



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

DIPARTIMENTO DI AGRARIA

SEZIONE DI PATOLOGIA VEGETALE ED ENTOMOLOGIA

Via E. De Nicola, 9 – 07100 SASSARI – Tel: 079.229290 Fax: 079.229316

CONVENZIONE DI RICERCA

**Linee guida per la bonifica fitosanitaria dei popolamenti
a prevalenza di leccio nell'isola di Caprera**

RELAZIONE FINALE

Sassari, 4 dicembre 2012

INDICE

PREMESSA.....	Pag.	1
ATTIVITÀ SVOLTE.....	“	2
IN BOSCO:		
Monitoraggio fitosanitario in popolamenti di leccio.....	“	2
Monitoraggio fitosanitario in popolamenti di erica arborea.....	“	2
Monitoraggio fitosanitario in popolamenti di <i>Acacia cyanophylla</i>	“	2
Monitoraggio fitosanitario in popolamenti di ginepro fenicio.....	“	2
IN LABORATORIO:		
Isolamento, identificazione e caratterizzazione di patogeni della chioma.....	“	3
Isolamento, identificazione e caratterizzazione di patogeni radicali.....	“	3
Indagini biomolecolari.....	“	4
Estrazione del DNA.....	“	4
Reazione a catena della polimerasi (PCR).....	“	5
Purificazione degli amplificati, sequenziamento e analisi sequenze.....	“	5
Saggi di patogenicità.....	“	5
Leccio.....	“	6
Erica arborea.....	“	6
Ginepro fenicio.....	“	6
Rilievi fitosanitari ed elaborazione dati.....	“	6
RISULTATI DELLA RICERCA.....	“	7
Indagine nei popolamenti di leccio	“	7
Sintomatologia.....	“	7
Incidenza della malattia.....	“	7
Isolamento e identificazione dei patogeni della chioma.....	“	9
Isolamento e identificazione dei patogeni radicali.....	“	10
Saggi di patogenicità.....	“	11
Indagine nei popolamenti di Erica arborea	“	13
Sintomatologia.....	“	13
Incidenza della malattia.....	“	13
Isolamento e identificazione dei patogeni.....	“	14
Saggi di patogenicità.....	“	14
Indagine nei popolamenti di <i>Acacia cyanophylla</i>	“	16
Sintomatologia.....	“	16
Eziologia.....	“	16
Indagine nei popolamenti di ginepro fenicio	“	17
Sintomatologia.....	“	17
Isolamento e identificazione dei patogeni della chioma.....	“	17
Isolamento e identificazione dei patogeni radicali.....	“	19
Saggi di patogenicità.....	“	21
CONCLUSIONI.....	“	22
Analisi dei risultati	“	22
Linee guida di bonifica fitosanitaria	“	24
Misure di prevenzione.....	“	24
Misure di risanamento.....	“	25

CONVENZIONE DI RICERCA

Linee guida per la bonifica fitosanitaria dei popolamenti a prevalenza di leccio nell'Isola di Caprera

RELAZIONE FINALE

PREMESSA

In accordo con quanto previsto dalla convenzione, l'attività di ricerca è stata indirizzata a chiarire l'eziologia dei fenomeni di degrado dei popolamenti a prevalenza di leccio nell'Isola di Caprera e a definire, di conseguenza, le linee guida per la bonifica fitosanitaria degli stessi.

La ricerca, della durata di un anno, è stata svolta con indagini in bosco e in laboratorio articolate in 3 fasi che prevedevano:

- Fase 1: individuazione e descrizione delle aree infette con restituzione su mappa in un sistema informativo geografico.
- Fase 2: realizzazione di aree di saggio e georeferenziazione delle stesse; valutazione dell'incidenza della malattia, prelievo di campioni sintomatici, isolamento di microrganismi ad essi associati e conservazione degli isolati in coltura pura.
- Fase 3: identificazione degli isolati su basi morfologiche, fisiologiche e biomolecolari e inoculazione degli stessi in semenzali per accertarne la patogenicità; analisi dei risultati e definizione delle linee guida di bonifica fitosanitaria dei popolamenti di leccio.

Nello specifico è stato effettuato il monitoraggio fitosanitario di tutte le aree boschive dell'Isola, sono stati individuati i siti interessati da fenomeni di deperimento e moria di piante e sono stati studiati in particolare i quadri sintomatologici osservati nelle formazioni di leccio, erica arborea, *Acacia cyanophylla* e ginepro fenicio.

Le coordinate geografiche di tutte le aree oggetto di studio sono state rilevate con l'ausilio di un GPS portatile (eTrex, Garmin) e sulla base degli input ricavati è stato organizzato un layer di lavoro, attraverso l'utilizzazione di un software GIS, con ottenimento di carte topografiche tematiche (Allegati 1-4).

Le indagini diagnostiche di laboratorio, effettuate presso la Sezione di Patologia vegetale ed Entomologia del Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Sassari, sono state indirizzate a chiarire l'eziologia delle diverse malattie riscontrate e a caratterizzare sotto il profilo morfologico, patogenetico e biomolecolare i patogeni coinvolti.

Di seguito si riferisce più in dettaglio sulle attività svolte, sui risultati ottenuti e sulle possibili strategie d'intervento da intraprendere per salvaguardare la biodiversità delle aree boschive dell'Isola di Caprera.

Vista la complessità dei quadri sintomatologici ed eziologici riscontrati, l'esposizione è stata organizzata dedicando una sezione specifica a ciascuna delle specie vegetali oggetto di studio.

ATTIVITÀ SVOLTE

IN BOSCO

Monitoraggio fitosanitario nei popolamenti di leccio

In seguito ai sopralluoghi effettuati sono state individuate le zone interessate da fenomeni di deperimento e moria di piante, e in esse allestite 28 aree di saggio circolari di 10 m di diametro (Allegati 1).

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 nella chioma (ingiallimenti, microfillia e rarefazione), nelle branche e nel fusto (disseccamenti, essudati, cancri necrosi e rami epicormici), e nel colletto e nelle grosse radici (cancri, essudati e necrosi).

Da 132 piante sintomatiche, scelte *at random* in tutte le aree di saggio, sono stati prelevati campioni di legno e di corteccia dal margine di cancri sul fusto o sulle branche per isolare gli agenti patogeni responsabili.

Infine, da 54 piante sintomatiche, scelte sempre *at random* nelle varie aree di saggio, sono stati prelevati campioni di suolo e radici per l'isolamento di patogeni ad *habitus* terricolo.

Monitoraggio fitosanitario in popolamenti di erica arborea

Nella parte centrale dell'Isola è stata riscontrata un'insolita alterazione su piante di erica arborea. Al fine di valutare la natura e l'incidenza di tale alterazione sono state allestite 6 aree di saggio circolari di 10 m di diametro (Allegati 2).

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 sui germogli dall'anno e sui giovani rami. Da 3 piante sintomatiche, scelte *at random* per area di saggio, sono stati prelevati 9 campioni di rami e branche per isolare eventuali agenti patogeni e definire l'eziologia dell'alterazione.

Monitoraggio fitosanitario in popolamenti di *Acacia cyanophylla*

Nella parte sud-occidentale dell'Isola è stata riscontrata la presenza di fenomeni di disseccamento e deperimento su piante di *Acacia cyanophylla* (Allegati 3). Al fine di chiarire le cause di questi fenomeni, da 8 piante scelte *at random* che mostravano sintomi di disseccamento sono stati prelevati campioni di rami con cancri e necrosi corticali e campioni di suolo e radici.

Monitoraggio fitosanitario in popolamenti di ginepro fenicio

I sopralluoghi effettuati in tutte le formazioni a ginepro dell'Isola hanno consentito di individuare e delimitare 3 siti con piante di ginepro fenicio deperenti e/o disseccate (Allegati 4).

Nei siti 1 e 2 le piante mostravano quadri sintomatologici simili ed ascrivibili ad infezioni causate da patogeni della chioma. Pertanto sono state monitorate 17 piante per sito, scelte *at random*, prelevando periodicamente campioni di germogli, rami, branche e porzioni di fusto con cancri e necrosi corticali. Nel sito 3, vista la maggiore complessità delle sindromi, sono stati prelevati campioni di fusto con cancri e necrosi corticali da 17 piante che mostravano particolari sintomi di disseccamento dei getti, e campioni di suolo e radici da ulteriori 12 piante, scelte sempre *at random*, che mostravano sintomi di rarefazione della chioma, getti epicormici, disseccamenti e morte repentina.

IN LABORATORIO

Isolamento, identificazione e caratterizzazione di patogeni della chioma

Tutti i campioni prelevati sono stati utilizzati per gli isolamenti entro 48 ore dalla loro raccolta. Dopo un attento esame allo stereomicroscopio volto ad accertare l'eventuale presenza e natura di strutture riproduttive fungine, i campioni sono stati disinfettati in superficie con etanolo al 70% per 30 sec. 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, Oxoid) alla concentrazione di 20 g/L e su farina d'avena agar (OA, Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 72,5 g/L. Le piastre sono state conservate in termostato a 25°C fino alla differenziazione dei caratteri morfologici idonei per l'identificazione. Al fine di favorire la differenziazione delle strutture riproduttive, gli isolati sono stati inoltre trasferiti in piastre Petri contenenti PDA con rametti sterili di leccio e/o ginepro fenicio e aghi di pino e mantenuti a temperatura ambiente con un fotoperiodo naturale.

Dagli campioni con cancri e necrosi sono state costantemente isolate colonie fungine appartenenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae*. Tutte le colonie sono state identificate sulla base dei principali caratteri morfo-culturali (quali: crescita e colorazione della colonia, struttura del micelio, produzione di pigmenti diffusibili a differenti temperature, forma e dimensioni dei conidi), in accordo con le recenti descrizioni morfologiche riportate in letteratura per le specie afferenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae* e consultabili anche nel sito web dedicato: http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site.

Per le indagini micro-morfologiche, da ogni colonia sono stati prelevati i picnidi formati in coltura pura sui differenti substrati e, con l'ausilio di un bisturi sterile, sono state ottenute sezioni sottili degli stessi contenenti i conidi. Questi ultimi sono stati montati su vetrini per microscopia usando lattofenolo come liquido di visione. I vetrini sono stati osservati a 400 ingrandimenti con un microscopio ottico Diaplan Leitz (Leitz, Wetzlar, Germania) e i dati biometrici determinati attraverso il software in dotazione alla camera digitale modello Optika Vision™ Pro versione 2.7 collegata al microscopio. Le osservazioni sono state effettuate su 50 conidi per isolato e i dati riportati come valore minimo-(medio)-massimo. Inoltre, per tutti le specie identificate è stato calcolato il rapporto tra lunghezza e larghezza dei conidi.

Uno o più isolati rappresentativi di ciascuna specie identificata su base morfologica sono stati utilizzati in ulteriori studi biomolecolari, fisiologici e per i saggi di patogenicità.

Infine, tutti gli isolati rappresentativi delle specie identificate sono stati depositati nella collezione micologica della Sezione di Patologia vegetale ed Entomologia del Dipartimento di Agraria dell'Università di Sassari.

Isolamento, identificazione e caratterizzazione di patogeni radicali

Le indagini sono state indirizzate essenzialmente a verificare l'eventuale presenza dei patogeni radicali più pericolosi, appartenenti al genere *Phytophthora*. Contrariamente a quanto avviene per altri patogeni delle piante, l'isolamento diretto delle specie di *Phytophthora* da tessuti di organi infetti (foglie, fusto, radici) delle piante o dal suolo è estremamente difficile. Ciò a causa della scarsa capacità competitiva saprofitica di questi microrganismi rispetto ai funghi e batteri presenti nelle stesse nicchie ecologiche.

Tali problemi in fase di isolamento sono stati risolti attraverso l'impiego della tecnica del *baiting* che sfrutta la capacità delle specie di *Phytophthora* di infettare preferenzialmente i tessuti di alcune piante esca.

Più in particolare, in laboratorio sono stati analizzati campioni di suolo e radici (circa 200 g) entro le 24 ore successive al loro prelievo in bosco. I campioni sono stati versati all'interno di vaschette di plastica contenenti 500 ml di acqua distillata e foglie fresche di *Quercus suber* utilizzate come esche. Dopo 5-7 giorni le foglie che presentavano maculature o aree necrotiche, sono state lavate in acqua sterile, asciugate su carta da filtro e successivamente deposte su piastre Petri contenenti Synthetic Mucor Agar (SMA), un substrato selettivo per *Phytophthorae*. Le piastre sono state trasferite in termostato a 18-20°C, controllate giornalmente e tutte le colonie sviluppatesi con caratteristiche morfologiche tipiche del genere *Phytophthora* sono state asetticamente trapiantate in piastre Petri (90 mm Ø) contenenti carota agar (CA) e PDA. Le colonie ottenute così in purezza sono state mantenute in termostato a 20°C al buio per favorire la differenziazione delle strutture morfologiche necessarie alla loro identificazione a livello di specie.

In una prima fase, l'identificazione delle colonie è stata effettuata su base morfologica, utilizzando sia le chiavi di identificazione proposte da Chen e Zentmyer (1970) e Erwin e Ribeiro (1996). Inizialmente gli isolati sono stati suddivisi in gruppi omogenei sulla base dell'aspetto miceliare delle loro colonie. Successivamente, per tutti gli isolati è stata verificata sia la capacità di produrre clamidospore e hyphal swelling, sia la forma e dimensione delle medesime. Inoltre, è stata rilevata la forma e dimensione degli sporangi e, per le specie ootalliche, anche dei gametangi. Per le specie eterotalliche sono stati effettuati dei saggi in coltura duale per determinare il mating type (A1 o A2) degli isolati attraverso l'utilizzo di ceppi test di tipo sessuale A1 e A2 già noto.

È stato inoltre valutato l'effetto della temperatura sullo sviluppo delle colonie attraverso la misurazione dell'accrescimento radiale giornaliero del micelio. Un dischetto (5 mm Ø) è stato prelevato dal margine di colture di 5 giorni di età e posizionato in piastre Petri (90 mm Ø) contenenti 20 ml di CA. Le piastre sono state incubate, per 4-7 giorni a seconda della specie, a diverse temperature in un range compreso tra 5 e 40°C, con intervalli di 5°C. Ciascuna prova è stata allestita con 3 replicazioni e ripetuta due volte.

Per ognuna delle specie identificate su base morfologica sono stati selezionati uno o più isolati rappresentativi da utilizzare per i successivi studi biomolecolari e fisiologici e per i saggi di patogenicità. Tutti gli isolati rappresentativi di ciascuna specie sono stati infine depositati nella collezione micologica della Sezione di Patologia vegetale e Entomologia del Dipartimento di Agraria dell'Università di Sassari.

Indagini biomolecolari

Alcuni isolati rappresentativi di ciascuna delle specie di *Botryosphaeriaceae* e *Phytophthora* ottenute nel corso delle ricerche, sono stati utilizzati per confermare l'identificazione morfologica attraverso l'amplificazione, il sequenziamento e l'analisi delle sequenze dell'intera regione degli spaziatori interni trascritti (ITS1 e ITS2) e il gene 5.8S del rDNA e una porzione del gene del fattore di allungamento della traduzione EF1- α .

Estrazione del DNA

È stata effettuata seguendo il metodo CTAB riportato da Doyle e Doyle (1987), leggermente modificato. Da colonie pure di 4-7 giorni di età cresciute su PDA sono state prelevate, attraverso l'impiego di un'ansa sterile, porzioni di micelio e trasferite all'interno di tubini Eppendorf contenenti biglie d'acciaio sterili. Il micelio dei campioni è stato quindi triturato mediante un Vibromulino mod. MM300 (Retsch) per 2,5 minuti ad una frequenza di

30 Hz per 2 volte; la prima senza tampone e la seconda con l'aggiunta di 500 µl di tampone (Doyle e Doyle, 1987). Successivamente, i campioni sono stati incubati a 55°C per 30 minuti in un bagno a secco e dopo raffreddamento a temperatura ambiente, previa aggiunta di un volume (500 µl) di cloroformio/alcool isoamilico (24:1 v/v), sono stati centrifugati per 10 min a 8000 rpm a 20°C. Il surnatante è stato quindi trasferito in nuovi tubini Eppendorf e addizionato con un ugual volume di alcool isopropilico (pre-raffreddato a -20°C); il tutto è stato mescolato manualmente e quindi trasferito in ghiaccio per 10 minuti. In seguito i campioni sono stati ulteriormente centrifugati a 13000 rpm per 15 min a 4°C e l'alcool isopropilico è stato eliminato. Il pellet è stato risospeso in 500 µl di etanolo all'80%, e il tutto ulteriormente centrifugato a 13000 rpm per 5 minuti a 4°C con eliminazione dell'etanolo. Il pellet di DNA è stato posto ad asciugare per circa 1 ora e infine risospeso in 40 µl di TE buffer a pH 8 e conservato in frigo a 4°C per le successive analisi.

Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Tramite PCR è stata amplificata la regione ITS utilizzando i *primer* universali ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) e una porzione del gene EF1- α attraverso l'impiego dei *primer* EF1-688F (Alves *et al.*, 2008) e EF1-986R (Carbone e Kohn, 1999). 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 (Hybaid PCR Express). Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti:

1. per la regione ITS: una denaturazione iniziale di 3 min a 95°C, seguita da 35 cicli di 15 s a 95°C, 20 s a 55°C, 1 min a 72°C, ed una estensione finale di 5 min a 72°C.
2. per la regione EF1- α : una denaturazione iniziale di 2 min a 94°C, seguita da 40 cicli di 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 1 min a 72°C, ed una estensione finale di 7 min a 72°C.

Aliquote di 5 µl di ciascun prodotto di amplificazione e dello standard costituito dal BenchTop Φ X174 DNA/HaeIII Markers (Promega) sono stati fatti migrare mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% in tampone TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3), usando come tracciante molecolare il SYBR-Safe (Invitrogen).

L'analisi delle bande elettroforetiche è stata effettuata attraverso un Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ (BIO-RAD).

Purificazione degli amplificati, sequenziamento e analisi delle sequenze

I prodotti PCR sono stati purificati utilizzando il Kit *EUROGOLD Gel Extraction* (EuroClone), seguendo le istruzioni riportate dalla casa produttrice. I purificati sono stati quindi quantificati e una aliquota spedita presso i laboratori della BMR Genomics s.r.l. (www.bmr-genomics.it), spin-off dell'Università di Padova per essere sequenziata.

Le sequenze nucleotidiche sono state lette ed analizzate attraverso il programma FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc.; <http://www.geospiza.com/finchtv>) e i nucleotidi dedotti sono stati infine confrontati con i dati disponibili nel database online GenBank utilizzando il programma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Saggi di patogenicità

Per tutte le specie fungine isolate è stata saggiata la patogenicità su semenzali delle relative specie vegetali ospiti utilizzando gli isolati identificati su base genetica.

Leccio

La patogenicità di un isolato rappresentativo di 4 specie di *Botryosphaeriaceae* e di 3 specie di *Phytophthora* è stata saggiata su semenzali di leccio di 3 anni di età, allevati in fitocella e tenuti in ambiente protetto per 30 giorni ad una temperatura compresa tra 20 e 28°C. Sulla parte basale del fusto di ciascun semenzale è stata praticata con un bisturi sterile una ferita di circa 3-4 mm². Nella ferita è stata quindi inoculata una porzione di micelio di circa 3 mm², prelevata dal margine di colonie di 5 giorni di età su PDA e CA. Per evitare la rapida disidratazione del micelio, il punto d'inoculo è stato avvolto per una settimana con cotone sterile inumidito e protetto con carta stagnola. Le piante testimone sono state trattate come le precedenti, ma inoculate solo con un frammento di PDA sterile. Sono stati saggiati 5 semenzali per patogeno e 5 sono stati impiegati come controllo.

Erica arborea

La patogenicità di un isolato è stata saggiata tramite l'inoculazione di 14 semenzali di erica di 3 anni di età. Sette piante sono state inoculate sui germogli e 7 alla base del fusto. Le piantine sono state inoculate posizionando una porzione di micelio (3-5 mm²) prelevata dal margine di una colonia in attiva crescita su PDA, su una ferita superficiale (~ 3 mm²) fatta con un bisturi sterile. Quattordici piante sono state usate come testimoni. Esse sono state trattate come le precedenti, ma inoculate solo con un frammento di PDA sterile. Per evitare la rapida disidratazione del micelio, il punto d'inoculo è stato avvolto per una settimana con cotone sterile inumidito e protetto con parafilm. Le piante dopo l'inoculazione sono state mantenute in ambiente protetto per 60 giorni ad una temperatura compresa tra 18 e 26°C con fotoperiodo naturale.

Ginepro fenicio

La patogenicità di un isolato rappresentativo di 3 specie di *Botryosphaeriaceae* è stata saggiata su 15 semenzali (5 per ciascun isolato fungino) di ginepro fenicio di 3 anni di età, allevati in fitocella e tenuti in ambiente protetto per 60 giorni ad una temperatura compresa tra 20 e 28°C con fotoperiodo naturale. Sulla parte basale del fusto di ciascun semenzale è stata praticata con un bisturi sterile una ferita di circa 4 mm². Nella ferita è stata quindi inoculata una porzione di micelio di circa 3-5 mm², prelevata dal margine di colonie di 5 giorni di età su PDA. Per evitare la rapida disidratazione del micelio, il punto d'inoculo è stato avvolto per una settimana con cotone sterile inumidito e protetto con carta stagnola. Cinque piante sono state usate come testimoni. Esse sono state trattate come le precedenti, ma inoculate solo con un frammento di PDA sterile.

Rilevi fitosanitari ed elaborazione dei dati

Sono stati effettuati settimanalmente su tutte le piante inoculate. Alla fine di ogni periodo sperimentale è stata rilevata la presenza e la natura dei sintomi esterni ed interni causati da ciascun patogeno.

Da tutte le piante inoculate sono stati effettuati isolamenti (su PDA) dai tessuti corticali e legnosi prossimi al punto di infezione, al fine di accertare la presenza del patogeno inoculato e soddisfare i postulati di Koch.

I dati relativi alla lunghezza dell'area necrotica causata da ciascun isolato nei saggi di patogenicità, sono stati sottoposti all'analisi della varianza ANOVA e al test di confronto multiplo LSD per valutare la significatività delle differenze tra le medie per $P \leq 0,05$, utilizzando il programma statistico XL-STAT 2008 (Addinsoft, Francia).

RISULTATI DELLA RICERCA

Indagine nei popolamenti di leccio

Sintomatologia

Dai sopralluoghi effettuati nelle aree boschive dell'Isola di Caprera è emerso che una vasta superficie di rilevante valenza naturalistica, popolata da alberi di leccio e da specie della macchia mediterranea, è interessata da fenomeni di deperimento che hanno assunto carattere epidemico e stanno progressivamente compromettendo la sopravvivenza del soprassuolo arboreo.

In particolare, le piante di leccio, sia giovani che adulte, mostravano sintomi di un graduale declino vegetativo con disseccamenti più o meno ampi della chioma e un anormale sviluppo di rami epicormici nel fusto e nelle branche (Fig. 1a). Altresì è stata riscontrata la presenza, più frequentemente nel periodo estivo, di piante con sintomi di morte improvvisa (Fig. 1b). Su queste ultime le foglie rimanevano attaccate ai rami per lungo tempo anche dopo il loro disseccamento. Numerose piante ormai disseccate mostravano la presenza di numerosi polloni (Fig. 1c) che, molto spesso, a loro volta disseccavano rapidamente, suggerendo la presenza di infezioni parassitarie anche a livello dell'apparato radicale.

Le piante deperenti mostravano a livello del colletto e/o lungo il fusto e le branche, aree necrotiche depresse più o meno ampie e cancri spesso umidi per l'emissione di essudati brunastri (Fig. 1d). In seguito alla rimozione tramite uno scalpello dei tessuti corticali in corrispondenza dei cancri, erano visibili necrosi del legno di dimensioni maggiori rispetto a quelle dei cancri sovrastanti (Fig. 1e). Osservate in sezione trasversale, tali necrosi si estendevano sino al midollo con una caratteristica forma a "V" (Fig. 1f).

A livello del colletto e delle grosse radici alcune piante presentavano essudati nerastrici e ampie necrosi dei tessuti legnosi del tutto simili a quelle osservate nel fusto e nelle branche (Fig. 1g, h). Tutte le piante su cui sono stati eseguiti tagli mostravano il disseccamento dei germogli a testimonianza della totale distruzione dell'apparato radicale e della relativa capacità pollonifera (Fig. 1i).

Oltre agli alberi di leccio, erano interessate da disseccamenti e morie anche le poche piante di quercia da sughero riscontrate nelle aree di saggio.

Considerata l'elevata frequenza di piante con foglie e frutti appena disseccati, cancri su fusto e branche in differente stadio di sviluppo ed essudati freschi, è verosimile che la fase epidemica della malattia non sia ancora terminata e, che, il suo andamento sia decisamente rapido e devastante.

Incidenza della malattia

I risultati dei rilevamenti effettuati nelle 28 aree di saggio, sottolineano la gravità della situazione fitosanitaria dei querceti dell'Isola di Caprera, sia per l'elevato numero di piante di leccio con sintomi di deperimento presenti in tutte le aree di saggio, sia per l'intensità dei sintomi che le stesse manifestano. In totale sono state monitorate 451 piante di leccio: 26 (5,7%) erano asintomatiche, 340 (75,3%) mostravano disseccamenti su rami e branche, essudati, rami epicormici e cancri a livello del colletto, del fusto e/o branche, e ben 85 (18,8%) erano disseccate con sintomi di morte repentina (Tab. 1).

Sotto il profilo sanitario appare allarmante la situazione riscontrata nei siti 4, 5, 7, 12, 13 e 17 dove oltre il 40% delle piante sono ormai disseccate. Un forte incremento di mortalità di piante è stato rilevato nel corso degli ultimi mesi in particolare nel sito 13. I valori sull'incidenza delle piante morte hanno variato dal 13% ad oltre il 50%. Tale evoluzione repentina suggerisce che in questi siti sussiste un elevato potenziale infettivo dei patogeni.



Figura 1. Principali quadri sintomatologici riscontrati su piante di leccio nell'Isola di Caprera:

- a) disseccamento di branche e progressiva rarefazione e trasparenza della chioma;
- b) morte repentina di piante mature;
- c) disseccamento progressivo di grosse branche ed emissione di rami epicormici;
- d) disseccamento di rami epicormici in corrispondenza di un cancro sul fusto;
- e) lesioni necrotiche sottocorticali in corrispondenza di un cancro;
- f) sezione trasversali con in evidenza la forma a "V" delle necrosi nel legno;
- g) necrosi del legno a livello del colletto;
- h) necrosi sottocorticali nelle grosse radici;
- i) giovani polloni disseccati.

Tabella 1. Numero di piante di leccio monitorate nelle 28 aree di saggio (ADS) allestite nell'area boschiva dell'Isola di Caprera e relativo stato fitosanitario.

ADS	Numero di piante	Piante asintomatiche	Piante sintomatiche	Piante disseccate
0	2	0	2	0
1	26	0	26	0
2	20	1	18	1
3	16	0	15	1
4	19	0	10	9
5	19	0	11	8
6	11	0	10	1
7	22	0	13	9
8	25	0	23	2
9	17	2	14	1
10	14	1	13	0
11	27	7	20	0
12	10	0	0	2
13	23	0	11	12
14	32	0	30	2
15	6	0	4	2
16	10	0	8	2
17	17	0	8	9
18	21	1	19	1
19	13	5	7	1
20	21	1	18	2
21	9	4	5	0
22	10	0	5	5
23	13	3	10	0
24	10	0	10	0
25	17	0	16	1
26	10	1	6	3
27	11	0	8	3
Totale	451	26	340	85

Isolamento e identificazione dei patogeni della chioma

Dagli isolamenti effettuati dai tessuti legnosi e corticali dei cancri prelevati dalle piante di leccio sono stati ottenuti complessivamente 100 isolati fungini appartenenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae*. Essi sulla base dei caratteri morfologici sono stati suddivisi in 4 gruppi appartenenti rispettivamente alle specie: *Diplodia corticola*, *D. seriata*, *Fusicoccum aesculi* e *Neofusicoccum parvum*.

Da 92 dei 132 cancri esaminati sono state isolate colonie che su PDA sviluppavano un micelio aereo e cotonoso a rapida crescita di colore variabile dal bianco al grigio-scuro. Dopo circa 20 giorni d'incubazione, tutti gli isolati di *Diplodia* hanno differenziato sulla superficie di rami di leccio sterili, posizionati in piastre Petri contenenti PDA, numerosi picnidi per lo più stromatici. Solo occasionalmente sono stati osservati picnidi singoli, uniloculari a forma di fiasco contenenti numerosi conidi unicellulari, cilindrici e ialini. A maturità alcuni conidi divenivano scuri e differenziavano da 1 a 3 setti. I conidi misuravano $27,1-(29,7)-32,8 \times 11,9-(13,4)-15,9 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di $2,22 \pm 0,11$ (media $\pm$ deviazione standard; $n = 50$). Sulla base dei caratteri morfologici, questi ceppi sono stati identificati come *Diplodia corticola*. L'identificazione è stata confermata dall'analisi delle sequenze della regione ITS di 4 isolati rappresentativi. L'amplificazione della regione del rDNA (comprendente le regioni: ITS-1, 5.8S, ITS-2), ha prodotto un frammento di circa

530 bp. La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze degli isolati di *D. corticola* depositate in GenBank tra cui quelle dell'ex-coltura tipo (CBS112549). *D. corticola* è stata la specie fungina isolata con maggiore frequenza. I campioni vegetali positivi provenivano da tutte e 28 le aree di saggio, evidenziando la natura epidemica delle infezioni di questo patogeno nelle aree boschive dell'Isola.

Da 6 dei 132 cancri esaminati sono state isolate colonie che su PDA mostravano un micelio compatto, inizialmente bianco e successivamente virante al grigio scuro. Le colonie di questa specie differenziavano numerosi picnidi contenenti conidi ialini, asettati (solo a maturità differenziavano un setto), misuranti $13,8\text{--}(16,6)\text{--}20,4 \times 3,5\text{--}(5,5)\text{--}7,3 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di $3,03 \pm 0,41$ (media $\pm$ deviazione standard; $n = 50$). La dimensione dei conidi e il loro rapporto tra lunghezza e larghezza è in accordo con i valori riportati da Slippers *et al.* (2004) per *Neofusicoccum parvum*. L'identificazione è stata confermata dall'analisi delle sequenze ITS di un isolato rappresentativo. La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze degli isolati di *N. parvum* depositate in GenBank. I campioni vegetali positivi al patogeno provenivano dalle aree di saggio 3, 9, 14, 21, 25 e 27.

Da 1 dei 132 cancri esaminati è stata isolata una colonia che su PDA sviluppava un micelio aereo compatto, inizialmente bianco e dopo 4-5 giorni virante in modo uniforme al grigio scuro. Questa specie differenziava numerosi picnidi contenenti conidi pigmentati con parete finemente ornamentata, asettati (solo a maturità differenziavano un setto), con la base troncata misuranti $20,1\text{--}(23,2)\text{--}26,3 \times 10,1\text{--}(11,7)\text{--}13,8 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di $1,98 \pm 0,16$ (media $\pm$ deviazione standard; $n = 50$). La dimensione dei conidi e il loro rapporto tra lunghezza e larghezza è in accordo con i valori riportati in letteratura per *Diplodia seriata*. L'identificazione è stata confermata dall'analisi delle sequenze ITS dell'rDNA. La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze degli isolati di *D. seriata* depositate in GenBank. Il campione vegetale positivo al patogeno proveniva dall'area di saggio 5.

Da 1 dei 132 cancri esaminati è stata isolata una colonia che su PDA sviluppava un micelio aereo compatto e cotonoso, inizialmente bianco e successivamente virante al grigio scuro. Dopo due settimane su OA le colonie differenziavano numerosi picnidi solitari contenenti conidi ialini, asettati e fusiformi che misuravano $17,7\text{--}(22,3)\text{--}26,1 \times 4,1\text{--}(4,8)\text{--}5,9 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di $4,68 \pm 0,46$ (media $\pm$ deviazione standard; $n = 50$). La dimensione dei conidi e il loro rapporto tra lunghezza e larghezza è in accordo con i valori riportati in letteratura per *Fusicoccum aesculi*.

L'identificazione è stata confermata dall'analisi delle sequenze ITS. La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze degli isolati di *F. aesculi* depositate in GenBank. Il campione vegetale positivo al patogeno proveniva dall'area di saggio 2.

Isolamento e identificazione dei patogeni radicali

Dagli isolamenti effettuati dai campioni di suolo e radici prelevati da 54 piante di leccio sono stati ottenuti complessivamente 60 colonie di Oomiceti appartenenti al genere *Phytophthora*. Esse sulla base dei caratteri morfologici sono stati suddivise in 3 gruppi corrispondenti alle specie: *P. cinnamomi*, *P. cryptogea* e *P. gonapodyides*.

P. cinnamomi è stata isolata dai campioni di suolo e radici prelevati da 28 piante di leccio situate nelle aree di saggio: 0, 1, 2, 5, 7, 12, 13, 18, 21, 22, 23, 24, 25 e 26. Gli isolati formavano colonie con abbondante micelio aereo di colore bianco-niveo su CA e differenziavano sporangi non papillati, di forma ovale, misuranti $40,3 \pm 6,7 \times 25,4 \pm 2,3 \mu\text{m}$ (media $\pm$ deviazione standard) e rapporto lunghezza/larghezza di 1,7:1. Tutti gli isolati non producevano clamidospore e sono risultati eterotallici, di tipo sessuale A2; dopo

l'appaiamento in coltura duale con i ceppi tester PH014 e PH015 formano oogoni a parete liscia e anteridi anfigini. In relazione alle esigenze termiche, le migliori condizioni di sviluppo si osservano tra 25 e 30°C, con *optimum* intorno a 30°C. La temperatura minima di crescita è di 6°C, mentre la massima di 33°C.

L'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi della sequenza delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA. L'analisi BLAST mostrava il 100% di similarità con le sequenze di *P. cinnamomi* depositate in GenBank (numero di accesso: FM956654).

P. cryptogea è stata isolata dai campioni di suolo e radici prelevati da 10 piante di leccio situate nelle aree di saggio: 1, 5, 6, 7 e 18. Gli isolati mostravano una caratteristica colonia petaloide su CA e differenziavano sporangi non papillati, di forma ovale, misuranti $49,2 \pm 3,4 \times 30,9 \pm 2,4 \mu\text{m}$ (media $\pm$ deviazione standard) e rapporto lunghezza/larghezza di 1,6:1. Tutti gli isolati non producevano clamidospore e sono risultati eterotallici, di tipo sessuale A2; dopo l'appaiamento in coltura duale con i ceppi tester PH014 e PH015 formano oogoni a parete liscia e anteridi anfigini. In relazione alle esigenze termiche, le migliori condizioni di sviluppo si osservano tra 20 e 25°C, con *optimum* intorno a 25°C. La temperatura minima di crescita è inferiore a 5°C, mentre la massima è di 35°C. L'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi della sequenza delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA. L'analisi BLAST mostrava il 100% di similarità con le sequenze di *P. cryptogea* depositate in GenBank (numero di accesso: GQ463702).

P. gonapodyides è stata isolata dai campioni di suolo e radici prelevati da 22 piante di leccio situate nelle aree di saggio: 1, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 18, 22 e 23. Gli isolati formavano una caratteristica colonia a rosetta ad accrescimento molto lento su CA. Gli sporangi non papillati di forma ovale e/o ellissoidale si producono in coltura liquida, misuranti $47,4 \pm 4,2 \times 30 \pm 2,7 \mu\text{m}$ (media $\pm$ deviazione standard) e rapporto lunghezza/larghezza di 1,6:1. Gli isolati erano incapaci di differenziare oogoni in coltura duale con i ceppi di *mating type* di riferimento, a conferma della ben nota sterilità di questa specie. La temperatura minima di crescita è <5°C e quella massima è compresa tra 30°C e 35°C, con *optimum* di 25°C. L'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi della sequenza delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA. L'analisi BLAST mostrava il 100% di similarità con le sequenze di *P. gonapodyides* depositate in GenBank (numero di accesso: EU194412).

Saggi di patogenicità

Tutti i semenzali di leccio inoculati con *Diplodia corticola*, *D. seriata*, *Fusicoccum aesculi*, *Neofusicoccum parvum*, *Phytophthora cinnamomi*, *P. cryptogea* e *P. gonapodyides* mostravano sintomi 30 giorni dopo l'inoculazione. Tutte e 7 le specie patogene saggiate hanno causato lesioni necrotiche sul fusto in prossimità del punto di infezione. Tuttavia, sono emerse differenze statisticamente significative nell'ampiezza delle lesioni causate dalle differenti specie saggiate (Fig. 2).

L'isolato di *D. corticola* è risultato il più virulento causando la comparsa di una vasta area necrotica su tutta la circonferenza del fusto, la formazione di necrosi fogliari e, nella maggior parte dei casi, il disseccamento della porzione distale del fusto. L'osservazione delle sezioni radiali e longitudinali del fusto, in corrispondenza dell'area necrotica, ha consentito di osservare come il processo degenerativo interessasse per un lungo tratto sia i tessuti corticali che quelli conduttori. Le piante disseccate hanno reagito emettendo nuovi getti sotto il punto d'inoculo. Al margine dell'area necrotica *D. corticola* ha differenziato numerosi picnidi scuri erompenti nel ritidoma.

N. parvum ha causato sintomi molto simili a quelli di *D. corticola*. Tuttavia la lunghezza delle lesioni è risultata statisticamente inferiore. Le lesioni che evolvevano in veri

e propri “cancri” di forma depressa oltre alla corteccia interessavano anche i tessuti xilematici. Non sono stati mai osservati picnidi nei semenzali inoculati con questo patogeno.

F. aesculi e *D. seriata* hanno causato piccole lesioni necrotiche confinate al punto di inoculazione e nessun sintomo a livello fogliare, evidenziando una debole attitudine parassitaria.

Tutte e tre le specie di *Phytophthora*, invece, hanno causato la comparsa di evidenti lesioni necrotiche sia a livello di corteccia che di tessuti legnosi. In particolare, *P. gonapodyides* si è dimostrata la specie maggiormente virulenta nel colonizzare i vasi xilematici.

I semenzali utilizzati come testimoni sono rimasti asintomatici e in prossimità della ferita la pianta ha reagito formando un callo cicatriziale.

Tutte e sette le specie saggiate per verificarne la patogenicità sono state reisolate con successo dai tessuti sintomatici (legno e corteccia) di tutte le piante inoculate, completando così i postulati di Koch. Dalle piante testimone non è stato isolato alcun microrganismo fungino o Oomicete.

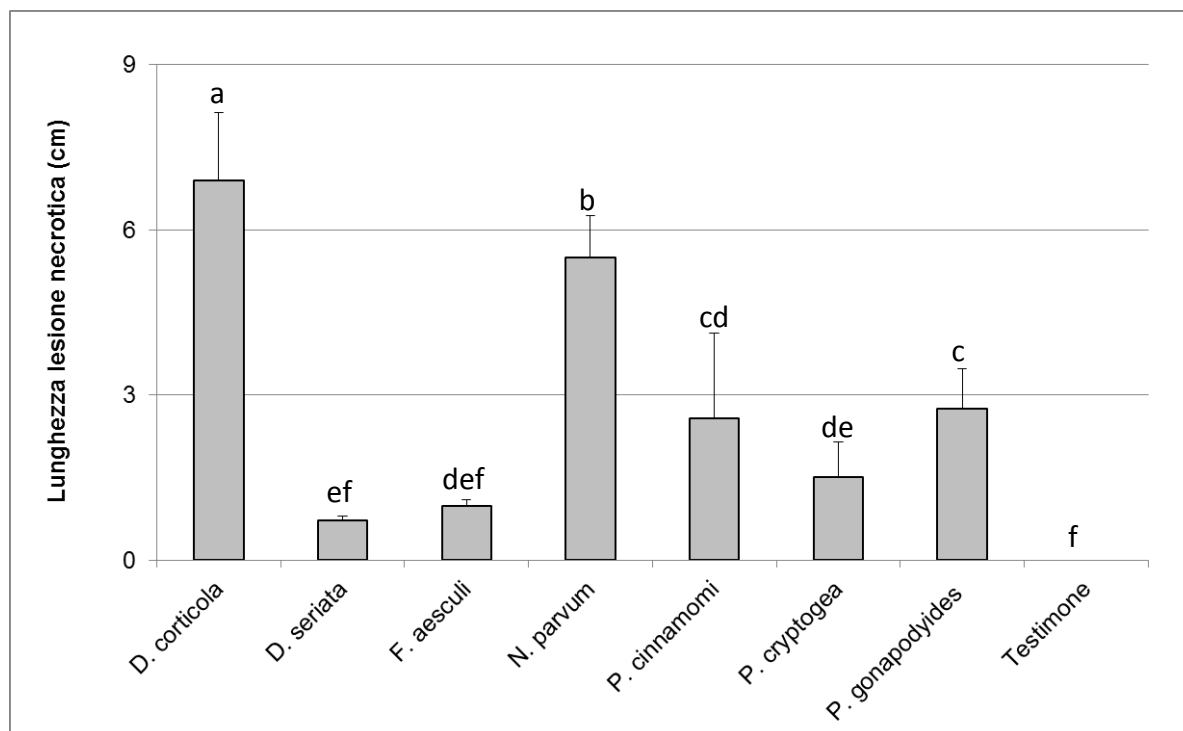


Figura 2. Lunghezza media delle lesioni necrotiche causate da *Diplodia corticola*, *D. seriata*, *Fusicoccum aesculi*, *Neofusicoccum parvum*, *Phytophthora cinnamomi*, *P. cryptogea* e *P. gonapodyides* sul fusto dei semenzali di leccio. Le barre rappresentano la deviazione standard. Istogrammi contrassegnati da lettere differenti differiscono in modo statisticamente significativo al test di confronto multiplo LSD per ($P=0,05$)

Indagine nei popolamenti di erica arborea

Sintomatologia

I sopralluoghi effettuati nelle aree boschive della parte centrale dell'Isola di Caprera hanno consentito di rilevare la presenza, in un'area popolata da specie della macchia mediterranea, di un'insolita alterazione a carico di piante di erica arborea. I sintomi tipici appaiono in tarda primavera con il disseccamento improvviso dei nuovi germogli (Fig. 3a). L'infezione si sviluppa a carico di tutti i tessuti verdi, mentre solo raramente è stata riscontrata sul legno secondario. I germogli infetti tendono a curvarsi verso il basso, a partire dall'apice, assumendo l'aspetto di un uncino (Fig. 3b). Le piante infette reagiscono all'infezione producendo nuovi germogli epicormici alla base di quelli infetti; in tal modo la parte distale delle piante infette tende ad assumere l'aspetto di una scopa (Fig. 3c). Le foglie sui germogli colpiti virano inizialmente al giallo, successivamente al rosso opaco e infine al marrone. Spesso rimangono attaccate alla pianta per lungo tempo dopo la morte dei germogli.



Figura 3. Principali quadri sintomatologici riscontrati su piante di erica arborea attaccate da *Neofusicoccum luteum*:

- a) disseccamento primaverile dei germogli appena sviluppati;
- b) particolare dell'incurvamento ad uncino dei germogli;
- c) germogli completamente disseccati su rami affastellati;
- d) aspetto della colonia di *Neofusicoccum luteum* su PDA dopo 7 giorni a 25 °C (a sinistra vista dall'alto, a destra vista dal basso);
- e) conidi ialini e senza setti nel riquadro.

Incidenza della malattia

I rilievi fitosanitari effettuati hanno consentito di rilevare che la malattia interessa tutte le formazioni ad erica arborea della parte centrale dell'isola. Nello specifico i valori di incidenza della malattia rilevati nelle 6 aree di saggio appositamente allestite variavano dal 45,8% al 100% (Tab. 2).

Tabella 2. Numero di piante di erica arborea monitorate nelle 6 aree di saggio (ADS) e relativo stato fitosanitario.

ADS	Numero di piante	Piante asintomatiche	Piante sintomatiche	Piante disseccate
1	20	1	19	0
2	27	0	27	0
3	21	1	20	0
4	24	13	11	0
5	28	3	25	0
6	10	0	10	0
Totale	130	18	112	0

Isolamento e identificazione dei patogeni

Le indagini diagnostiche condotte su 324 campioni di germogli sintomatici prelevati in diversi periodi dell'anno hanno consentito di accertare che le infezioni riscontrate sono causate dal fungo patogeno *Neofusicoccum luteum* (Fig. 3d). Tutti gli isolati in coltura pura su PDA a 25°C si sviluppavano con un micelio bianco, moderatamente aereo. Nella parte inferiore delle piastre la colonia assumeva una colorazione giallo-tenue grazie al rilascio di pigmenti diffusibili sul mezzo di coltura. Dopo 5-6 giorni di incubazione la pigmentazione del micelio virava al grigio scuro in modo uniforme. Tutti gli isolati hanno differenziato su PDA picnidi contenenti conidi ialini, unicellulari e fusiformi misuranti $18,1 \pm 1,2 \times 6,3 \pm 0,4$ micron (media $\pm$ SD, n = 50) (Fig. 3d). L'identificazione è stata confermata mediante analisi della sequenza ITS di 11 isolati rappresentativi. Le ricerche condotte in GenBank tramite il software BLAST hanno mostrato il 100% di similarità con le sequenze di riferimento di *N. luteum* tra cui quella dell'ex- isolato tipo (CBS110299).

Dal punto di vista epidemiologico è importante notare che il patogeno è in grado di differenziare sui germogli infetti entrambe le strutture riproduttive sessuali e asessuali. Nello specifico, nei mesi autunnali vengono differenziati i picnidi mentre nel tardo inverno e in primavera è stata riscontrata esclusivamente la presenza di ascomi. Pertanto, entrambi i tipi di spore possono contribuire alla diffusione del patogeno e di conseguenza della malattia.

Saggi di patogenicità

Tutte le piante saggiate, due mesi dopo l'inoculazione mostravano un'area necrotica intorno del punto di inoculazione. Tuttavia, la dimensione delle lesioni causate da *N. luteum* era significativamente ($P < 0,05$) influenzata dal tipo di tessuto vegetale saggiato (Fig. 4). Sui germogli le lesioni causate da *N. luteum* erano estese per una lunghezza media di 4,13 cm, mentre nel fusto, pur essendo il patogeno in grado di colonizzare i tessuti legnosi, la lunghezza delle lesioni non era statisticamente differente da quella delle piante testimone. Il patogeno è stato reisolato con successo, da tutte le piante saggiate completando i postulati di Koch.

I risultati delle indagini condotte su questo patosistema sono stati oggetto di un poster presentato nel corso del XVIII Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia vegetale tenutosi a Sassari dal 24-26 settembre 2012 (Allegato 5).

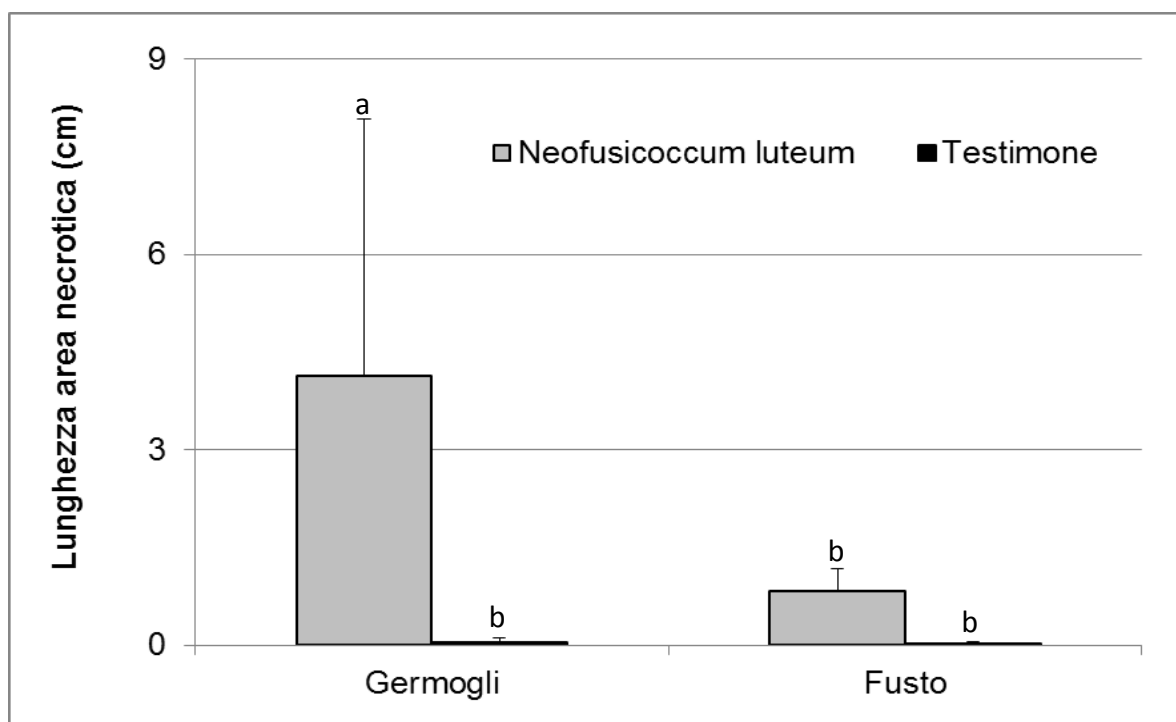


Figura 4. Lunghezza media delle lesioni necrotiche causate da *Neofusicoccum luteum* sul fusto e sui germogli di semenzali di erica arborea. Le barre rappresentano la deviazione standard. Istogrammi contrassegnati da lettere differenti differiscono in modo statisticamente significativo al test di confronto multiplo LSD per ($P=0,05$).

Indagine nei popolamenti di *Acacia cyanophylla*

Sintomatologia

I sopralluoghi effettuati in un'area a macchia mediterranea situata nella parte centro occidentale dell'Isola di Caprera hanno consentito di rilevare la presenza diffusa di fenomeni di deperimento su piante di *Acacia cyanophylla*.

Le piante sintomatiche mostravano un progressivo disseccamento dei rami e delle branche accompagnati da cancri ed estese necrosi sottocorticali che in alcuni casi interessavano i tessuti legnosi (Fig. 5a, b). Osservate in sezione trasversale, le necrosi in corrispondenza dei cancri si estendevano sino al midollo con una caratteristica forma a "V". Nell'area dove è stata riscontrata la malattia vegetano piante con un differente grado di gravità dei sintomi (Fig. 5c). Questo suggerisce che la malattia si trovi attualmente in una fase di evoluzione.

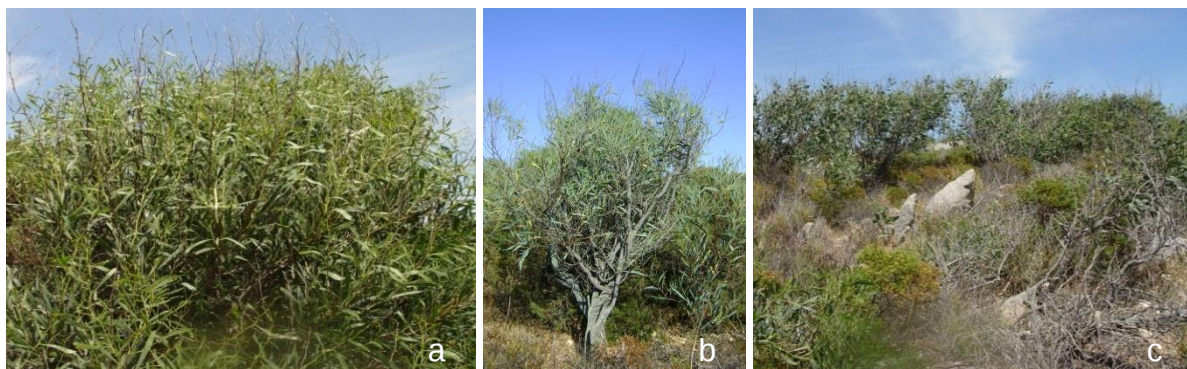


Figura 5. Principali quadri sintomatologici riscontrati su piante di *Acacia cyanophylla*: sintomi di disseccamento su rami terminali (a); particolare di pianta deperiente (b); piante disseccate e deperienti (c).

Eziologia

Al fine di chiarire gli aspetti eziologici del deperimento relativo alle piante di *Acacia cyanophylla* sono state condotte indagini diagnostiche su campioni sia di rami che di radici e suolo. Gli isolamenti effettuati da campioni di rami e branche che presentavano necrosi e cancri hanno consentito di accertare la presenza del patogeno polifago *Neofusicoccum australe*. Da un campione è stata isolata anche la specie *Neofusicoccum luteum*, evidenziando l'esistenza di probabili infezioni congiunte.

Da segnalare, infine, che dai campioni di radici e suolo relativi a 5 piante è stata isolata *Phytophthora nicotianae* e da quelli di una sola pianta *Phytophthora bilorbang*. L'identificazione di entrambe queste specie è stata confermata mediante analisi della sequenza ITS di 2 isolati rappresentativi delle stesse. Le ricerche condotte in GenBank tramite il software BLAST hanno mostrato il 100% di similarità con le sequenze di riferimento di entrambi i patogeni.

Indagine nei popolamenti di ginepro fenicio

Sintomatologia

I sopralluoghi effettuati in tre differenti formazioni a ginepro fenicio situate nella parte centrale e meridionale dell'Isola di Caprera hanno consentito di accertare la presenza diffusa di piante con sintomi di deperimento e moria. Nello specifico, nei siti 1 e 2 le piante mostravano un progressivo disseccamento dei germogli, dei rami e delle branche a partire dalla branca principale (Fig. 6a). Le foglie sui rami sintomatici viravano inizialmente al giallo e, successivamente, al rosso opaco ed infine al marrone-cenerino. Esse spesso rimanevano attaccate a lungo ai rami anche dopo il loro disseccamento (Fig. 6b). Erano interessate da questo quadro sintomatologico piante di diversa età, sia adulte che giovani. Le piante sintomatiche mostravano alla base dei rami e delle branche disseccate piccoli cancri, spesso resinosi, caratterizzati dallo scollamento dei tessuti corticali da quelli legnosi. A livello sottocorticale erano spesso presenti aree necrotiche di forma allungata che interessavano i tessuti legnosi. Queste ultime apparivano più evidenti dopo la rimozione della corteccia esterna con uno scalpello.

Spesso, le lesioni necrotiche e i cancri interessavano anche la base del fusto principale causando ampi disseccamenti (Fig. 6c). Lo sviluppo dei cancri e delle necrosi nei rami e nel fusto procedeva dall'alto verso il basso. Ciò, molto probabilmente, in seguito alla percolazione lungo i rami e il fusto dell'acqua piovana che veicola i propaguli infettivi prodotti dai patogeni coinvolti. Peraltro, nei tessuti morti erano ben visibili numerosi picnidi fungini scuri ed erompenti dalla corteccia. In alcuni casi le piante monitorate hanno mostrato un'evoluzione repentina dei sintomi con porzioni disseccate della chioma sempre più ampie; e quelle colpite più gravemente morivano nel corso della stagione vegetativa (Fig. 6d). Questo aspetto suggerisce che la malattia è ancora in una fase espansiva.

Le piante nel sito 3 oltre ai sintomi appena descritti mostravano nella maggior parte dei casi un quadro sintomatologico molto più complesso. In particolare, oltre a una maggiore incidenza di mortalità di piante di ginepro, è stata osservata la presenza di piante deperenti che manifestavano progressivi stadi di rarefazione della chioma, getti epicormici, disseccamenti e sintomi di morte repentina (Fig. 6e, d). Da un esame più accurato delle piante, è emerso che ai sintomi nella parte aerea erano spesso associati sintomi di marciume nella parte basale e nelle radici (Fig. 6g). In seguito alla rimozione dei tessuti corticali a livello sia del colletto che delle grosse radici, si osservavano vaste aree necrotiche di colore marrone scuro tendente al nero, a contorno definito e dalla caratteristica forma a fiamma che si sviluppavano verso l'alto fino a circa 20-30 cm sul fusto. Un altro sintomo molto comune era la completa assenza di apparato radicale e in particolare delle radici laterali e più sottili. Nel sito 3 la moria di piante interessa ormai circa l'80% delle piante (Fig. 6h).

Isolamento e identificazione dei patogeni della chioma

Gli isolati fungini ottenuti in coltura pura a partire dai tessuti sintomatici delle piante di ginepro fenicio sono stati identificati in base alle caratteristiche morfologiche (forma, dimensione e pigmentazione dei conidi e struttura e pigmentazione del micelio). Essi appartenevano a tre differenti specie di *Botryosphaeriaceae*: *Diplodia africana*, *Neofusicoccum australe* e *N. luteum*. L'identificazione a livello specifico è stata confermata dall'analisi delle sequenze nucleotidiche della regione ITS e EF1- α .

Per quanto riguarda *D. africana* l'amplificazione della regione del rDNA (comprendente le regioni: ITS-1, 5.8S, ITS-2), ha prodotto un frammento di circa 550 bp, mentre quella della regione EF1- α un frammento di circa 300 bp. Le ricerche in GenBank tramite il software BLAST hanno mostrato per entrambe le regioni geniche una similarità del 100% con le sequenze di riferimento di *D. africana* (ex-isolato tipo CBS 120835).



Figura 6:

Principali quadri sintomatologici su piante di ginepro fenicio attaccate da *Botryosphaeriaceae*:

- a) ingiallimento delle foglie all'apice di branche;
- b) foglie persistenti su rami disseccati;
- c) pianta parzialmente disseccata;
- d) singola pianta disseccata.

Principali quadri sintomatologici riscontrati su piante di ginepro fenicio attaccate da *Phytophthora* spp.:

- e) rarefazione della chioma e comparsa di rami epicormici su fusto e branche;
- f) sintomi di morte repentina;
- g) particolare delle necrosi sotto corticali a livello del colletto e delle grosse radici;
- h) estese morie di piante mature.

L'identificazione degli isolati di *N. australe* è stata confermata dall'analisi delle sequenze della regione ITS dell'rDNA. La *Blast analysis* ha evidenziato per la maggior parte degli isolati indagati una similarità del 100% con le sequenze di *N. australe* tra cui quella della ex-coltura tipo di *N. australe* (AY339262). Tuttavia, le sequenze di un numero minore di isolati ottenuti in questo studio differivano di 1 bp (nella regione ITS2) dalle sequenze dell'ex-isolato tipo di *N. australe*, mentre erano identiche a quelle di altri isolati di questa specie ottenute da olive (EF638770-EF638778) e vite (HQ011406) in Italia. A tal riguardo, uno studio recentemente pubblicato da ricercatori australiani (Sakalidis *et al.*, 2011), basato sull'analisi delle sequenze della regione ITS di numerosi isolati di *N. australe* ha evidenziato l'esistenza di 13 aplotipi per questa specie. I dati ottenuti in questa ricerca concordano con le osservazioni dei ricercatori australiani e collocano gli isolati di *N. australe* da ginepro sia nell'aplotipo H1 sia in quello H4.

L'identificazione degli isoalti di *N. luteum* è stata confermata dall'analisi delle sequenze della regione ITS dell'rDNA. La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze di vari isolati di *N. luteum* tra cui la sequenza della ex-coltura tipo (AY259091).

Le tre specie fungine sono state isolate con una frequenza diversa nelle tre aree di indagine. *D. africana* è risultata la specie isolata più di frequente. Ben 28 delle 51 piante esaminate erano infettate da questo patogeno. Tuttavia, la sua distribuzione è risultata discontinua nei tre siti d'indagine (Tab. 3). *N. australe* è stato isolato anch'esso da piante presenti in tutte e tre le aree di indagine. In particolare, nell'area 3 è stato isolato con frequenze superiori a quelle di *D. africana*. Infine, *N. luteum* è stato isolato solo da 5 piante situate nell'area 3.

I tre patogeni sono stati isolati da rami e branche che mostravano gli stessi sintomi. Due piante nell'area 1 e una pianta nell'area 2 presentavano infezioni congiunte di *D. africana* e *N. australe*. Nell'area 3, tre piante erano infettate da *N. australe* e *N. luteum*.

Le indagini condotte in laboratorio sui tessuti sintomatici hanno consentito di rilevare la presenza di numerosi picnidi di *D. africana* nei rami e nelle branche di ginepro fenicio. I picnidi di *N. australe* sono stati riscontrati solo su due campioni in prossimità di cancri, mentre non è stata mai riscontrata la presenza dei picnidi di *N. luteum* sui campioni esaminati.

Tabella 3. Numero di piante di ginepro fenicio monitorate nelle 3 aree di saggio (ADS) e relativi patogeni associati.

ADS	Numero di piante esaminate	Numero di piante positive		
		<i>Diplodia africana</i>	<i>Neofusicoccum australe</i>	<i>Neofusicoccum luteum</i>
1	17	17	2	-
2	17	7	7	-
3	17	4	13	5
Totale	51	28	22	5

Isolamento e identificazione dei patogeni radicali

Dagli isolamenti effettuati dai campioni di suolo e radici prelevati da piante di ginepro sintomatiche situate nel sito di indagine 3 sono stati ottenuti diversi isolati di specie appartenenti al genere *Phytophthora*. Sulla base dei caratteri morfologici e di crescita radiale le colonie sono state suddivise in 5 gruppi appartenenti alle specie: *P. asparagi*, *P. bilorbang*, *P. megasperma*, *P. melonis* e *P. syringae*.

P. asparagi è stata la specie isolata con maggiore frequenza; essa è stata ottenuta dai campioni di suolo e radici prelevati da 11 delle 12 piante di ginepro campionate. Gli isolati di *P. asparagi* formavano colonie stellate e leggermente raggiate su CA, con micelio aereo cotonoso e margine irregolare su PDA. Gli sporangi si sono differenziati soprattutto nei substrati liquidi; essi erano non papillati, di forma ovale, misuranti $44 \pm 3,2 \times 27,5 \pm 2,2 \mu\text{m}$ (media $\pm$ deviazione standard), con un rapporto lunghezza/larghezza di 1,6:1. Tutti gli isolati non producevano clamidospore. Gli isolati omoitallici hanno prodotto oogoni sub-sferici con parete liscia e diametro variabile da 25 a 45 μm , con oospore plerotiche e/o leggermente aplerotiche e anteridi principalmente paragini. La temperatura ottimale per la crescita era compresa tra 20 e 25°C, con minimo e massimo rispettivamente di 5 e 35°C. L'identificazione della specie è stata confermata dall'analisi della sequenza delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA. L'analisi BLAST mostrava il 99% di similarità con le sequenze di *P. asparagi* depositate in GenBank (numero di accesso: EF185089).

P. bilorbang è stata isolata da campioni di suolo e radici prelevati da 6 delle 12 piante di ginepro campionate. Tutti gli isolati mostravano un accrescimento molto lento e formavano colonie stellate, a rosetta e striate con micelio cotonoso al centro e margine regolare. Gli sporangi erano non papillati, di forma ovale, obpiriformi, misuranti $49,8 \pm 3,5 \times 28,5 \pm 2,6 \mu\text{m}$ (media $\pm$ deviazione standard), con un rapporto lunghezza/larghezza di 1,8:1. Tutti gli isolati erano omotallici e producevano oogoni sub-sferici con parete liscia e diametro variabile da 28 a 36 μm , con oospore plerotiche e/o leggermente aploerotiche e anteridi principalmente paragini. La temperatura ottimale per la crescita era intorno a 25°C, con minimo e massimo rispettivamente di 5 e 30°C. L'identificazione della specie è stata confermata dall'analisi della sequenza delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA. L'analisi BLAST mostrava il 99% di similarità con le sequenze di *P. bilorbang* depositate in GenBank (numero di accesso: JQ256377).

P. megasperma è stata isolata da campioni di suolo e radici prelevati da 4 delle 12 piante di ginepro campionate. Tutti gli isolati formavano colonie stellate e con micelio aereo cotonoso e margine regolare. Gli sporangi venivano prodotti sia su CA che su substrati liquidi; essi erano non-papillati, da limoniformi a ovoidali. Le loro dimensioni erano di $48,3 \pm 7,6 \times 32,9 \pm 5,4 \mu\text{m}$ (media $\pm$ deviazione standard), con rapporto lunghezza / larghezza di 1,7:1. Tutti gli isolati in coltura singola producevano oogoni sub-sferici con parete liscia e diametro variabile da 29 a 47 μm , con oospore plerotiche e anteridi paragini e anfigini. La temperatura ottimale per la crescita era compresa tra 20 e 25°C, con minimo e massimo rispettivamente di 5 e 30°C. L'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi delle sequenze delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA. Esse mostravano il 99% di similarità con le sequenze di isolati di *P. megasperma* presenti in GenBank (numero di accesso: EU194385).

P. melonis è stata isolata dai campioni di suolo e radici prelevati da 2 delle 12 piante di ginepro investigate. Gli isolati formavano colonie con abbondante micelio aereo di colore bianco-niveo su CA e differenziavano sporangi non papillati, di forma ovale, misuranti $45 \pm 3,5 \times 28,5 \pm 2,6 \mu\text{m}$ (media $\pm$ deviazione standard), con un rapporto lunghezza/larghezza di 1,7:1. Tutti gli isolati non producevano clamidospore e sono risultati eterotallici, di tipo sessuale A2; dopo l'appaiamento in coltura duale con i ceppi tester PH014 e PH015 formano oogoni a parete liscia e anteridi anfigini. Tuttavia gli isolati producevano gametangi anche in coltura singola comportandosi come specie omotalliche, risultando perciò self-fertili. La temperatura ottimale per la crescita era intorno a 30°C, con minimo e massimo rispettivamente di 10 e 40°C. Anche in questo caso l'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi della sequenza delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA. L'analisi BLAST mostrava il 100% di similarità con le sequenze di *P. melonis* depositate in GenBank (numero di accesso: JN120129).

P. syringae è stata rinvenuta dai campioni di suolo e radice di 4 delle 12 piante di ginepro indagate. Tutti gli isolati formavano colonie stellate e leggermente raggiate su CA, con micelio aereo cotonoso e margine irregolare su PDA. Sia su substrati liquidi che su CA, formavano caratteristiche *hyphal swelling* unite in catenelle semplici o ramificate. Gli sporangi si sono differenziati soprattutto nei substrati liquidi; essi erano semi-papillati, raramente bipapillati, da limoniformi a ovoidali. Le loro dimensioni erano di $41,3 \pm 6,2 \times 28,9 \pm 3,8 \mu\text{m}$ (media $\pm$ deviazione standard) con rapporto lunghezza / larghezza di 1,5:1. Tutti gli isolati in coltura singola producevano oogoni sub-sferici con parete liscia e diametro variabile da 23 a 31 μm , con oospore plerotiche e anteridi paragini. La temperatura ottimale per la crescita era compresa tra 15 e 20°C, con minimo e massimo rispettivamente di <5 e 26°C. L'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi delle sequenze delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA. Esse mostravano il 99-100% di similarità con le sequenze di isolati di *P. syringae* presenti in GenBank (numero di accesso: EU000101).

Saggi di patogenicità

Due mesi dopo l'inoculazione, tutte le piantine infettate con *Diplodia africana*, *Neofusicoccum australe* e *N. luteum* mostravano in prossimità del punto di inoculo evidenti cancri e lesioni necrotiche nei tessuti corticali e legnosi. Le lesioni necrotiche in alcuni casi tendevano a circondare l'intero fusto causando dapprima una perdita di turgore nelle foglie situate nella parte distale del punto di infezione e, successivamente, il completo disseccamento della pianta. Le cinque piantine testimoni, inoculate solo con un frammento di PDA sterile, sono rimaste asintomatiche.

Tra le tre specie saggiate sono emerse differenze statisticamente significative in relazione alla lunghezza delle lesioni necrotiche causate sui semenzali di ginepro fenicio. In particolare, l'isolato di *N. australe* ha causato le necrosi più estese. Non sono emerse, invece, differenze significative tra l'isolato di *D. africana* e quello di *N. luteum* (Fig. 7). Solo *D. africana* ha differenziato picnidi subcorticali in prossimità del punto di infezione.

Tutti e tre i patogeni inoculati sono stati reisolati con successo dai tessuti sintomatici (legno e corteccia) di tutte le piante saggiate, completando così i postulati di Koch.

Vista la virulenza mostrata da *N. australe* nei saggi di patogenicità sono state effettuate ulteriori indagini finalizzate allo studio dei fattori di virulenza coinvolti nel processo di patogenesi. I risultati di tali ricerche hanno consentito di accertare la produzione da parte di questo patogeno di 3 metaboliti secondari bioattivi: Tyrosol, botryosphaerone D e un nuovo naphthalenone il (3S,4S)-3,4,8-trihydroxy-6-methoxy-3,4-dihydro-1(2H)-naphthalenone. Maggiori dettagli chimici e biochimici sui metaboliti secondari prodotti da *N. australe* sono riportati nella pubblicazione scientifica allegata alla relazione (Allegato 6).

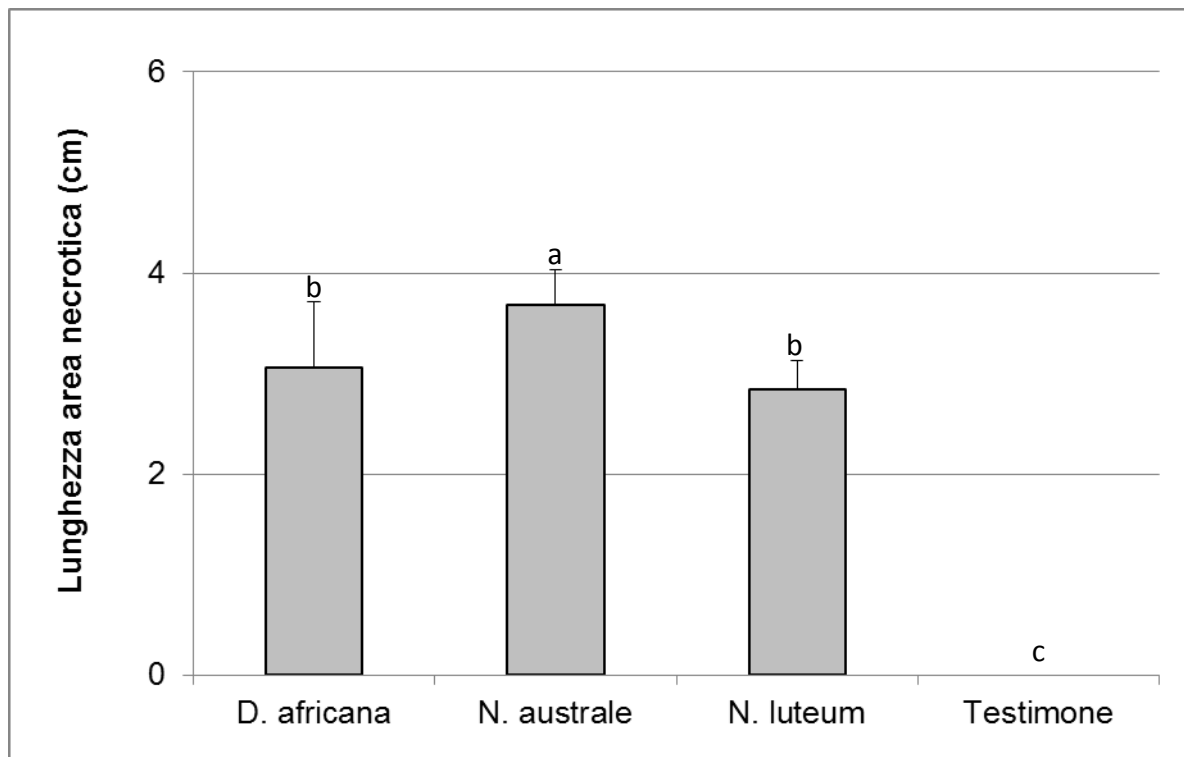


Figura 7. Lunghezza media delle lesioni necrotiche causate da *Diplodia africana*, *Neofusicoccum australe* e *Neofusicoccum luteum* sul fusto dei semenzali di ginepro fenicio. Le barre rappresentano la deviazione standard. Istogrammi contrassegnati da lettere differenti differiscono in modo statisticamente significativo al test di confronto multiplo LSD per ($P=0,05$).

CONCLUSIONI

Analisi dei risultati

Gli obiettivi prefissati in questa ricerca sono stati pienamente soddisfatti. In particolare, le indagini effettuate hanno permesso di delineare i quadri sintomatologici associati ai fenomeni di deperimento nei popolamenti di leccio, erica arborea, *Acacia cyanophylla* e ginepro fenicio dell'Isola di Caprera e di identificare e caratterizzare i patogeni coinvolti. L'attività di monitoraggio ha messo in luce l'esistenza di gravi criticità legate ad attacchi di patogeni afferenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae* e al genere *Phytophthora*: le loro infezioni attualmente in atto rischiano di compromettere irreversibilmente la biodiversità dell'Isola.

Peraltro, i risultati ottenuti hanno consentito di acquisire nuove conoscenze sui complessi fenomeni di deperimento che colpiscono i popolamenti forestali in ambiente mediterraneo. Infatti, per quanto riguarda in particolare il deperimento delle querce, in letteratura sono noti vari quadri sintomatologici, riconducibili essenzialmente a due sindromi: una **cronica** caratterizzata da ingiallimento e rarefazione della chioma, proliferazione di rami epicormici, disseccamento progressivo di branche a partire da quelle distali, e una **acuta** caratterizzata dalla morte improvvisa delle piante anche adulte e da un mancato ricaccio dei polloni. Ai fenomeni di deperimento cronico in genere sono associati patogeni del fusto e delle branche ad *habitus* endofitico quali *Biscogniauxia mediterranea*, *Diplodia corticola*, *Discula quercina* e *Phoma cava*. Mentre nelle forme di deperimento acuto in genere sono coinvolti patogeni ad *habitus* terricolo in grado di distruggere l'apparato radicale delle piante quali *Phytophthora cinnamomi* e *P. quercina*. I quadri sintomatologici riscontrati nei boschi di leccio dell'Isola di Caprera includono entrambe queste due forme di deperimento, ma con peculiarità finora mai riscontrate. Peculiarità dovute al fatto che gli attacchi di *Diplodia corticola* hanno assunto in breve tempo una dimensione epidemica mai riscontrata in precedenza nelle formazioni quercine sarde. Essi si sono manifestati con un'intensità tale da compromettere la sopravvivenza della maggior parte delle piante di leccio che vegetano nell'Isola. Ciò anche perché, molto spesso, alle sue infezioni sono associate quelle di *Phytophthora cinnamomi* a livello dell'apparato radicale.

I fattori che possono aver contribuito alla recrudescenza degli attacchi di *Diplodia corticola* nei boschi di Caprera restano ancora sconosciuti; di certo sono necessari ulteriori studi finalizzati a chiarire il grado di variabilità intraspecifica di questo patogeno e, soprattutto, l'effetto della componente ambientale sulla sua capacità patogenetica e riproduttiva. Questi studi appaiono auspicabili anche in virtù del fatto che negli ultimi anni le segnalazioni di attacchi di *Diplodia corticola* sono progressivamente aumentate e hanno riguardato varie specie quercine in diverse parti del globo, in California, Florida, Grecia e Tunisia, e più recentemente anche piante di interesse agrario quale la vite in California, Texas e Italia.

Sebbene dai campioni sintomatici di leccio siano state isolate anche altre tre specie di *Botryosphaeriaceae*, vista la limitata incidenza con cui ricorrono, appare verosimile che il loro ruolo nell'eziologia dei fenomeni di deperimento sia solo marginale.

Le indagini svolte hanno inoltre consentito di chiarire gli aspetti eziologici dei gravi disseccamenti e morie che stanno interessando il ginepro fenicio in tutta l'Isola di Caprera. Una malattia simile, a quella qui descritta su ginepro fenicio è stata segnalata negli Stati Uniti su *Juniperus* spp. negli anni '80 e l'agente eziologico identificato come *Diplodia mutila*. Sempre negli anni '80 è stata rinvenuta una sindrome molto simile anche su cipresso (*Cupressus sempervirens* L.) in Israele. Successivamente, questa stessa malattia è stata segnalata sempre su cipresso in altri paesi tra cui il Marocco, l'Italia, il Sudafrica, la Grecia e la Tunisia. In tutti questi casi, gli isolamenti effettuati dai campioni di cipresso sintomatici

restituivano sempre uno stesso microrganismo fungino morfologicamente vicino alla specie *Diplodia pinea* e pertanto considerato una sottospecie di questo patogeno polifago e di conseguenza nominato *D. pinea* f. sp. *cupressi*. Più di recente, sulla base di evidenze di tipo sia morfologico che genetico, è stato dimostrato che i patogeni agenti di cancri su ginepro negli USA e su cipresso in Europa e in Africa appartengono a una nuova specie, a cui è stato attribuito il binomio *Diplodia cupressi*. Il patogeno isolato da ginepro fenicio in Sardegna e identificato come *D. africana* differisce da *D. cupressi* per quanto riguarda la dimensione dei conidi, la morfologia delle colonie e il tasso di crescita radiale. Inoltre, i dati delle sequenze ITS ed EF1- α chiaramente separano *D. africana* da *D. cupressi* e da qualsiasi altra specie di *Diplodia*. *D. africana* è un patogeno di recente descrizione e finora era stato segnalato solo in Sud Africa su fruttiferi. Pertanto il suo rinvenimento in Sardegna rappresenta la prima segnalazione di questo patogeno nell'emisfero settentrionale, ma anche la prima segnalazione in assoluto come patogeno del ginepro fenicio.

Allo stato attuale delle indagini è senz'altro prematuro avanzare delle ipotesi sull'origine delle infezioni di *D. africana* su ginepro fenicio nell'Isola di Caprera. Tuttavia, sebbene non si possa escludere a priori una sua introduzione accidentale nell'Isola con materiale vegetale infetto, è lecito ipotizzare, vista anche la sua ampia diffusione nell'Isola, che questo fungo rientri nelle micocenosi di equilibrio delle *Cupressaceae* e che abbia trovato condizioni favorevoli per manifestare tutta la sua virulenza solo di recente, in seguito ai mutamenti climatici intervenuti in questi ultimi anni in ambiente mediterraneo. Mutamenti che, come accennato in premessa, possono aver da un lato favorito lo sviluppo e la diffusione di questo fungo e, dall'altro lato, indotto stati di stress nelle piante che ne limitano la naturale resistenza alle avversità, rendendole più suscettibili agli attacchi dei parassiti.

Il quadro eziologico dei sintomi osservati su ginepro fenicio si complica ulteriormente se si considera che altre due *Botryosphaeriaceae*: *Neofusicocum australe* e in misura minore *N. luteum* sono associate a questa malattia. Entrambe queste specie fungine vengono qui segnalate per la prima volta come patogeni del ginepro fenicio. *N. australe* è un patogeno polifago originariamente descritto nell'emisfero australe su piante native dell'Australia. Di recente è stato segnalato come un patogeno di varie specie vegetali di interesse sia agrario che forestale in diverse nazioni. In un recente studio effettuato da alcuni ricercatori australiani, gli autori hanno dimostrato attraverso l'analisi di tutte le sequenze ITS di *N. australe* depositate in GenBank la presenza per questa specie di più aplotipi di cui due dominanti denominati H1 e H4 e di altri 11 rari. Gli isolati di *N. australe* ottenuti in questo studio appartengono ad entrambi gli aplotipi dominanti. Il rinvenimento di isolati dell'aplotipo H1 risulta essere la prima segnalazione in Italia. Il ritrovamento di questo patogeno su un ospite nativo della Sardegna come il ginepro fenicio apre nuovi ed interessanti argomenti di discussione sull'origine geografica di *N. australe*; infatti, precedentemente, questo patogeno è stato segnalato su specie native quasi esclusivamente nell'ovest dell'Australia mentre la gran parte delle altre segnalazioni hanno riguardato piante coltivate. *N. luteum* è stato isolato solo da 5 piante di ginepro perciò è difficile, allo stato attuale delle conoscenze, capire quali sia il suo reale ruolo nei disseccamenti che interessano il ginepro. Tuttavia, vista l'elevata polifagia di questo microrganismo e considerato il suo diretto coinvolgimento nell'eziologia della nuova malattia riscontrata su erica arborea è quanto mai opportuno approfondire le conoscenze sulla bio-ecologia di questo patogeno.

Il rinvenimento di ben 10 specie di *Phytophthora* in un'area limitata come quella dell'isola di Caprera sottolinea che gli ambienti sottoposti a una forte pressione antropica sono particolarmente favorevoli allo sviluppo e alla diffusione di questi microrganismi patogeni. Ambienti, peraltro, dove tali patogeni possono essere introdotti facilmente anche attraverso le operazioni di imboschimento e/o rimboschimento con l'impiego di materiale vivaistico infetto.

Tale ipotesi nel caso specifico di Caprera è molto plausibile in quanto quest'area è stata interessata nel corso degli ultimi decenni da numerosi interventi di rimboschimento. Appare opportuno sottolineare che proprio i vivai oggi giorno rappresentano degli *hot spots* per la presenza di specie di *Phytophthora*. Ciò è dovuto al fatto che in tali ambienti confluiscono e convivono varie specie vegetali spesso esotiche. Inoltre, visto che le piante sono coltivate in modo intensivo una vicino all'altra, spesso si vengono a creare le condizioni ideali per lo sviluppo e la diffusione di questi patogeni anche su specie vegetali che in natura non sono specie ospiti. Peraltro, le infezioni di molti patogeni in vivaio restano asintomatiche per lunghi periodi di tempo, per cui sussiste un elevato rischio di diffusione inconsapevole da parte degli acquirenti di materiale vegetale infettivo in ambienti naturali. Alla luce di quanto esposto, per la realizzazione di nuovi impianti e/o ricostituzioni boschive nell'isola sarebbe auspicabile utilizzare piantine prodotte in loco, adottando idonee misure di coltivazione quali la raccolta dei semi da piante *Phytophthora-free*, la sistemazione delle piante in vasi fuori suolo, la sterilizzazione del terriccio prima dell'impiego e l'utilizzo di acqua filtrata.

Infine, i risultati conseguiti se da un lato sottolineano la gravità delle emergenze fitosanitarie riscontrate, dall'altro lato suggeriscono l'urgenza di adottare nel breve periodo efficaci interventi di bonifica fitosanitaria volti a circoscrivere e/o eradicare i focolai d'infezione delle specie di *Botryosphaeriaceae* e di *Phytophthora* rinvenute nelle aree boschive dell'Isola di Caprera. Ciò anche al fine di evitare un'ulteriore diffusione delle infezioni sia nella stessa Isola, sia nelle altre Isole dell'Arcipelago di La Maddalena ad altre specie della macchia mediterranea potenzialmente suscettibili a questi patogeni.

Linee guida di bonifica fitosanitaria

Le strategie d'intervento per arrestare la diffusione dei fenomeni di deperimento nelle aree boschive dell'Isola di Caprera dovranno prevedere l'adozione di:

Misure di prevenzione

In sintesi, tali misure si identificano in attività finalizzate al monitoraggio fitosanitario periodico delle aree boschive, alla razionale fruizione del bosco e delle sue risorse e alla puntuale e corretta informazione dell'opinione pubblica sui rischi per la conservazione della biodiversità connessi alla recrudescenza delle fitopatie.

Nello specifico si dovrà procedere attraverso:

1. allestimento di aree permanenti di monitoraggio fitosanitario, volte a valutare la presenza e natura di eventuali patogeni, la dinamica delle loro popolazioni e il loro adattamento a nuove specie ospiti;
2. mappatura delle specie vegetali presenti nell'Isola e loro caratterizzazione in base al grado di suscettibilità ai patogeni riscontrati;
3. mappatura delle aree a rischio di diffusione dei patogeni in base all'orografia, alle proprietà del suolo e presenza di corsi d'acqua;
4. classificazione delle aree boschive dell'Isola di Caprera, in funzione delle informazioni fornite dalle attività di cui ai punti 1, 2 e 3, in: Infette (I), Moderatamente Infette (MI), a Rischio di Infezione (RI) ed Esenti da patogeni (E);
5. creazione di aree ad accesso limitato o interdetto, posizionando lungo il loro perimetro cartelli recanti informazioni dettagliate sui motivi delle restrizioni, sulla biologia dei patogeni e su rischi connessi alla loro diffusione. Attualmente si possono individuare:

- Zone a Protezione Alta (ZPA) in cui la fruizione è controllata e regolamentata. Dovrebbero ricadere in questa misura tutte le aree a ginepro fenicio situate nella parte meridionale dell'Isola;
 - Zone a Protezione Totale (ZPT) in cui l'accesso è consentito, previa autorizzazione, solo per motivi di studio e di ricerca scientifica finalizzata alla conservazione della biodiversità. In questa categoria dovrebbero ricadere i siti 4, 5, 12, 13, 14 e 17 del leccio e tutta l'area del sito 3 del ginepro;
6. realizzazione nei punti di accesso alle ZPT di una zona attrezzata per la pulizia e disinfezione delle scarpe delle persone, sia in entrata sia in uscita;
 7. eliminazione dei cinghiali dall'Isola di Caprera;
 8. riduzione al minimo indispensabile delle operazioni di manutenzione delle strade sterrate e dei sentieri. La realizzazione di nuovi sentieri dovrebbe interessare esclusivamente le aree ben drenate ed esenti da patogeni;
 9. sensibilizzazione dell'opinione pubblica sui problemi fitosanitari delle aree boschive e sui rischi ambientali derivanti dalla diffusione di patogeni invasivi ed esotici.

Misure di risanamento

Le misure volte a migliorare lo stato sanitario delle piante di leccio e ad eradicare i patogeni fungini sono riconducibili essenzialmente a: - trattamenti con composti chimici induttori di resistenza nelle piante; - interventi di taglio e distruzione del materiale vegetale infetto. Invero, le conoscenze scientifiche al riguardo sono ancora molto limitate, per cui dovrebbero essere avviate apposite sperimentazioni volte a valutare l'efficacia di altre possibili misure applicabili in bosco, soprattutto contro le infezioni da *Phytophthora* spp. A questo proposito bisogna considerare che delle 10 specie di *Phytophthora* isolate in questa ricerca, 4 sono oomicotiche. Tali specie sono in grado di produrre un numero copioso di oospore, strutture in grado di sopravvivere nel suolo anche in assenza della specie ospite per circa 30 anni. Le altre 6 specie, eterotiche, sono invece caratterizzate dalla capacità di produrre strutture di resistenza (clamidospore) che, sebbene meno longeve delle oospore, sono anch'esse in grado di sopravvivere nel suolo per diversi anni. Di conseguenza, appare evidente che questi patogeni una volta introdotti e adattati in un nuovo ambiente sono di difficile eradicazione e richiedono interventi reiterati. A tal riguardo ricerche effettuate in Spagna e Portogallo sul controllo della moria di querce causata da attacchi di *P. cinnamomi*, hanno dimostrato che trattamenti con fosfito di potassio negli alberi infetti può fornire buoni risultati. Il fosfito di potassio è un prodotto sistemico in grado di attivare nella pianta meccanismi di difesa (induttore di resistenza) e bloccare i processi di patogenesi causati specialmente da oomiceti, in particolare da specie di *Phytophthora*. Il fosfito di potassio può essere applicato per via endoterapica mediante dispensatori che vengono infissi nel fusto dell'albero durante il periodo autunnale e primaverile. Nel caso specifico di Caprera questo tipo di operazione potrebbe essere riservata a tutti gli alberi maturi di leccio in stadio di deperimento non avanzato, situati nei siti 4, 5, 7, 12, 13 e 14.

Il fosfito di potassio è del tutto innocuo per l'uomo e gli animali, compresi gli insetti utili, per cui potrebbe essere applicato come concime fogliare anche attraverso l'impiego di mezzi aerei. Questo tipo di trattamento è stato effettuato finora solo in popolamenti boschivi dell'Australia e dell'Europa centrale, peraltro con risultati molto positivi. Pertanto, se venisse attuato nelle aree boschive dell'Isola di Caprera – magari estendendolo a tutte le aree infette, indipendentemente dallo stadio di deperimento delle piante – sarebbe il primo caso di sperimentazione di questa tecnica in ambiente mediterraneo.

L'applicazione aerea del fosfito di potassio viene fatta con l'ausilio di un elicottero munito di atomizzatori rotativi in grado di irrorare il prodotto ad una dose di 22,5 litri ad ettaro. Il trattamento prevede l'adozione di uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con quattro replicazioni su parcelle di 25 ha ciascuna e su ulteriori quattro parcelle, di uguale estensione, da utilizzare come testimoni. Il protocollo prevede due trattamenti, uno nel periodo primaverile prima del ricaccio dei nuovi getti vegetativi delle piante (nel caso del leccio, febbraio-marzo), e uno nel periodo autunnale (ottobre-novembre). I trattamenti dovrebbero essere ripetuti con le stesse modalità per almeno quattro anni consecutivi.

Infine, per quanto riguarda i tagli di bonifica fitosanitaria, questi dovrebbero essere indirizzati principalmente a ridurre il potenziale di inoculo di *Diplodia corticola* nei popolamenti di leccio attaccati da questo patogeno, in via prioritaria in quelli ancora esenti da attacchi di *Phytophthora*. Le attività cesorie (ceduazione, taglio selettivo di branche, ecc.) dovrebbero essere effettuate da personale specializzato che opera su indicazioni di esperti fitopatologi. I tagli dovranno essere eseguiti nei mesi invernali, ponendo sempre particolare cura alla disinfestazione sistematica degli attrezzi da lavoro. Inoltre, tutto il materiale vegetale tagliato dovrà essere immediatamente distrutto in loco. Fra le aree monitorate nell'ambito di questa ricerca sarebbe auspicabile procedere con questo tipo di attività nelle zone boschive a leccio limitrofe alle aree di saggio 8, 9 e 10.

Allegati:

- 1-A: mappa Caprera e ortofoto con aree di saggio del leccio.
- 1-B: mappa Caprera e corografia con aree di saggio del leccio.
- 1-C: corografia Caprera e mappa con aree di saggio del leccio.
- 1-D: corografia Caprera e ortofoto con aree di saggio del leccio.
- 2-A: mappa Caprera e ortofoto con aree di saggio dell'erica arborea.
- 2-B: mappa Caprera e corografia con aree di saggio dell'erica arborea.
- 2-C: corografia Caprera e mappa con aree di saggio dell'erica arborea.
- 2-D: corografia Caprera e ortofoto con aree di saggio dell'erica arborea.
- 3-A: mappa Caprera e ortofoto con area diffusione malattie su acacia.
- 3-B: mappa Caprera e corografia con area diffusione malattie su acacia.
- 3-C: corografia Caprera e mappa con area diffusione malattie su acacia.
- 3-D: corografia Caprera e ortofoto con area diffusione malattie su acacia.
- 4-A: mappa Caprera e ortofoto con aree diffusione malattie su ginepro fenicio.
- 4-B: mappa Caprera e corografia con aree diffusione malattie su ginepro fenicio.
- 4-C: corografia Caprera e mappa con aree diffusione malattie su ginepro fenicio.
- 4-D: corografia Caprera e ortofoto con aree diffusione malattie su ginepro fenicio.
- 5. Poster: "A new disease of *Erica arborea* in Italy caused by *Neofusicoccum luteum*". XVIII Convegno Nazionale Società Italiana di Patologia vegetale, Sassari 24-26.09.2012. Abstract in Journal of Plant Pathology, 2012.
- 6. Pubblicazione: "Cyclobotryoxide, a phytotoxic metabolite produced by the plurivorous pathogen *Neofusicoccum australe*. J. Nat. Prod. 2012, 75, 1785-1791.

Il responsabile scientifico
(Prof. Antonio Franceschini)

