



Cyprus
University of
Technology

Faculty of Geotechnical
Sciences and Environmental
Management

Master's Thesis

***Kalmusia variispora* as a new Grapevine Trunk Disease pathogen
record in Cyprus**

Georgios P. Makris

Limassol, December 2023

CYPRUS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
FACULTY OF GEOTECHNICAL SCIENCES AND ENVIRONMENTAL
MANAGEMENT
DEPARTMENT OF AGRICULTURAL SCIENCES, BIOTECHNOLOGY
AND FOOD SCIENCE

Master's Thesis

Kalmusia variispora as a new Grapevine Trunk Disease pathogen
record in Cyprus

Georgios P. Makris

Supervisor

Dr. Loukas Kanetis, Associate Professor

Limassol, December 2023

Approval Form

Master's Thesis

***Kalmusia variispora* as a new Grapevine Trunk Disease pathogen record in Cyprus**

Presented by

Georgios P. Makris

Supervisor: Loukas Kanetis, Associate Professor (Cyprus University of Technology)

Signature _____

Committee member: Iakovos Pantelides, Assistant Professor (Cyprus University of Technology)

Signature _____

Committee member: Dr. Emmanouil Markakis, Researcher A (Institute of Olive Tree, Subtropical Crops and Viticulture at the Hellenic Agricultural Organization “DIMITRA”)

Signature _____

Cyprus University of Technology

Limassol, December 2023

Copyrights

Copyright© 2023 Georgios P. Makris

All rights reserved.

The approval of the MSc Thesis by the Department of Department of Agricultural Sciences, Biotechnology and Food Science does not necessarily imply the approval of writer's views by the Department.

Acknowledgements

Samples were collected from grapevines exhibiting GTD symptoms by Solonas Solonos and Marios Christodoulou as part of their MSc Thesis. The current work was carried out in the premises of the Department of Agricultural Sciences, Biotechnology, and Food Science at the Cyprus University of Technology in Limassol, Cyprus. Phylogenetic analyses and morphology pictorals were made in the facilities of Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (KNAW) in Utrecht, The Netherlands by George P. Makris under the supervision of Professor Pedro W. Crous and Dr. Marcelo Sandoval Denis. I would like also to acknowledge Dr. Michalakis Christoforou for providing the plot and all the necessary cultural practices to perform the pathogenicity assay in Akaki, Nicosia, Cyprus.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ασθένειες του ξυλώματος της αμπέλου (ΑΞΑ) συγκροτούν άθροισμα ασθενειών μυκητολογικής προέλευσης και θεωρούνται ο πλέον καταστροφικός βιοτικός παράγοντας της καλλιέργειας παγκοσμίως. Πέρα των ήδη γνωστών παθογόνων αιτιών, πρόσφατες μελέτες έχουν αυξήσει τις γνώσεις μας σχετικά με νέα είδη μυκήτων που αποικίζουν και προσβάλλουν το ξύλωμα της αμπέλου. Την περίοδο 2017-2018 πραγματοποιήθηκε επισκόπηση των κυπριακών αμπελώνων με σκοπό την αξιολόγηση του προβλήματος των ΑΞΑ, στο πλαίσιο της οποίας καταγράφηκε αριθμός απομονώσεων του μύκητα *Kalmusia variispora*. Η ταυτοποίηση του είδους βασίστηκε σε αναλυτική μορφολογική περιγραφή και φυλογενετική ανάλυση έξι διαφορετικών γονιδιακών περιοχών (ITS, LSU, SSU, *b-tub*, *tefl-a* και *rpb2*). Επίσης, αξιολογήθηκε η παθογένεια έξι απομονώσεων με τεχνητές μολύνσεις επί ξυλοποιημένων λαστών σε φυτά αμπέλου υπό συνθήκες αγρού. Το σύνολο των απομονώσεων ήταν παθογόνα, προκαλώντας σκούρο καφέ-μαύρο μεταχρωματισμό και προς τις δυο κατευθύνσεις από το σημείο της μόλυνσης. Δεδομένου ότι η νέκρωση του ξύλου στις ΑΞΑ προκαλείται από λυτικά ένζυμα που παράγουν οι παθογόνοι μύκητες, εξετάσαμε τη δυνατότητα των απομονώσεων του *K. variispora* να παράγουν κυτταρινάσες, πηκτινάσες, λακάσες και αμυλάσες. Όλα τα εξεταζόμενα στελέχη εμφάνισαν κυτταρινολυτική και πηκτινολυτική δραστηριότητα, ενώ κανένα δεν είχε αμυλολυτική δράση. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκκριση λακκάσης μεταξύ των απομονώσεων. Από όσο γνωρίζουμε αυτή είναι η πρώτη καταγραφή του *K. variispora* σχετιζόμενη με ΑΞΑ στην Κύπρο και μια από τις πρώτες παγκοσμίως.

Keywords: Κύπρος; ασθένειες του ξύλου της αμπέλου; *Kalmusia variispora*; *Vitis vinifera*; *Didymosphaeriaceae*

ABSTRACT

Grapevine trunk diseases (GTDs) form an aggregate of fungal origin that is currently considered the most destructive biotic factor of grapevines globally. Beyond the well-known fungal pathogens, recent studies have increased our knowledge regarding new, wood-colonizing fungal species that are associated with GTDs. During a survey conducted between 2017-2018 in Cyprus vineyards to investigate the causal agents of GTDs, the occurrence of a relatively new GTD pathogen, *Kalmusia variispora* was recorded. Detailed species identification was supported by morphology and multilocus phylogenetic analysis of six different loci (ITS, LSU, SSU, *b-tub*, *tefl- α* and *rpb2*). The pathogenicity of representative *K. variispora* isolates was carried out on lignified stems of two-year-old potted grapevines under field conditions for an incubation period of 12 months. All isolates were pathogenic, causing dark brown to black discoloration, extending both ways from the inoculation point. Since wood necrosis in GTDs is caused by fungal digestive exoenzymes we also examined the *in vitro* potential of *K. variispora* to produce cellulases, pectinases, laccases, and amylases. All tested isolates exhibited cellulase and pectinase activity, while none of them showed amylolytic activity. However, there were observed differences in the laccase secretion among isolates. To the best of our knowledge this is the first record of *K. variispora* associated with GTDs in Cyprus and one of a few worldwide.

Keywords: Cyprus; grapevine trunk diseases; *Kalmusia variispora*; *Vitis vinifera*; *Didymosphaeriaceae*