di mosaico in cui si alternano boschi sani e boschi morenti, con delle visibili "ferite" all'insieme del paesaggio montano.

Oltre a ciò è rilevante anche il danno economico, in particolare per i proprietari dei boschi infestati i quali perdono una grande quantità di legname, non più utilizzabile. Negli anni scorsi, i censimenti condotti sulle pinete alpine mostrano come le infestazioni da bostrico acuminato siano in continua espansione.

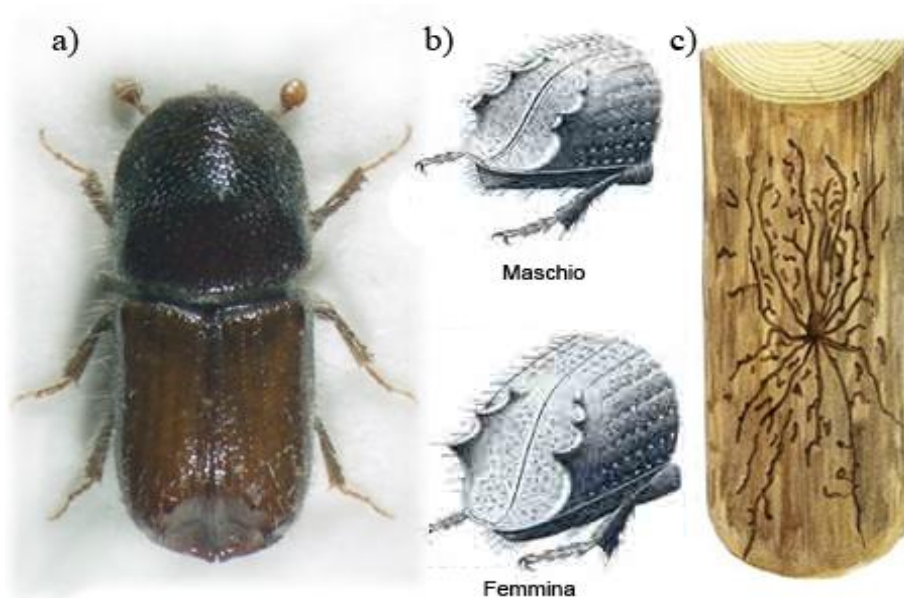


Figura 1: a) *Ips acuminatus*; b) *Ips acuminatus* (maschio e femmina); c) sistema di gallerie.

a)



b)



Figura 2: a) Sondalo (Val di Rezzalo) 11 agosto 2005 b) Bormio (Reit - zona Gesa Rota), 11 agosto 2006

1.2. Funghi di azzurramento associati

I generi *Ophiostoma* e *Ambrosiella* appartengono alla divisione degli *Ascomycota*, tra i quali troviamo anche tartufi, lieviti e Penicilline. Producono spore in un caratteristico tipo di sporangio chiamato asco, cellula nella quale avviene la meiosi e che successivamente contiene le meiospore. Gli aschi sono spesso contenuti in corpi fruttiferi chiamati ascocarpi. Molti *Ascomycota* sono costituiti da ife, sottili, filamenti di cellule spesso con uno spessore di solo 5 μm , che si diramano ripetutamente fino a formare un intricato gomitolo, il micelio. La parete cellulare degli *Ascomycota* è fatta quasi sempre di chitina e β -glucani; le singole cellule sono divise tra loro da pareti trasversali dette setti. Questi danno all'ifa stabilità e prevengono una grossa perdita di citoplasma nel caso in cui la membrana cellulare dovesse lacerarsi in qualche punto. Ciò fa in modo che gli *Ascomycota* possano conservarsi, contrariamente ad altre divisioni di funghi che prediligono l'umidità, anche in ambienti secchi (Whittaker, 1959).

1.2.1. *Ambrosiella macrospora*

Ambrosiella macrospora (Fr.-Grosmann) Batra, è un fungo dell'ambrosia tipicamente associato a *I. acuminatus*, il cui nome è proprio dovuto alle notevoli dimensioni delle spore. È fondamentale per l'alimentazione della larva dell'insetto ma non patogeno per la pianta; infatti fornisce all'insetto tutti i nutrienti di cui ha bisogno per crescere e svilupparsi in un ambiente notoriamente povero di sostanze facilmente assimilabili, come il legno.

A. macrospora viene trasportato da una pianta all'altra dall'insetto, all'interno di micangi mandibolari, e sul nuovo ospite si innesta nelle ferite fresche delle gallerie appena scavate, colonizzando e sviluppandosi nel floema e nei tessuti circostanti le gallerie, facendogli assumere un caratteristico colore nerastro; con il tempo arriva a formare una sottile palizzata lungo tutti i tunnel e le celle larvali prodotte dal bostrico acuminato.

Molti funghi dell'ambrosia sono dimorfici, cioè presentano sia una fase miceliale sia una fase sottoforma di lievito, o germinativa, che è la forma principale in cui *A. macrospora* si trova nelle gallerie del bostrico acuminato. All'analisi microscopica *A. macrospora* si presenta ialino con ife settate. Le conidiospore sono globose o subglobose e possono essere ramificate (Batra, 1967).

1.2.2. *Ophiostoma ips* e *Ophiostoma brunneo-ciliatum*

Ophiostoma ips (Rumb.) Nannf. e *O. brunneo-ciliatum* (Math.) sono funghi debolmente patogeni, appartenenti alla categoria dei funghi di azzurramento (Fig. 3). Questi funghi penetrano nella pianta durante la colonizzazione dell'insetto e interagiscono con le difese costitutive e indotte dell'ospite, alterandone l'efficacia (Paine *et al.*, 1997; Franceschi *et al.*, 2005).

L'inoculo penetra nell'ospite grazie all'attacco di *I. acuminatus* che funge da vettore, si sviluppa nelle regioni esterne del tronco (cambio e alburno) e comincia a colonizzare il sistema vascolare (Ghaioule *et al.*, 2007), producendo enzimi litici e assorbendo sostanze nutritive direttamente dal parenchima della pianta (Lieutier, 2004; Kirisit, 2004) senza mai andare ad intaccare il cuore del legno. (Ghaioule *et al.*, 2007). La colonizzazione del sistema vascolare si traduce in una riduzione della conducibilità idrica della pianta che, a seconda della densità dell'impianto fungino, può arrivare anche al 60%. Sebbene questo valore possa sembrare elevato, non è sufficiente a portare a morte la pianta, confermando quindi la debole patogenicità degli ophiostomatoidi in questione (Guérard *et al.*, 2000). I funghi del genere *Ophisotama* associati ad insetti vettori sporulano direttamente all'interno delle gallerie scavate dallo scolitide il quale, nel periodo antecedente lo sfarfallamento, si imbratta con le spore, trasportandole successivamente da un ospite all'altro (Zhou *et al.*, 2002).

Gli ophiostomatoidi rappresentano una delle più importanti categorie dei funghi infestanti; oltre a sfruttare il trasporto dei vettori, infatti, possono diffondersi attraverso il commercio del legno non trattato e quindi coprire distanze considerevoli sfruttando l'esportazione di legname.

A causa della morfologia relativamente semplice e le caratteristiche simili tra le diverse specie, risulta spesso difficile distinguere i diversi ophiosotomatoidi esclusivamente su basi morfologiche. L'utilizzo di tecniche DNA-based è quindi diventato indispensabile per un'identificazione affidabile (Gorton *et al.*, 2004; Grobbelaar *et al.*, 2009).

Morfologicamente *O. ips* presenta ife di colore scuro e un peritecio nero con base globosa circondata da ife asettate di colore grigio chiaro. L'ostiolo è privo di ife ostiolari; le ascospore, ialine, asettate e di sezione quadrangolare, sono immerse in una sostanza mucillaginosa per facilitare l'adesione alla superficie dell'insetto vettore. Possiede tre forme anomorfe appartenenti ai generi *Pesotum*, *Leptographium* e *Hylorhinocladiella* (Hunt, 1956; Upadhyay, 1981; Zhou *et al.*, 2004b; Davidson, 1978). Questo fungo si insedia preferibilmente nei raggi del parenchima dove risulta più facile invadere i dotti resiniferi da cui trae nutrimento (Lieutier *et al.*, 2007).

O. ips è anche associato a numerosi altri insetti di interesse forestale come *Ips sexdentatus*, *Hylates ater*, *Orthotomicus laricis*, *Orthotomicus proximus*, e varie specie del genere *Tomicus*.

O. brunneo-ciliatum, invece, è associato solo a *Ips amitinus*, *Ips cembrae* ed *Ips sexdentatus*, oltre che ad *Ips acuminatus*. È caratterizzato da ife inizialmente color bianco crema, che si scuriscono con l'età fino a diventare di colore scuro. La forma teleomorfa è caratterizzata da periteci di colore nero con un collo molto allungato. L'apertura ostiolare è adornata da ife di colore bruno, curvate a spirale. La forma anamorfa presenta conidiofori del genere *Grapium*, dalla tipica forma a pennello. I conidi hanno sezione rettangolare e con la maturazione si posizionano lateralmente rispetto all'apice delle cellule conidiogene (Wingfield *et al.*, 1993, Yamoaka *et al.*, 1998).

Ognuna di queste specie predilige alberi forestali, tra cui larici, diverse specie di pino e abete rosso (Kirisit 2004).

1.3. Danni economici da funghi di azzurramento

I funghi dell'azzurramento generano nel legno una colorazione che varia dal grigio chiaro al blu nerastro (l'intensità del colore dipende dall'umidità del legno e dalla profondità degli strati infestati). Non modificano le caratteristiche meccaniche del legno (non viene distrutta la parete cellulare), ma limitano l'utilizzo di manufatti a vista in quanto esteticamente sgradevoli. Ciò porta a un deprezzamento degli assortimenti ricavabili (Nierhaus-Wunderwald e Forster, 2001).

Oltre a essere antiestetico, l'azzurramento causa una serie di problemi anche per quanto riguarda i trattamenti che vengono eseguiti sul legname. Infatti in caso di verniciatura su legno infestato, nel giro di pochi anni, si ha uno scrostamento progressivo della pittura. Gli strati colpiti dai funghi, inoltre, penetrano abbastanza in profondità, non permettendone l'eliminazione.

Sintomi dell'azzurramento del legno appaiono durante il periodo primaverile – estivo e si manifestano come ingiallimento e arrossamento generalizzato alle chiome, spesso associati ad attacchi di scolitidi. Scortecciando il tronco si osservano striature e/o macchie azzurrognole che interessano il legno giovane (Fig. 3c) e si spingono in profondità lungo i raggi midollari. Il sintomo è più evidente nelle sezioni trasversali di fusti tagliati (Fig. 3a).

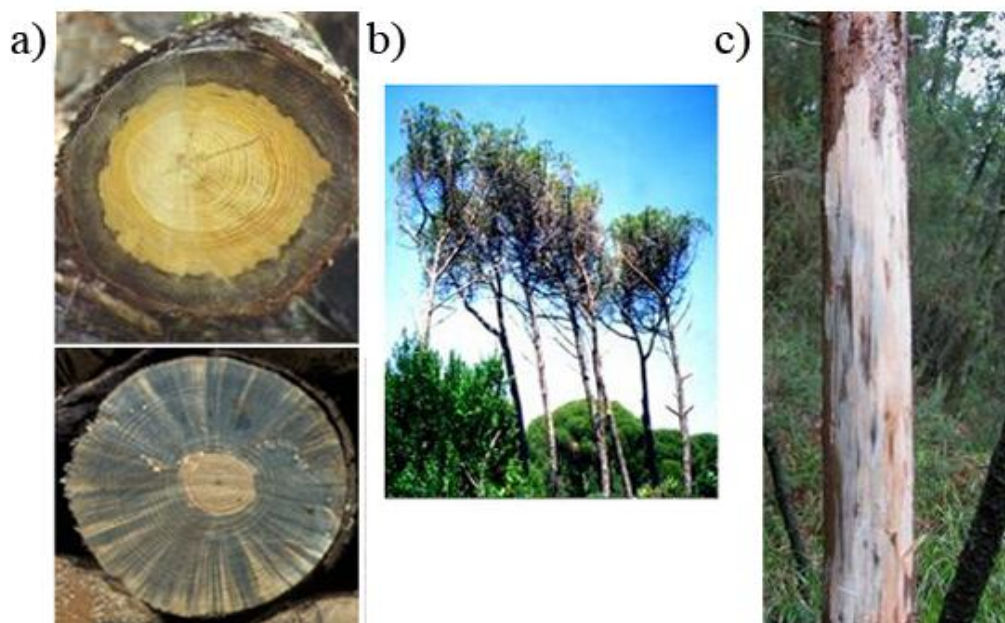


Figura 3: a) sezione di tronchi; b) chiome di alberi; c) tronco; colpiti da azzurramento.

2. Obiettivi della tesi

Questa tesi di laurea è inserita in un progetto più ampio che ha lo scopo di approfondire le conoscenze riguardo alcuni aspetti della simbiosi tra *Ips acuminatus* e dei funghi ad esso associati, al fine di comprendere quali sono i fattori chiave che hanno portato ad un incremento demografico dell'insetto in molte località alpine.

In particolare, la tesi si pone l'obiettivo di studiare, tramite l'utilizzo di tecniche molecolari, la composizione della flora fungina associata ad *I. acuminatus* nelle popolazioni dell'arco Alpino.

Le analisi condotte hanno indagato: la presenza delle specie *Ophiostoma brunneo-cliatum*, *Ophiostoma ips* e *Ambrosiella mascorporea* (i); l'esistenza di una differenza della composizione della flora in base al sesso del vettore (ii); l'esistenza di una differenza della composizione della flora in base alla località (iii).

3. Materiali e metodi

Tutte le attività riguardanti questo caso di studio sono state svolte presso i laboratori del DAAPV (Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali), nell'istituto di Entomologia Agraria situato nel campus di Agripolis (Viale dell'Università, 16 – 35020 Legnaro PD).

I campioni utilizzati in questa tesi derivano da un campionamento svolto nell'inverno 2008-2009, nel corso di un precedente caso di studio. In totale sono stati analizzati 217 campioni provenienti da 6 diverse località: Val Dogna (UD), Cortina d'Ampezzo (BL), ValVenosta (BZ), Valcamonica (BS), Valtellina (SO) e Brusson (AO) (Fig. 4); per ogni località sono state scelte due piante provenienti da due siti separati, e sono stati analizzati 10 maschi e 10 femmine a pianta (per un totale di 40 insetti a località). Unica eccezione Brusson (AO), dove è stata scelta esclusivamente una pianta, dal quale sono stati analizzati 7 femmine e 10 maschi (per un totale di 17 insetti). La nomenclatura adottata per i campioni è riportata in Tabella 1.



Figura 4: Siti di cattura dei campioni

Codice	Provenienza	Pianta
A	Val Dogna	1
B	Val Dogna	2
C	Val Venosta	1
D	Val Venosta	2
E	Valcamonica	1
F	Valcamonica	2
G	Cortina	1
H	Cortina	2
I	Valtellina	1
L	Valtellina	2
M	Brusson	1

Tabella 1: Schema nomenclatura campioni.

Per l'individuazione del DNA delle tre specie fungine associate ad *Ips acumintus* sono state utilizzate tre coppie di primers specie specifiche recentemente disegnate dal gruppo di ricerca del dipartimento (Tab. 2), ciascuna delle quali amplifica un frammento di circa 200 pb all'interno della regione codificante per la β -tubulina, subunità che costituisce le strutture del citoscheletro. L'analisi molecolare è stata effettuata tramite Nested PCR, tecnica nettamente più sensibile rispetto ad una PCR classica, che invece non è sufficientemente sensibile per questo tipo di analisi.

Target	Primer	sequenza 5' - 3'	Lunghezza (nt)	%G C
<i>Ambrosiella macrospora</i>	AM f	CTTGTCTTACACACCTCGAC	20	45
	AM r	CATGTTAGTTTCGCACATCC	20	40
<i>Ophiostoma ips</i>	Oips f	CTGGCACGACAACCGTGTAAC	21	57,1
	Oips r	CTGACCGAAAGGACCGGCAC	20	65
<i>Ophiostoma brunneo-ciliatum</i>	OBC f	TGTTGGACGTTGGACGCC	18	61,1
	OBC r	AAGTTGTCGGGGCGGAAC	18	61,1

Tabella 2: sequenze nucleotidiche dei primers utilizzati.

3.1. Estrazione e quantificazione del DNA

L'estrazione del DNA dei campioni è stata effettuata utilizzando un protocollo messo a punto per i campioni museali (Gilbert *et al.*, 2010).

Tale protocollo, infatti, non prevede la macinazione del campione e permette quindi l'estrazione del DNA fungino presente sulla superficie esterna dell'insetto limitando l'estrazione del DNA di quest'ultimo alle sole cellule epiteliali. Questo al fine di limitare la presenza di materiale genetico estraneo all'analisi e migliorarne quindi la sensibilità.

Primo giorno

- Preriscaldare il bagnetto termostatico a 55°C;
- Mettere in una eppendorf da 1,5 ml 157 µl di buffer di estrazione (composizione: 3 mM CaCl₂, 2% SDS, 100 mM NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8, a concentrazione finale);
- Aggiungere 6,3 µl di DTT 1M (40 mM a concentrazione finale);
- Aggiungere 2 µl di proteinasi K;
- Aggiungere il campione;
- Incubare overnight a 55°C.

Secondo giorno

- Togliere il campione dalla soluzione;
- Aggiungere 2 µl di RNAsi e lasciare agire per 1-2 minuti a temperatura ambiente;
- Aggiungere 40 µl di soluzione satura di NaCl (> 6 M);
- Vortexare per 20 minuti;
- Centrifugare a 14000 rpm per 30 minuti;
- Trasferire il supernatante in una nuova eppendorf;
- Aggiungere un volume (200 µl) di isopropanolo a -4°C;
- Far precipitare il DNA centrifugando a 14000 rpm a 4°C per 20 minuti;
- Scartare il supernatante;
- Lavare il pellet con 500 µl di etanolo al 70%;

- Scartare il supernatante;
- Asciugare il pellet in una pompa a vuoto per 15-30 minuti;
- Risospendere il DNA con 20 μ l di H₂O sterile.

L'utilizzo della proteinasi K serve a rompere l'involucro proteico che protegge il materiale genetico sull'esoscheletro del campione. L'utilizzo dell'RNAsi serve invece per eliminare l'RNA che altrimenti interferirebbe con la successiva reazione di PCR, formando dimeri di RNA-DNA e duplex aspecifici. Le centrifugazioni in serie servono per separare le proteine, l'RNA degradato e le soluzioni tampone dal DNA, mentre l'utilizzo della pompa a vuoto permette di asciugare completamente il campione da isopropanolo ed etanolo, necessari per la purificazione del DNA, ma che potrebbero inibire la successiva reazione della polimerasi.

La concentrazione del DNA così estratto, diluito 1:50, è stata quantificata mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro BioMate 3, basandosi sul fatto che in una cuvetta con il cammino ottico di 1 cm, il DNA a doppio filamento alla concentrazione di 50 μ g/ml ha un assorbimento a 260 nm pari a 1. Utilizzando la media di tre letture, i campioni sono stati portati ad una concentrazione finale di 10 ng/ μ l.

3.2. Verifica della specificità dei primers

Prima di procedere con l'analisi dei campioni è stato necessario verificare che i primers, specifici in PCR classica, mantenessero la loro specificità anche durante la reazione di Nested PCR. Tale tecnica, infatti, essendo molto più sensibile rispetto ad una PCR classica, può presentare problemi legati al verificarsi di falsi positivi. A tal fine è stata quindi effettuata una prova di specificità utilizzando DNA estratto da specie fungine filogeneticamente vicine alle specie analizzate, oltre che da una colonia batterica, da alcune delle specie fungine più comunemente associate al genere *Pinus* e da alcune specie facilmente reperibili in foresta (Tab. 3). Come controllo negativo è stata utilizzata H₂O UHQ (Ultra High Quality).

Specie utilizzate nella prova di specificità
<i>Ambrosiella macrospora</i>
<i>Ophiostoma ips</i>
<i>Ophiostoma brunneo-ciliatum</i>
<i>Leptographium serpens</i>
<i>Leptographium procerum</i>
<i>Leptographium wingfieldii</i>
<i>Leptographium lundbergii</i>
<i>Leptographium pityophilum</i>
<i>Sphearopsis sapinea</i>
<i>Diplodia scrobiculata</i>
<i>Ustulina deusta</i>
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>
<i>Heterobasidion annosum</i>
<i>Heterobasidion abietinum</i>
<i>Bacillus pumilis</i>

Tabella 3: Specie fungine e batteriche utilizzati nella prova di specificità dei primers.

La prima reazione di PCR è stata eseguita in un volume di 15µl, costituito da 2µl di DNA stampo e 13µl di mix (Tab. 4). In questa prima reazione è stata utilizzata una coppia di primers generici per le specie fungine, che amplifica la regione della β-tubulina all'interno della quale sono state disegnate le tre coppie di primers specie specifici (Bt2a, Bt2b, Glass e Donaldson, 1995).

Mix di reazione per 1 campione	Concentrazione	Volume (µl)
Buffer	5X	3
MgCl ₂	25 mM	1,2
dNTPs	2 mM	0,7
Primer Bt2a	10 µM	0,3
Primer Bt2b	10 µM	0,3
Taq	5 U/µl	0,1
DMSO	5%	0,6
H ₂ O UHQ		6,8
DNA	10 ng/µl	2
Totale		15

Tabella 4: Mix di reazione utilizzato nella prima PCR del protocollo Nested.

Il ciclo di reazione nel termociclatore (Eppendorf Mastercycler gradient) è stato:

Temperatura	Tempo (minuti)		
94°C	2'		Inizializzazione
94°C	30''	} x 15 cycles	Denaturazione
58°C	45''		Annealing
72°C	45''		Estensione
94°C	30''		Denaturazione
55°C	45''	} x 20 cycles	Annealing
72°C	45''		Estensione
72°C	5'		Estensione Finale
16°C			Conservazione

L'amplificato ottenuto è stato diluito 1/100 ed è stato utilizzato nelle tre successive reazioni di PCR, ciascuna eseguita in un volume di 15µl, costituito da 1µl di amplificato diluito e 14µl di mix (Tab. 5).

Ognuna delle tre coppie di primers specie specifiche (OBC f e OC r; AM f e AM r; Oips f e Oips r) è stata utilizzata in una reazione separata.

Mix di reazione per 1 campione	Concentrazione	Volume (µl)
Buffer	5X	3
MgCl ₂	25 mM	1
dNTPs	2 mM	0,6
Primer forward	10 µM	0,3
Primer reverse	10 µM	0,3
Taq	5 U/µl	0,1
H ₂ O UHQ		8,7
Prodotto di PCR	1/100	1
Totale		15

Tabella 5: Mix di reazione utilizzato nella seconda PCR del protocollo Nested.

In questo caso, il ciclo di reazione nel termociclatore è stato:

Temperatura	Tempo (minuti)		
94°C	3'	} x 20 cycles	Inizializzazione
94°C	30''		Denaturazione
62-65-67°C	30''		Annealing
72°C	30''		Estensione
72°C	5'		Estensione Finale
16°C			Conservazione

In particolare, per la coppia di primers specifica per *A. macrospora* la temperatura di annealing è stata 62°C, per la coppia specifica per *O. ips* la temperatura è stata 65°C, mentre per la coppia di primers specifica per *O. brunneo-ciliatum*, la temperatura è stata di 67°C.

Il risultato della reazione è stato controllato tramite elettroforesi a 70V per 30minuti su gel d'agarosio 2% contenente lo 0,007% di Sybr Safe (Invitrogen™, SYBR® Safe DNA gel stain). In ogni pozzetto sono stati caricati 4µl di prodotto di amplificazione e 1µl di una soluzione di colorante e glicerolo. Il glicerolo serve per appesantire i campioni ed evitare che fuoriescano dai pozzetti. Il colorante serve per poter monitorare in tempo reale il procedere dell'elettroforesi. Come marker sono stati utilizzati 4 µl di 1KB (EuroClone®, Sharp Mass™ 1 kb, DNA Ladder) .

3.3. Analisi dei campioni

Dato che la verifica della specificità dei primers ha dato esito positivo solo per le coppie AM f-AM r e Oips f -Oips r, l'analisi sui campioni è stata eseguita esclusivamente con questi primers, tralasciando per il momento l'analisi dell'associazione *Ips acuminatus* – *Ophiostoma brunneo-ciliatum*.

Ognuno dei 217 campioni è stato analizzato utilizzando il protocollo descritto nel paragrafo precedente. In ogni reazione, come controllo positivo per la rispettiva coppia di primers, è stato utilizzato il DNA estratto da due isolati certificati (ente certificatore: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht): *A. macrospora* CBS367,53 e *O. ips* CBS137,36. Come controllo negativo è stata utilizzata H₂O UHQ.

Anche in questo caso il risultato della reazioni è stato controllato tramite elettroforesi a 70V per 30 minuti su gel d'agarosio 2% contenente lo 0,007% di Sybr Safe. Così come per la prove precedenti, in ogni pozzetto sono stati caricati 4µl di prodotto di amplificazione e 1µl di una soluzione di colorante e glicerolo. Come marker sono stati utilizzati ogni volta 4 µl di 1KB.

3.4. Prova di sensibilità

Al fine di confrontare il limite di sensibilità della reazione di Nested PCR rispetto ad una reazione di PCR classica, è stata effettuata una prova nella quale è stata ricercata la minima quantità di estratto amplificabile con le due diverse reazioni. Il DNA fungino estratto dalle colonie certificate è stato diluito 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500 ed 1/1000, e tali diluizioni sono state utilizzate in una PCR classica eseguita con primers specifici per una e l'altra specie utilizzando, il seguente ciclo di reazione nel termociclatore:

Temperatura	Tempo (minuti)		
94°C	3'		Inizializzazione
94°C	30''	} x 35 cycles	Denaturazione
62-65°C	30''		Annealing
72°C	30''		Estensione
72°C	5'		Estensione Finale
16°C			Conservazione

Questa reazione è stata eseguita in un volume di 15µl, costituito da 2µl di DNA stampo e 13µl di mix (Tab. 6).

Mix di reazione per 1 campione	Concentrazione	Volume (μ l)
Buffer	5X	3
MgCl ₂	25 mM	1
dNTPs	2 mM	0,6
Primer forward	10 μ M	0,3
Primer reverse	10 μ M	0,3
Taq	5 U/ μ l	0,1
H ₂ O UHQ		7,7
DNA		2
Totale		15

Tabella 6: Mix di reazione utilizzato nella PCR della prova di sensibilità.

Le stesse diluizioni di DNA sono state quindi usate per una Nested PCR eseguita con il protocollo descritto nel paragrafo 3.2. La prima reazione di PCR per questa prova è stata eseguita in un volume di 15 μ l, costituito da 2 μ l di DNA stampo e 13 μ l di mix (Tab. 4); l'amplificato ottenuto è stato diluito 1/100 ed è stato utilizzato nelle due successive reazioni di PCR, ciascuna eseguite in un volume di 15 μ l, costituito da 1 μ l di amplificato diluito e 14 μ l di mix (Tab. 5).

Ognuna delle due coppie di primers specie specifiche (*O. ips* f e *O. ips* r; AM f e AM r) è stata testata separatamente.

Il risultato di entrambe le reazioni (PCR classica e Nested PCR) sono stati controllati tramite elettroforesi a 70V per 30 min. su gel d'agarosio 2% contenente lo 0,007% di Sybr Safe. In ogni pozzetto sono stati caricati 4 μ l di prodotto di amplificazione e 1 μ l di colorante e glicerolo. Come marker sono stati utilizzati 4 μ l di 1KB.

3.5. Analisi statistica

I dati sono stati analizzati statisticamente per mezzo del modello lineare generalizzato ad effetti misto (GLMM). Il modello utilizza la presenza/assenza del fungo come variabile risposta, genere e specie (*O. ips* vs. *A. macrospora*) come fattori fissi e insetto, albero e sito come fattori random. L'analisi statistica è stata eseguita per mezzo del software R versione 2.12.1.

4. Risultati

4.1. Quantificazione e diluizione del DNA

Dalle analisi compiute con lo spettrofotometro è emerso che i valori del rapporto dell'assorbanza a 260 e 280 nm sono compresi nell'intervallo 1.6-2.0, indice della buona riuscita dell'estrazione del DNA. Basandosi quindi sulla media delle tre letture ottenute dallo strumento, il DNA di tutti i campioni è stato portato alla concentrazione di 10 ng/μl (Tab. 9).

4.2. Verifica della specificità dei primers

L'esito della prova di specificità dei primers in Nested PCR ha mostrato che i primers per *A. macrospora* e *O. ips* sono specifici e amplificano rispettivamente solo questi due funghi, mentre quelli per *O. brunneo-ciliatum* amplificano indiscriminatamente anche specie simili. Non avendo la possibilità di riscrivere e testare nuovamente questi inneschi si è preferito continuare lo studio esclusivamente per *A. macrospora* e *O. ips*, tralasciando la terza specie.

4.3. Prova di sensibilità

La prova eseguita al fine di confrontare il limite di sensibilità della reazione di Nested PCR rispetto ad una reazione di PCR classica ha mostrato che quest'ultima, eseguita su estratto da micelio diluito secondo le proporzioni definite nel paragrafo 3.4, risulta poco o per niente sensibile (Fig. 5). Il materiale genetico risulta essere probabilmente troppo poco per essere amplificato. La Nested PCR, invece, aumentando la sensibilità oltre che la specificità, permette di amplificare quantità infinitesimali di DNA, fino anche a 0,01ng/μl (nella diluizione 1/1000); è possibile infatti identificare delle bande nette in tutte le diluizioni amplificate con il protocollo Nested (Fig. 5).

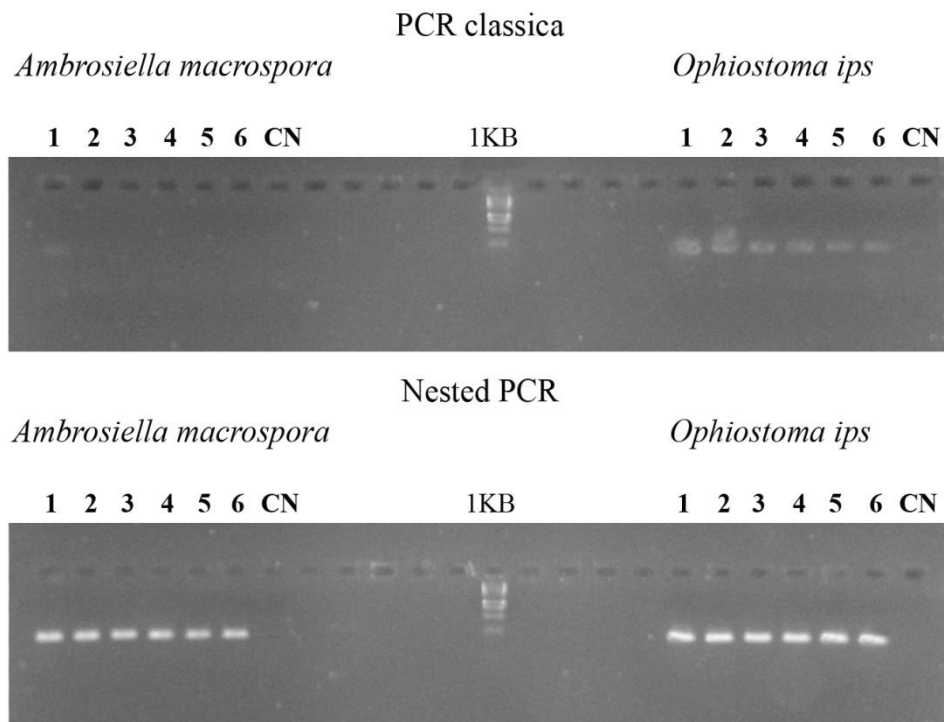


Figura 5: corsa elettroforetica del test di sensibilità della PCR

4.4. Risultati Nested PCR

I dati ricavati dall'analisi con Nested PCR, osservati tramite elettroforesi, sono stati schematizzati e riportati nella seguente tabella (Tab. 7). Le percentuali mostrano le frequenze con cui le due specie di funghi sono associate agli insetti.

% di associazione	<i>Ophiostoma ips</i>		<i>Ambrosiella macrospora</i>	
	Vettore maschio	Vettore femmina	Vettore maschio	Vettore femmina
Val Dogna	90	100	90	95
Val Venosta	50	45	95	80
Valcamonica	90	85	80	100
Cortina	50	70	100	100
Valtellina	70	75	75	85
Valle d'Aosta	100	85,7	90	85,7

Tabella 7: Frequenza di associazione delle specie fungine per località di origine e sesso del vettore.

I dati sono stati analizzati attraverso un modello lineare generalizzato ad effetti misto (GLMM), con specie e genere come fattori fissi e insetto, albero e sito come fattori random. Il modello, in particolare, utilizza una distribuzione binomiale con la presenza delle due specie di fungo come variabile risposta.

Dal modello misto risulta che il test è significativo solo sulla percentuale di presenza dei due funghi (Tab. 8). Infatti, da questa ricerca, non esistono differenze significative sulle associazioni tra i sessi e i siti ma solo sulla presenza delle specie fungine; risulta quindi che *A. macrospora* è più presente sugli insetti di entrambi i sessi rispetto *O. ips*.

	Stima	Errore std	DF(gl)	t	P
Specie (<i>O. ips</i>)	-18.986	0.33	214	-5.73	<0.001
Genere (maschio)	-0.57497	0.47	204	-1.23	1,51181
Specie x Genere	0.345347	0.44	214	0,05486	3,00417

Tabella 8: Risultati del GLMM.

Al fine di rendere il risultato più leggibile, i dati sono stati espressi esclusivamente in funzione del fattore specie fungina, per il quale si ha un effetto significativo (Fig. 6).

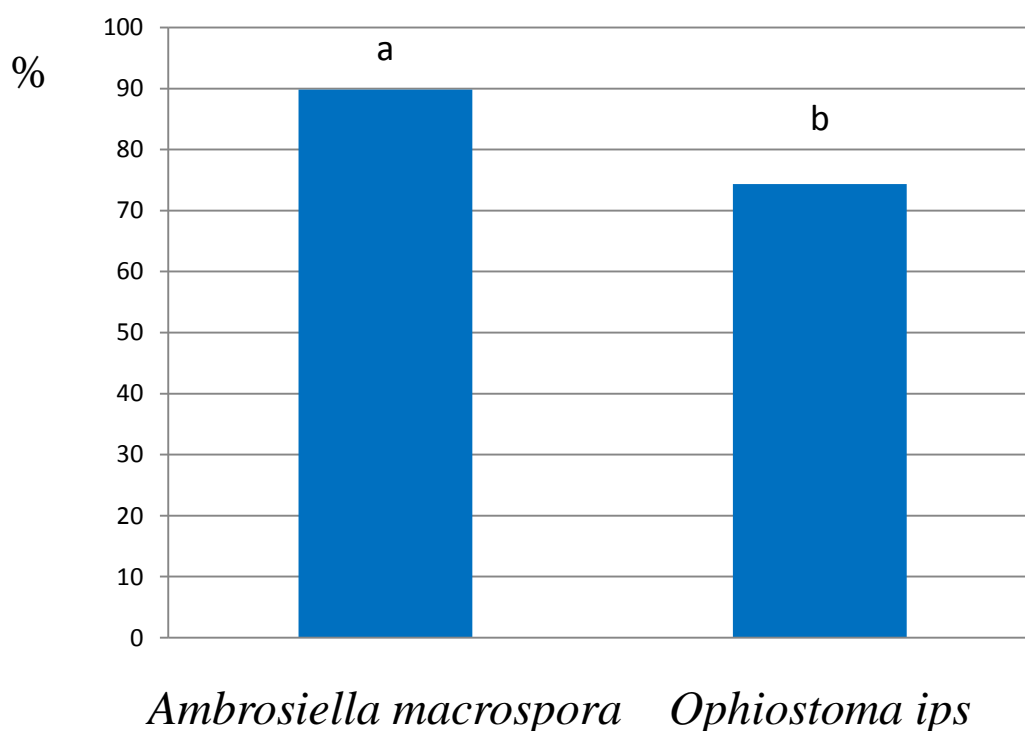


Figura 6: Percentuale di associazione *I. acuminatus* e funghi di azzurramento

pianta uno - VAL DOGNA - femmine					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
A1F	59,08	20	10	3,39	16,61
A2F	28,12	20	10	7,11	12,89
A3F	30,36	20	10	6,59	13,41
A4F	12,1	16	10	13,22	2,78
A5F	46,81	20	10	4,27	15,73
A6F	11,67	16	10	13,71	2,29
A7F	24,67	20	10	8,11	11,89
A8F	34,1	20	10	5,87	14,13
A9F	36,34	20	10	5,5	14,5
A10F	39,78	20	10	5,03	14,97

pianta uno - VAL DOGNA - maschi					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
A1M	10,65	16	10	15,03	0,97
A2M	15,7	20	10	12,74	7,26
A3M	237,77	20	10	0,84	19,16
A4M	37,1	20	10	5,39	14,61
A5M	22,43	20	10	8,92	11,08
A6M	23,02	20	10	8,69	11,31
A7M	14,81	20	10	13,51	6,49
A8M	17,35	20	10	11,53	8,47
A9M	20,49	20	10	9,76	10,24
A10M	21,24	20	10	9,42	10,58

pianta due - VAL DOGNA - femmine					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
B3F	13,45	20	10	14,87	5,13
B4F	189,4	20	10	1,06	18,94
B5F	13,45	20	10	14,87	5,13
B6F	9,87	16	10	16,21	0
B7F	10,76	16	10	14,87	1,13
B8F	28,41	20	10	7,04	12,96
B9F	14,34	20	10	13,95	6,05
B10F	17,5	20	10	11,43	8,57

Tabella 9: Concentrazione DNA dei campioni estratti (CONTINUA)

pianta due - VAL DOGNA - maschi					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
B1M	11,22	16	10	14,26	1,74
B2M	13,02	20	10	15,36	4,64
B3M	16,75	20	10	11,94	8,06
B4M	23,79	20	10	8,41	11,59
B5M	17,35	20	10	11,53	8,47
B6M	24,09	20	10	8,3	11,7
B7M	23,03	20	10	8,68	11,32
B8M	20,49	20	10	9,76	10,24
B9M	23,78	20	10	8,41	11,59
B10M	21,5	20	10	9,3	10,7

pianta uno - VAL VENOSTA - femmine					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
C1F	13,16	20	10	15,2	4,8
C2F	15,25	20	10	13,11	6,89
C3F	9,87	16	10	16,21	0
C4F	9,87	16	10	16,21	-0,21
C5F	10,91	16	10	14,66	1,34
C6F	15,55	20	10	12,86	7,14
C7F	12,56	20	10	15,92	4,08
C8F	9,87	16	10	16,21	0
C9F	20,49	20	10	9,76	10,24
C10F	10,17	16	10	15,73	0,27

pianta uno - VAL VENOSTA - maschi					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
C1M	27,22	20	10	7,35	12,65
C2M	21,38	20	10	9,35	10,65
C3M	19,14	20	10	10,45	9,55
C4M	12,72	20	10	15,72	4,28
C5M	10,77	16	10	14,86	1,14
C6M	10,17	16	10	15,73	0,27
C7M	23,34	20	10	8,57	11,43
C8M	15,7	20	10	12,74	7,26
C9M	30,36	20	10	6,59	13,41
C10M	47,41	20	10	4,22	15,78

Tabella 9: Concentrazione DNA dei campioni estratti (CONTINUA)

pianta due - VAL VENOSTA - femmine					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
D1F	21,24	20	10	9,42	10,58
D2F	163,93	20	10	1,22	18,78
D3F	20,78	20	10	9,62	10,38
D4F	26,92	20	10	7,43	12,57
D5F	16,13	20	10	12,4	7,6
D6F	17,5	20	10	11,43	8,57
D7F	33,65	20	10	5,94	14,06
D8F	9,87	16	10	16,21	0
D9F	11,67	16	10	13,71	2,29
D10F	14,35	20	10	13,94	6,06

pianta due - VAL VENOSTA - maschi					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
D1M	26,32	20	10	7,6	12,4
D2M	22,43	20	10	8,92	11,08
D3M	23,02	20	10	8,69	11,31
D4M	31,85	20	10	6,28	13,72
D5M	17,05	20	10	11,73	8,27
D6M	21,98	20	10	9,1	10,9
D7M	30,81	20	10	6,49	13,51
D8M	26,02	20	10	7,69	12,31
D9M	24,23	20	10	8,25	11,75
D10M	17,5	20	10	11,43	8,57

pianta uno - VALCAMONICA - femmine					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
E1F	23,48	20	10	8,52	11,48
E2F	10,77	16	10	14,86	1,14
E3F	22,72	20	10	8,8	11,2
E4F	39,78	20	10	5,03	14,97
E5F	27,81	20	10	7,19	12,81
E6F	44,72	20	10	4,47	15,53
E7F	24,97	20	10	8,01	11,99
E8F	10,32	16	10	15,5	0,5
E9F	13,9	20	10	14,39	5,61
E10F	25,42	20	10	7,87	12,13

Tabella 9: Concentrazione DNA dei campioni estratti (CONTINUA)

pianta uno - VALCAMONICA - maschi					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
E1M	50,37	20	10	3,97	16,03
E2M	27,67	20	10	7,23	12,77
E3M	9,87	16	10	16,21	-0,21
E4M	26,32	20	10	7,6	12,4
E5M	20,64	20	10	9,69	10,31
E6M	37,04	20	10	5,4	14,6
E7M	23,77	20	10	8,42	11,58
E8M	13,9	20	10	14,39	5,61
E9M	12,56	20	10	15,92	4,08
E10M	18,4	20	10	10,87	9,13

pianta due - VALCAMONICA - femmine					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
F1F	70,16	20	10	2,85	17,15
F2F	12,56	20	10	15,92	4,08
F3F	42,77	20	10	4,68	15,32
F4F	21,22	20	10	9,43	10,57
F5F	21,84	20	10	9,16	10,84
F6F	14,65	20	10	13,65	6,35
F7F	11,66	16	10	13,73	2,27
F8F	18,41	20	10	10,86	9,14
F9F	34,99	20	10	5,72	14,28
F10F	11,06	16	10	14,46	1,54

pianta due - VALCAMONICA - maschi					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
F1M	18,4	20	10	10,87	9,13
F2M	12,71	20	10	15,73	4,27
F3M	23,02	20	10	8,69	11,31
F4M	15,7	20	10	12,74	7,26
F5M	14,36	20	10	13,93	6,07
F6M	18,84	20	10	10,62	9,38
F7M	15,71	20	10	12,73	7,27
F8M	24,23	20	10	8,25	11,75
F9M	16,3	20	10	12,27	7,73
F10M	23,17	20	10	8,63	11,37

Tabella 9: Concentrazione DNA dei campioni estratti (CONTINUA)

pianta uno - CORTINA - femmine					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
G1F	27,12	20	10	7,38	12,62
G2F	62,2	20	10	3,22	16,78
G3F	17,94	20	10	11,15	8,85
G4F	23,32	20	10	8,58	11,42
G5F	14,5	20	10	13,79	6,21
G6F	53,66	20	10	3,73	16,27
G7F	10,78	16	10	14,85	1,15
G8F	17,05	20	10	11,73	8,27
G9F	17,51	20	10	11,42	8,58
G10F	52,97	20	10	3,78	16,22

pianta uno - CORTINA - maschi					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
G2M	41,12	20	10	4,86	15,14
G3M	44,12	20	10	4,53	15,47
G4M	22,72	20	10	8,8	11,2
G5M	237,7	20	10	0,84	19,16
G6M	51,6	20	10	3,88	16,12
G7M	97,86	20	10	2,04	17,96
G8M	34,99	20	10	5,72	14,28
G9M	13,9	20	10	14,39	5,61
G10M	18,09	20	10	11,06	8,94

pianta due - CORTINA - femmine					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
H1F	10,33	16	10	15,49	0,51
H3F	42,62	20	10	4,69	15,31
H4F	16,16	20	10	12,38	7,62
H5F	20,79	20	10	9,62	10,38
H6F	61,61	20	10	3,25	16,75
H7F	14,35	20	10	13,93	6,07
H8F	40,37	20	10	4,95	15,05
H9F	29,45	20	10	6,79	13,21
H10F	29,15	20	10	6,86	13,14

Tabella 9: Concentrazione DNA dei campioni estratti (CONTINUA)

pianta due - CORTINA - maschi					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
H1M	44,71	20	10	4,47	15,53
H2M	18,85	20	10	10,61	9,39
H4M	64,01	20	10	3,12	16,88
H5M	174,97	20	10	1,14	18,86
H6M	193,67	20	10	1,03	18,97
H7M	27,37	20	10	7,31	12,69
H8M	31,7	20	10	6,31	13,69
H9M	74,33	20	10	2,69	17,31
H10M	20,92	20	10	9,56	10,44

pianta uno - VALTELLINA - femmine					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
I1F	24,52	20	10	8,16	11,84
I2F	64,16	20	10	3,12	16,88
I3F	39,15	20	10	5,11	14,89
I5F	83,47	20	10	2,4	17,6
I6F	14,36	20	10	13,93	6,07
I7F	20,65	20	10	9,69	10,31
I8F	16,76	20	10	11,93	8,07
I9F	12,58	20	10	15,9	4,1
I10F	31,7	20	10	6,31	13,69

pianta uno - VALTELLINA - maschi					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
I1M	34,24	20	10	5,84	14,16
I2M	35,44	20	10	5,64	14,36
I3M	14,36	20	10	13,93	6,07
I4M	42,34	20	10	4,72	15,28
I6M	15,25	20	10	13,11	6,89
I7M	35,44	20	10	5,64	14,36
I8M	59,22	20	10	3,38	16,62
I9M	101,38	20	10	1,97	18,03
I10M	11,67	16	10	13,71	2,29

Tabella 9: Concentrazione DNA dei campioni estratti (CONTINUA)

pianta due - VALTELLINA - femmine					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
L1F	23,04	20	10	8,68	11,32
L2F	26,03	20	10	7,68	12,32
L3F	80,92	20	10	2,47	17,53
L4F	47,27	20	10	4,23	15,77
L5F	48,01	20	10	4,17	15,83
L7F	33,65	20	10	5,94	14,06
L8F	20,19	20	10	9,91	10,09
L9F	10,92	16	10	14,65	1,35
L10F	20,19	20	10	9,91	10,09

pianta due - VALTELLINA - maschi					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
L1M	24,69	20	10	8,1	11,9
L2M	58,93	20	10	3,39	16,61
L3M	27,37	20	10	7,31	12,69
L4M	15,1	20	10	13,25	6,75
L5M	25,42	20	10	7,87	12,13
L6M	25,57	20	10	7,82	12,18
L8M	19,74	20	10	10,13	9,87
L9M	32,45	20	10	6,16	13,84
L10M	34,99	20	10	5,72	14,28

pianta uno - VAL d'AOSTA - femmine					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
M1F	39,19	20	10	5,1	14,9
M2F	8,53	16	10	16,21	0
M3F	42,19	20	10	4,74	15,26
M4F	26,47	20	10	7,56	12,44
M5F	6,73	16	10	16,21	0
M6F	12,56	20	10	15,92	4,08
M7F	42,62	20	10	4,69	15,31

Tabella 9: Concentrazione DNA dei campioni estratti (CONTINUA)

pianta uno - VAL d'AOSTA - maschi					
Sigla	Conc. media ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. fin	Conc. Fin. ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. DNA	Vol. H ₂ O
M1M	42,62	20	10	4,69	15,31
M2M	29,45	20	10	6,79	13,21
M3M	25,57	20	10	7,82	12,18
M4M	18,69	20	10	10,7	9,3
M5M	23,77	20	10	8,41	11,59
M6M	15,7	20	10	12,74	7,26
M7M	12,42	16	10	12,88	3,12
M8M	17,05	20	10	11,73	8,27
M10M	36,61	20	10	5,46	14,54

Tabella 9: Concentrazione DNA dei campioni estratti (FINE)

5. Discussione e Conclusione

Da anni la simbiosi esistente tra scolitidi e funghi di azzurramento è stata oggetto di studi approfonditi, non solo per l'interesse biologico, ma soprattutto per i problemi economici che può causare (Kirisits, 2004). L'azione sinergica dei due agenti, infatti, grazie alla possibilità di sopprimere le risposte di difesa della pianta, ha portato in vari casi, soprattutto in assenza di interventi, al verificarsi di vere e proprie morie (Webber e Brasier, 1984; Villari, 2008). Da questo punto di vista è bene ricordare che piante attaccate da *I. acuminatus* non hanno possibilità di ripresa e sono comunque destinate a morire entro pochi mesi. Essendo il più piccolo degli scolitidi è stato per molto tempo considerato privo di interesse selvicolturale, ma a causa dei forti danni economici indotti dalle prime infestazioni, si è cominciato a prestarvi una forte attenzione (Ferraro, 2010).

Questo insetto è associato da molti autori a due specie di funghi agenti di azzurramento, *O. ips* le cui forme anamorfe sono *Leptographium* e *Hylorhinochlaediella* (Hunt, 1956; Upadhyay, 1981; Zhou *et al.*, 2004b; Davidson, 1978) e *O. brunneo-ciliatum*, che possiede come anamorfo il genere *Grapium* (Wingfield *et al.* 1993, Yamoaka *et al.*, 1998). Inoltre è anche associato ad un fungo dell'ambrosia, *A. macrospora*, utile alla sopravvivenza delle larve.

La ricerca riguardante l'associazione tra scolitidi e funghi è stata portata avanti, fino a pochi anni fa, esclusivamente con tecniche tradizionali che, a causa della morfologia molto simile dei funghi e ai limiti della coltivazione in vitro, ha spesso dato luogo a risultati imprecisi e a volte contrastanti. Le tecniche DNA-based invece consentono di rilevare in modo specifico piccolissime quantità di DNA target (Saiki *et al.*, 1988, Villari, 2008). Questo le rende quindi uno dei metodi migliori per il monitoraggio di patogeni su piante ospiti o vettori infetti, motivo per cui sono oggi largamente utilizzate in patologia vegetale (Kim *et al.*, 1999; Schweigkofler *et al.*, 2005; Roets *et al.*, 2006, Villari, 2008).

Questa tesi di laurea, inseritasi in un progetto che ha lo scopo di approfondire le conoscenze riguardo alcuni aspetti della simbiosi tra *Ips acuminatus* e dei funghi ad esso associati, si pone l'obiettivo di studiare, tramite l'utilizzo di tecniche molecolari,

la composizione della flora fungina associata ad *I. acuminatus* nelle popolazioni dell'arco Alpino.

In particolare, i risultati mostrano come non esistano differenze tra la percentuale di presenza di funghi nelle diverse aree e come neanche il sesso del vettore influisca sulla percentuale di presenza di funghi.

Nel caso in cui, invece, si analizzi la differenza tra la presenza di una specie rispetto all'altra i risultati mostrano che *A. macrospora* risulta significativamente più presente (circa il 15% in più) rispetto *O. ips*, indipendentemente dal sesso del vettore. Per valutare questi risultati bisogna però tenere presente della tecnica di campionamento utilizzata. Gli scolitidi infatti sono stati catturati subito dopo la loro uscita dal legno colonizzato, e portano quindi una carica di inoculo molto elevata. Ciò non vuol dire che al momento della colonizzazione di un nuovo ospite portino la stessa carica vitale di inoculo. Durante il volo del vettore, infatti, le spore possono essere dilavate dall'acqua o comunque perdere vitalità a causa degli agenti atmosferici. Il fatto che alcuni Autori riportino che *Ambrosiella macrospora* sia trasportata principalmente dalle femmine, all'interno di micangi mandibolari (Cassar e Blackwell, 1996; Batra, 1967; Mathiesen 1950; Frncke-Grosmann 1952), può essere probabilmente interpretato come una maggiore possibilità per le spore di *Ambrosiella* trasportate all'interno dei micangi di arrivare vitali nell'ospite successivo.

Il fatto che *Ambrosiella macrospora* sia significativamente più presente di *Ophiostoma ips* può essere interpretato come una necessità maggiore da parte dello scolitide di avere una simbiosi trofica, piuttosto che una simbiosi con un fungo di azzurramento. La simbiosi trofica infatti è molto importante per lo sviluppo delle larve. Non dobbiamo infine dimenticare che questi sono esclusivamente dati parziali, poiché manca la percentuale di associazione con l'altro patogeno di azzurramento, *Ophiostoma brunneo-cilvatum*.

6. Bibliografia

- Batra L. R., 1967, *Ambrosia fungi: a taxonomic revision and nutritional studies of some species*, Mycologia, 59: 979 - 1017.
- Battisti A, Paoletti E, Ragazzi A, 2009. *Selvicoltura e protezione delle foreste: risultati e prospettive del III Congresso Nazionale di Selvicoltura*. Forest@ 6: 66-74 (Internet). Disponibile all'indirizzo: <http://www.sisef.it/forest@/>.
- Beaver R. A., 1989. *Insect-Fungus Relationships in the Bark and Ambrosia Beetles*. In: Insect-fungus interactions. Wilding N. Collins N. M., Hammond P. M., Webber J. F. (Eds.), Academic Press, : 121-138.
- Bernardinelli I., Risk mapping *per attacchi di bostrico tipografo nei boschi del friuli venezia giulia*. In: Riassunti III Congresso Nazionale di Selvicoltura (Ciancio O ed). Taormina, 16-19 Ottobre 2008, : 261.
- Bomba A., 2003, Le tecniche molecolari nella diagnostica infettivologica, Riv Med Lab - JLM, 4 (2-S1): 45-48.
- Brown T. A., *Genomi 2*, seconda edizione, EdiSES, Department of Biomolecular Sciences, UMITS, Manchester, UK.
- Bueno A., Diez J. J., Fernández M. M., 2010, *Ophiostomatoid fungi transported by Ips sexdentatus (Coleoptera; Scolytidae) in Pinus pinaster in NW Spain*. Silva Fennica, 44 (3): 387 - 397.
- Bustin S. A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, Journal of Molecular Endocrinology, 25: 169 – 193.
- Cassar S., Blackwell M., 1996, *Convergent origins of ambrosia fungi*. In: Mycologia. The New York Botanical Garden, Bronx, : 596 - 601.

- Colombari F., Faccoli M., Battisti A., *Nemici Naturali Di Ips Acuminatus Sulle Alpi Orientali: Diversità E Incidenza*. XXII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia Ancona 15-18 Giugno 2009, Proceedings, Tipografia Coppini - Firenze, maggio 2009.
- Cozzi R., Protti P., Ruaro T., 1998, *Elementi di analisi chimica strumentale*, Zanichelli, Bologna, IT.
- Dal Pont C., 2008. *Infestazioni di Ips acuminatus (Gyllenhal) (Coleoptera Scolytinae) in pinete del Cadore: analisi dei danni in un biennio di osservazioni*. [Laurea specialistica biennale]
- Davidson R. W., 1978, *Staining fungi associated with Dendroctonus adjunctus in pines*, Mycologia 70: 35 - 40. Disponibile all'indirizzo:
<http://www.sisef.it/forest@/show.php?id=644>
- Douglas A. E. 2003, *Buchnera bacteria and other symbionts of aphids*. In *Insect Symbiosis*, In Insect Symbiosis, ed. K. Bourtzis & T.A. Miller, CRC Press, Boca Raton, : 23-38
- Faccoli M., Colombari F., Dal Pont C., Finozzi V., D'Ambros E., Battisti A., *Gravi infestazioni di bostrico acuminato in formazioni alpine di pino silvestre*, Forest@, 6: 66 - 74, (Internet).
- Ferraro T., 2010, *Valutazione dell'efficacia di cattura di sistemi di monitoraggio basati sull'uso di trappole a feromoni per il controllo integrato di infestazioni di IPS Acuminatus Gyll*. [Laurea specialistica biennale].
- FitFor: Ips acuminatus* (Coleoptera Scolytidae), (Internet). Disponibile all'indirizzo:
http://www.unipd.it/esterni/wwwfitfo/ips_acuminatus.htm
- Franceschi V. R., Krokene P., Christiansen E., Krekling T., 2005. *Anatomical and chemical defences of conifer bark against bark beetles and other pests*. New Phytologist 167: 353 - 376.

- Francke-Grosmann H., 1952, *Über die ambrosiazucht der kiefernborckenkäfer myelophilus minor Htg. und Ips acuminatus Gyll.* Meddelanden Statens Skogsforskning-institut, Stockholm, 41: 1-52.
- Gambetta A., 2004, *Analisi e trattamenti curativi - difesa dagli xilofagi.* In: Il Manuale del Legno Strutturale, Interventi sulle strutture, Vol.IV°, Mancosu editore, Roma, : 240-259.
- Ghaioule, D., El Omari, H., Rahouti, M., and Lieutier, F. 2007. *Ophiostoma ips colonization of phloem and sapwood in maritime pine logs.* Tunisian Journal of Plant Protection, 2: 85 - 97.
- Gilbert M. Thomas P., Moore W., Melchior L., Worobey M., 2010. DNA Extraction from Dry Museum Beetles without Conferring External Morphological Damage, PLoS ONE, 3: e272
- Glass N. L. and Donaldson G. C., 1995. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes, Applied and Environmental Microbiology, 61: 1323 - 1330.
- Gorton C., Kim S. H., Henricot B., Webber J., Breuil C, 2004, *Phylogenetic analysis of the bluestain fungus Ophiostoma minus based on partial ITS rDNA and β -tubulin gene sequences,* Mycological Research, 108: 759 - 765.
- Grobbelaar J., Aghayeva D., De Beer Z. W., Bloomer P., Wingfield M., Wingfield B., 2009. Delimitation of *Ophiostoma quercus* and its synonyms using multiple gene phylogenies, Mycological Progress, 8: 221 - 236.
- Guérard N., Dreyer E., Lieutier F., 2000, Interactions between Scots pine, *Ips acuminatus* (Gyll.) and *Ophiostoma brunneo-ciliatum* (Math.): estimation of the critical thresholds of attack and inoculation densities and effects on hydraulic properties in the stem. Sciences 2000(57): 681 - 690.
- Hunt J., 1956, *Taxonomy of the genus Ceratocystis,* Lloydia 19: 1–58.
- Jaeger E. E. M., Carroll N. M., Choudhury S., Dunlop A. A. S., Towler H. M. A., Matheson M. M., Adamson P., Okhravi N., and Lightman S., 2000. Rapid

Detection and Identification of Candida, Aspergillus, and Fusarium Species in Ocular Samples Using Nested PCR, Journal of Clinical Microbiology, 38(8): 2902–2908.

- Kim H. S., Uzunovic A., Breuil C., 1999, *Rapid detection of Ophiostoma piceae and O. quercus in stained wood by PCR*, Appl. Environ. Microb., 65: 287 - 290.
- Kirisits T., 2004. *Fungal associated of European bark beetles with special emphasis on the Ophiostomatoid fungi*. In: Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, A Synthesis. Lieutier et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, : 181-235.
- Kwok S., Kellogg D.E., McKinney N., Spasic D., Godal L., Levenson C., Sninsky J.J., *Effects of primer - template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies*, Department of Infectious Diseases and Department of Chemistry, Cetus Corporation, Emeryville, CA, USA, 18(4): 999 - 1005.
- Lieutier F., 2004, *Bark and wood boring insects in living trees in Europe*, Springer.
- Lieutier F., Garcia J., Yart A., Vouland G., Pettinetti M., Morelet M., 1991, *Ophiostomatales (Ascomycètes) associées à Ips acuminatus Gyl (Coleoptera: Scolytidae) sur le pin sylvestre (Pinus sylvestris L.) dans le Sud-Est de la France et comparaison avec Ips sexdentatus*, Agronomie, 11: 807 - 817.
- Lieutier F., Yart A., Salle A., 2009. *Stimulation of tree defenses by Ophiostomatoid fungi can explain attack success of bark beetles on conifers*, Sciences, 66(8): 801.
- Linnakoski R., De Beer Z.W., Ahtiainen J., Sidorov E., Niemelä P., Pappinen A., Wingfield M.J., 2010, *Ophiostoma spp. associated with pine- and spruce-infesting bark beetles in Finland and Russia*, Persoonia, 25: 72–93.
- López Romero S., Romón Ochoa P., Iturrondobeitia Bilbao J. C., Goldaracena Lafuente A., 2007, *Los escolítidos de las coníferas del País Vasco, Guía práctica para su identificación y control*, Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco, Vitoria-Gasteiz.

- Lu Q., Decock C., Zhang X. Y., Maraite H., 2009, Ophiostomatoid fungi (Ascomycota) associated with *Pinus tabulaeformis* infested by *Dendroctonus valens* (Coleoptera) in northern China and an assessment of their pathogenicity on mature trees, *Antonie van Leeuwenhoek*, 96: 275 – 293.
- Malloch D., Blackwell M., 1993. *Dispersal biology of the ophiostomatoid fungi*. In: *Ceratocystis and Ophiostoma*. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. Wingfield M. J., Seifert K. A., Webber J. F. (Eds), APS Press, : 195 - 206.
- Mapelli N., 2008, *Vita In Campagna*. In: *Agricoltura Biologica/Ambiente*, 2008(3): 56 - 57.
- Margulis L. and Sagan D., 1986, *Microcosmos Four Billion Years of Evolution from Our Microbial Ancestors*. Summit Books, New York
- Mathiesen, A., 1950, *Über einige mit borkenkäfern assoziierte blauepilze im Schweden*. *Oikos*, 2: 275 - 308.
- Nierhaus-Wunderwald D., Forster B., 2000, *Coleotteri corticicoli sui pini*, Istituto federale di ricerca WSL CH-8903 Birmensdorf, 2000(31).
- Paine T. D., Raffa K. F., Harrington T. C., 1997. *Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers*. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 179 - 206.
- Roets F., Wingfield M. J., Dreyer L. L., Crous P. W., Dirk U. B., 2006. *A PCRbased method to detect species of Gondwanamyces and Ophiostoma on surfaces of insects colonizing Protea flowers*. *Can. J. Bot.*, 84(6): 989 - 994.
- Saiki R. K., Gyllensten U. B., Erlich H. A., 1988. *The polymerase chain reaction*. In: *Genome analysis, a practical approach*. Davies K. E. (Ed.), IRL Press, : 141-152.
- Salvadori C., Stergulc F., 2008, *Indirizzi selvicolturali per il contenimento dei danni da bostrico nelle foreste delle alpi orientali*. In: *Riassunti III Congresso Nazionale di Selvicoltura (Ciancio O ed)*. Taormina (Italy), 16-19 Ottobre 2008, : 114.

- Sapp J., 1994, *Evolution by Association*, Oxford University Press.
- Schena L., Nigro F., Ippolito A. and Gallitelli D., 2004. *Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi*, European Journal of Plant Pathology, 110: 893 - 908.
- Schweigkofler W., Ostrosina W. J., Smith S. L., Cluck D. R., Maeda K., Peay K. G., Garbelotto M., 2005. *Detection and quantification of Leptographium wageneri, the cause of black-stain root disease, from bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) in Northern California using regular and real-time PCR*. Can. J. For. Res., 35: 1798 - 1808.
- Stergulc F., Frigmelica G., 1996. *Insetti e funghi dannosi ai boschi del Friuli Venezia Giulia*, Udine, Servizio selvicoltura, : 231 - 233.
- Upadhyay H. P., 1981, *A monograph of Ceratocystis and Ceratocystiopsis*. The University of Georgia Press, Georgia, USA.
- Upadhyay, H. P., 1981, *Monograph of Ceratocystis and Ceratocystiopsis*, University of Georgia Press (Athens),
- Villari C. 2008. *Nuovi approcci metodologici per lo studio di alcune malattie fungine del pino: analisi della suscettibilità stress-indotta e quantificazione per via molecolare dell'inoculo diffuso da vettori*. [Tesi di Laurea specialistica in Scienze e Tecnologie Fitosanitarie, Università degli Studi di Firenze]
- Villari C., Battisti A., Bonello P., Capretti P. & Faccoli M., 2009. *Symbiotic fungi associated with Ips acuminatus (Coleoptera Curculionidae) in the Italian Alps*. IUFRO Meeting of Working Unit 7.03.11: tree Resistance to Insects. San Vito di Cadore – Cortina d'Ampezzo (Italy), 30 agosto – 2 settembre, 2009: 42.
- Webber J. F., Gibbs J. N., 1989. *Insect dissemination of fungal pathogens of trees*. In: Insect-fungus interactions. Wilding N. Collins N. M., Hammond P. M., Webber J. F. (Eds.), Academic Press, : 161 - 193.

- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Innis M. A., Gefland D. H., Sninsky J. J., White T. J. (Eds), Academic Press, : 315 - 322.
- Whittaker Q., Ascomycota, Rev. Biol., 34: 220 - 1959.
- Whittaker R. H., 1959, *New Concepts of Kingdoms of Organisms*. Science 163(3863) : 150 - 160.
- Wingfield MJ., 1993. *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, ecology, and pathogenicity*. K.A. Seifert, and J.F. Webber (eds.), APS Press. St. Paul, MN. : 293.
- Yamaoka Y., Wingfield M. J., Ohsawa M. and Kuroda Y., 1998, *Ophiostomatoid fungi associated with Ips cembrae in Japan and their pathogenicity to Japanese larch*, Mycoscience, 39: 367 - 378.
- Zhou X., De Beer Z. W, Cibrian D., Wingfield B. D. and Wingfield M. J., 2004b, *Characterisation of Ophiostoma species associated with pine bark beetles from Mexico, including O. pulvinisporum sp. nov.*, Mycological Research, 108 (6): 690 - 698.
- Zhou X., De Beer, Z.W., Ahumada, R., Wingfield, B.D. and Wingfield, M.J. 2004a, *Ophiostoma and Ceratocystiopsis spp. associated with two pine-infesting bark beetles in Chile*. In: Fungal Diversity, 15: 261 - 274.
- Zhou X., De Beer W., Wingfield B. D. and Wingfield M. J., 2002, *Infection sequence and pathogenicity of Ophiostoma ips, Leptographium serpens and L. lundbergii to pines in South Africa*, Fungal Diversity, 10: 229-240.

Ringraziamenti

Desidero innanzitutto ringraziare il Professor Andrea Battisti per la grande disponibilità e cortesia dimostratemi e per avermi permesso di fare questa esperienza. Un grazie di cuore alla Dottoressa Caterina Villari e al Dottor Mauro Simonato per tutto l'aiuto fornito durante le analisi di laboratorio e le interminabili ore spese a consigliarmi e correggere questa tesi di laurea.

Grazie a tutto il Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali, per avermi ospitato e per avermi sempre fatto sentire a mio agio e in particolare a Daniel, Edoardo, Isabel, Claudia, Matteo e Linda per la compagnia.

Grazie anche Valentina per avermi sempre sostenuto e creduto in me, anche nei momenti più bui, quando tutto sembrava perduto e avermi sopportato in questo ultimo periodo quando il tempo era ormai poco e gli impegni sempre troppi.

Grazie a Riz, Mary e Cai per le pause caffè, il sostegno nel finire gli ultimi esami e i consigli.

Un sentito ringraziamento va anche a tutta la mia famiglia, a Massa e a Lisa che con il loro incrollabile sostegno morale (e non...), mi hanno permesso di raggiungere questo traguardo.

Infine, ma non di minor importanza, un grazie a tutti i compagni di corso vecchi e nuovi e alle coinquiline.