

CONVENZIONE DI RICERCA

**Monitoraggio fitosanitario di ginepreti e
supporto scientifico all'Ente Parco per la bonifica sanitaria
di popolamenti deperenti di leccio e di ginepro
nelle isole dell'Arcipelago di La Maddalena**

RELAZIONE FINALE

Il responsabile scientifico
(Prof. Antonio Franceschini)



Sassari, 30 dicembre 2015

INDICE

PREMESSA.....	Pag. 1
ATTIVITÀ SVOLTE.....	“ 2
Monitoraggio fitosanitario.....	“ 2
Indagini diagnostiche sulle malattie della chioma.....	“ 3
Isolamento di microrganismi fitopatogeni.....	“ 3
Identificazione degli isolati.....	“ 3
Analisi filogenetiche.....	“ 4
Saggi di patogenicità.....	“ 4
Indagini diagnostiche sulle malattie radicali.....	“ 5
Isolamento di microrganismi fitopatogeni.....	“ 5
Identificazione degli isolati.....	“ 5
Analisi filogenetiche.....	“ 6
Saggi di patogenicità.....	“ 6
Bonifica fitosanitaria.....	“ 7
Prove di lotta contro le infezioni di patogeni della chioma.....	“ 7
Prove di lotta contro le infezioni di patogeni radicali.....	“ 7
Elaborazione dei dati.....	“ 10
RISULTATI DELLA RICERCA.....	“ 11
Indagini nell'isola di Budelli.....	“ 11
Monitoraggio fitosanitario.....	“ 11
Individuazione di microrganismi patogeni.....	“ 12
Indagini nell'isola di Caprera.....	“ 12
Monitoraggio fitosanitario.....	“ 12
Individuazione di microrganismi patogeni.....	“ 14
Indagini nelle isole di Mortorio e Le Camere.....	“ 20
Monitoraggio fitosanitario.....	“ 20
Individuazione di microrganismi patogeni.....	“ 21
Indagini nell'isola di Santa Maria.....	“ 22
Monitoraggio fitosanitario.....	“ 22
Individuazione di microrganismi patogeni.....	“ 23
Indagini nell'isola di Santo Stefano.....	“ 23
Monitoraggio fitosanitario.....	“ 23
Individuazione di microrganismi patogeni.....	“ 25
Indagini nell'isola di Spargi.....	“ 26
Monitoraggio fitosanitario.....	“ 26
Individuazione di microrganismi patogeni.....	“ 27
Saggi di patogenicità.....	“ 28
Patogeni della chioma.....	“ 28
Patogeni radicali.....	“ 29
Bonifica fitosanitaria.....	“ 30
Prove di lotta contro gli attacchi di patogeni della chioma.....	“ 30
Prove di lotta contro gli attacchi di patogeni radicali.....	“ 31
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	“ 34
Analisi dei risultati.....	“ 34
Monitoraggio fitosanitario delle isole.....	“ 34
Bonifica fitosanitaria.....	“ 38
Azioni future.....	“ 39
BIBLIOGRAFIA.....	“ 41

CONVENZIONE DI RICERCA

Monitoraggio fitosanitario di ginepreti e supporto scientifico all'Ente Parco per la bonifica sanitaria di popolamenti deperenti di leccio e di ginepro nelle isole dell'Arcipelago di La Maddalena

RELAZIONE FINALE

PREMESSA

In accordo con quanto previsto dalla convenzione stipulata con l'Ente Parco, l'attività di ricerca svolta dalla Sezione di Patologia vegetale ed Entomologia del Dipartimento di Agraria dell'Università di Sassari è stata indirizzata, mediante indagini di campo e di laboratorio, sia a studiare i quadri sintomatologici ed eziologici delle malattie emergenti che interessano principalmente le formazioni a ginepro fenicio e lentisco nelle isole dell'Arcipelago di La Maddalena, sia a sperimentare attività di bonifica fitosanitaria in popolamenti deperenti di leccio nell'isola di Caprera.

Più in particolare, le indagini di campo sono state rivolte a monitorare sotto il profilo fitosanitario le zone boschive delle isole di Budelli, Caprera, Le Camere, Mortorio, Santa Maria, Santo Stefano e Spargi, e a restituire su carte topografiche tematiche la distribuzione delle criticità patologiche riscontrate a carico delle due specie vegetali in esame e di altre specie tipiche della macchia mediterranea.

Le indagini diagnostiche di laboratorio sono state orientate a chiarire la complessa eziologia delle malattie emergenti del ginepro fenicio e del lentisco e a caratterizzare sotto il profilo morfologico, patogenetico e biomolecolare i patogeni coinvolti nelle infezioni sia della chioma che dell'apparato radicale delle piante.

Le attività di bonifica sanitaria sono state indirizzate a sperimentare l'efficacia di mezzi di lotta nei confronti dei principali patogeni associati ai fenomeni di deperimento che interessano i popolamenti di leccio di Caprera. In particolare sono state avviate due prove di lotta di breve-medio termine volte, la prima a ridurre il potenziale di inoculo del fungo *Diplodia corticola*, agente di "cancro" e disseccamenti della chioma, attraverso il taglio selettivo e la bruciatura tempestiva di piante deperenti o già morte; la seconda a contrastare le infezioni di *Phytophthora* spp. in un'area pilota appositamente recintata, mediante trattamenti con prodotti a base di fosfito di potassio, somministrati sia per aspersione al terreno in prossimità delle piante infette, sia per via endoterapica direttamente nel fusto delle piante.

Di seguito si riferisce più in dettaglio sulle attività svolte, sui principali risultati ottenuti e sulle azioni future da intraprendere per salvaguardare la biodiversità vegetale delle aree boschive delle isole dell'Arcipelago di La Maddalena.

ATTIVITÀ SVOLTE

Monitoraggio fitosanitario

Le indagini sono state effettuate nelle seguenti isole dell'Arcipelago di La Maddalena: Budelli, Caprera, Le Camere, Mortorio, Santa Maria, Santo Stefano e Spargi.

In ciascuna di queste isole, inizialmente è stato effettuato un accurato monitoraggio fitosanitario delle aree boschive con l'intento di individuare zone con piante di ginepro fenicio (*Juniperus phoenicea*) e/o di lentisco (*Pistacia lentiscus*) deperenti o già disseccate. Successivamente, nelle zone individuate, al fine di accertare la natura e l'incidenza dei casi patologici, è stata allestita un'area di saggio circolare di 10 m di diametro, almeno una per ciascuna isola.

Nell'isola di Santo Stefano è stata prevista un'area di saggio supplementare all'interno di un bosco di quercia da sughero. Nelle isole Le Camere, caratterizzate da una conformazione prettamente rocciosa del territorio e da una vegetazione di macchia bassa dove sia il ginepro che il lentisco erano presenti in modo sporadico, non è stato possibile allestire alcuna area di saggio. Pertanto, in queste isole è stata rilevata semplicemente la presenza di piante sintomatiche.

Tutte le aree di saggio sono state mappate e le coordinate geografiche rilevate con l'ausilio di un GPS portatile (eTrex, Garmin). È stato quindi organizzato un layer di lavoro, attraverso l'utilizzo di un software GIS, con ottenimento di carte topografiche tematiche.

In ciascuna area è stato rilevato il numero di piante di ginepro e/o di lentisco e valutato il loro stato sanitario, ponendo particolare attenzione alla presenza di sintomi specifici: cancri, necrosi, essudati, disseccamenti su fusto e rami e necrosi/essudati a livello del colletto.

Al fine di chiarire le cause delle sindromi riscontrate e isolare gli eventuali patogeni coinvolti, all'interno di ciascuna area di saggio sono stati prelevati campioni sia dalla parte aerea che dalla rizosfera di piante sintomatiche. La metodologia di campionamento è stata la stessa utilizzata nel monitoraggio dei querceti nell'isola di Caprera, oggetto della precedente convenzione tra l'Ente Parco e il Dipartimento di Agraria dell'Università di Sassari, e descritta sia nella relativa relazione finale, sia nelle pubblicazioni scientifiche prodotte (Linaldeddu *et al.*, 2014; Scanu *et al.*, 2014a).

Nello specifico, in ciascuna area di saggio sono stati prelevati campioni di corteccia e di legno dal margine di cancri e di necrosi presenti su fusto e rami di piante deperenti delle due specie oggetto d'indagine. Inoltre, in prossimità di piante sintomatiche di ginepro e lentisco – ma anche di altre specie della macchia mediterranea, in particolare alaterno (*Rhamnus alaternus*), asparago (*Asparagus albus*) e cisto (*Cistus* spp.) che presentavano sintomi (disseccamenti dei rami e necrosi a livello del colletto) riconducibili ad attacchi di *Phytophthora* – sono stati prelevati sia porzioni di tessuto corticale e xilematico in corrispondenza del fronte di avanzamento delle infezioni, sia campioni di suolo e di radici ad una profondità compresa tra 5 e 15 cm.

Nell'isola di Santo Stefano, vista la molteplicità degli ambienti che la caratterizzano, per avere un quadro esauriente delle principali fitopatie presenti sono stati prelevati campioni anche da piante sintomatiche scelte *at random* di specie della macchia mediterranea differenti da quelle presenti nelle due aree di saggio.

Tutti i campioni sono stati raccolti in buste di plastica, sulle quali sono stati annotati i riferimenti del prelievo, e conservati in frigorifero a 5°C fino al momento dell'uso per l'isolamento dei patogeni.

Indagini diagnostiche sulle malattie della chioma

Isolamento di microrganismi fitopatogeni

Tutti i campioni prelevati dagli organi della chioma di piante sintomatiche 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 fungine 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 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 nelle colonie dei caratteri morfologici idonei per l'identificazione della specie fungina.

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 mantenuti a temperatura ambiente con un fotoperiodo naturale.

Identificazione degli isolati

Tutte le colonie fungine ottenute nel corso delle indagini sono state identificate su base sia morfo-fisiologica, sia genetica.

Analisi morfo-fisiologiche. Sono stati presi in esame caratteri culturali quali la crescita e la colorazione della colonia, la struttura del micelio, la produzione di pigmenti diffusibili a differenti temperature, la forma e le dimensioni dei conidi. 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 contenenti i conidi. Questi 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 Leica DFC495 collegata al microscopio.

Studi genetici. L'identificazione su base genetica è stata effettuata attraverso l'analisi delle sequenze nucleotidiche dell'intera regione degli spaziatori interni trascritti (ITS1 e ITS2) incluso il gene 5.8S del rDNA e una porzione del gene del fattore di allungamento della traduzione EF1- α . L'estrazione del DNA fungino è stata effettuata da colonie pure su PDA di 4-7 giorni di età utilizzando il kit Instagene Matrix (BioRad Laboratories, Hercules, CA), secondo le istruzioni della casa produttrice. Gli estratti sono stati quindi conservati a - 20°C fino al loro successivo utilizzo. Con la reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata amplificata la regione ITS utilizzando i *primer* universali ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) e una porzione del gene EF1- α attraverso l'impiego dei *primer* EF446f and EF1035r (Inderbitzin *et al.*, 2010). La reazione è stata realizzata in un volume totale di 50 μ l contenente: 18,7 μ l di H₂O; 10 μ l di Buffer 5x; 5 μ l di dNTPs; 5 μ l di BSA; 5 μ l di ciascun *primer*; 0,3 μ l di GoTaq polymerase (Promega); 1 μ l di DNA. La reazione d'amplificazione è stata eseguita con un termociclatore (Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler), utilizzando i cicli termici riportati da Linaldeddu *et al.* (2013). Aliquote di 5 μ l di ciascun prodotto di amplificazione e dello standard costituito dal 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™) sono stati fatti migrare mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% in tampone TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3), usando come tracciante molecolare il SYBR-Safe (Invitrogen™). La dimensione degli ampliconi (bp) così come la loro concentrazione (ng/ μ l) è stata determinata attraverso il Molecular Imager® Gel Doc™

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

Analisi filogenetiche

Vista la presenza di polimorfismi unici e fissati nelle sequenze ITS e EF1- α di alcuni isolati afferenti al genere *Diplodia* ottenuti in questo studio da piante di lentisco, è stata condotta un'analisi filogenetica con l'intento di chiarirne la reale identità. A tal fine le sequenze ITS e EF1- α di 3 isolati sono state combinate e inserite in un data-set con altre 52 sequenze rappresentative di tutte le specie di *Diplodia* finora conosciute. Le sequenze sono state allineate utilizzando il programma ClustalX v 1.83 (Thompson *et al.*, 1997), con i seguenti parametri: *pairwise alignment parameters* (*gap opening* = 10, *gap extension* = 0,1) e *multiple alignment parameters* (*gap opening* = 10, *gap extension* = 0,2, *transition weight* = 0,5, *delay divergent sequences* = 25 %).

La ricostruzione filogenetica è stata eseguita secondo il principio della massima verosimiglianza o *maximum likelihood* (ML; Felsenstein, 1981) utilizzando il programma MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). All'analisi è stato applicato il *general time-reversible model* (Rodriguez *et al.*, 1990), che include la stima dei siti invariabili assumendo una distribuzione gamma discreta con sei categorie (GTR + G + I). Tutti i *gaps* sono stati inclusi nelle analisi. La robustezza degli alberi ML è stata testata tramite 1000 repliche di bootstrap (Felsenstein, 1985). È stata effettuata anche un'analisi filogenetica bayesiana utilizzando il programma Mr Bayes v.3.0b4 (Ronquist e Huelsenbeck 2003) ed il metodo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC). Quattro catene MCMC sono state eseguite simultaneamente, a partire dagli alberi casuali ottenuti in 10⁶ generazioni. Gli alberi sono stati campionati ogni 100 generazioni, per un totale di 10⁴ alberi. I primi 10³ alberi posizionati prima del punto *burn-in* sono stati scartati dall'analisi. Gli alberi sono stati visualizzati con il programma TreeView (Page, 1996).

Saggi di patogenicità

Le specie fungine isolate da lentisco rappresentano una novità per questo ospite per cui ne è stata saggiata la patogenicità e sono stati completati i postulati di Koch. A tal fine è stato impiegato un isolato rappresentativo di ciascuna specie.

In totale è stata saggiata la patogenicità di 6 specie fungine tramite inoculazione in bosco di 24 rami asintomatici di lentisco (6 per ciascun isolato fungino). Le piantine sono state inoculate ponendo una porzione di micelio (3-4 mm²), prelevata dal margine di una colonia in attiva crescita su PDA, su una ferita superficiale (~ 3 mm²) fatta con un bisturi sterile sulla parte basale di ciascun ramo. Sei rami sono stati utilizzati come testimoni e inoculati con una porzione 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. Al termine del periodo sperimentale (40 giorni) è stata rilevata la presenza, natura ed estensione di eventuali sintomi esterni ed interni. Inoltre, dai tessuti corticali e legnosi prossimi al punto di infezione di ciascun ramo sono stati effettuati isolamenti (su PDA) al fine di confermare la

presenza delle specie fungine inoculate nei rami. Alla fine della prova, tutto il materiale infettato in bosco è stato trasferito in laboratorio e distrutto.

Indagini diagnostiche sulle malattie radicali

Isolamento di microrganismi fitopatogeni

Le indagini di laboratorio sono state indirizzate in particolare ad accertare l'eventuale presenza di patogeni appartenenti al genere *Phytophthora*. A tale scopo, i campioni vegetali costituiti da porzioni di tessuto corticale e xilematico prelevati dal fusto in corrispondenza del fronte di avanzamento delle infezioni sono stati disinfettati in superficie con etanolo al 70% per 30 sec. Da ogni campione sono stati poi prelevati frammenti di tessuto di circa 3-4 mm² e posti in piastre Petri contenenti *Synthetic Mucor Agar* (SMA), un substrato selettivo per *Phytophthora* (Scanu *et al.*, 2014a). Le piastre sono state trasferite in termostato a 18-20°C, controllate giornalmente e tutte le colonie con caratteristiche morfologiche tipiche del genere *Phytophthora* sono state asetticamente trapiantate in piastre Petri (90 mm Ø) contenenti carota agar (CA). Le colonie ottenute in purezza sono state mantenute in termostato a 20°C al buio, per la differenziazione delle strutture morfologiche necessarie per l'identificazione a livello di specie.

I campioni di suolo e radici (circa 200 g) sono stati versati all'interno di vaschette di plastica, in cui, successivamente sono stati aggiunti 500 ml di acqua distillata. Dopo circa 24 ore, sulla superficie dell'acqua sono state posizionate foglie fresche di sughera (*Quercus suber*), utilizzate come esche. Dopo 3 e 5 giorni le foglie che presentavano maculature o aree necrotiche, sono state lavate in acqua sterile, asciugate su carta da filtro e trasferite su piastre Petri contenenti SMA. Le piastre sono state quindi trasferite in termostato a 18-20°C, applicando il protocollo appena descritto.

Poiché i corsi d'acqua o i ristagni idrici (anche temporanei) rappresentano importanti siti di accumulo di propaguli di *Phytophthora*, gli isolamenti sono stati effettuati in campo anche in tali siti mediante il posizionamento di trappole sulla superficie dell'acqua. Le trappole sono state preparate in laboratorio e consistevano in 2 fogli di garza (20 x 20 cm) sovrapposti con all'interno foglie di specie vegetali diverse, tra cui *Arbutus unedo*, *Hedera helix*, *Pittosporum undulatum*, *Quercus ilex* e *Q. suber*. I fogli sono stati sigillati e posizionati lungo i principali corsi d'acqua e stagni presenti nelle isole. Dopo 4-5 giorni le trappole sono state prelevate e trasferite in laboratorio per gli isolamenti su SMA come precedentemente descritto.

Identificazione degli isolati

Gli isolati ottenuti nel corso delle indagini sono stati identificati su base sia morfologica sia genetica.

Analisi morfo-fisiologiche. Le caratteristiche delle principali strutture riproduttive (sporangii, clamidospore, gametangi) degli isolati sono state confrontate con quelle riportate in letteratura scientifica per le varie specie di *Phytophthora*. Per le specie eterotalliche sono stati effettuati dei saggi in coltura duale per determinare il *mating type* (A1 o A2) degli isolati ottenuti attraverso l'utilizzo di ceppi test di tipo sessuale A1 e A2 già noto.

È stato valutato l'effetto della temperatura sullo sviluppo delle colonie attraverso la misurazione dell'accrescimento radiale giornaliero. In particolare, 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 o 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. Sulla base delle analisi a livello morfologico e della crescita miceliare alle diverse temperature sono stati individuati

dei morfotipi e di questi sono stati selezionati uno o più isolati rappresentativi per ulteriori studi biomolecolari, fisiologici e per i saggi di patogenicità. Tutti gli isolati rappresentativi di ciascuna specie sono stati depositati nella collezione micologica del Dipartimento di Agraria, sezione di Patologia vegetale ed Entomologia, dell'Università di Sassari.

Studi genetici. Al fine di confermare l'identificazione delle specie di *Phytophthora* effettuata su base morfologica, alcuni isolati di ciascuna specie sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA, il sequenziamento e l'analisi delle sequenze dell'intera regione degli spaziatori interni trascritti (ITS1 e ITS2) incluso il gene 5.8S del rDNA. Per alcune specie, sottoposte a successive analisi filogenetiche, è stata inoltre sequenziata la regione genica mitocondriale *cox1* (*cytochrome oxidase subunit I*). La metodologia utilizzata per l'ottenimento delle sequenze è stata la stessa riportata nel capitolo relativo all'identificazione dei patogeni della parte aerea delle piante. Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state lette ed analizzate attraverso il programma BioEdit v. 5.0.6 (Hall, 2001) e i nucleotidi dedotti sono stati confrontati con i dati disponibili nel database online GenBank utilizzando il programma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Analisi filogenetiche

Le sequenze nucleotidiche della regione nucleare ITS e mitocondriale *cox1* sono state raggruppate in un *dataset* che comprendeva anche le sequenze rappresentative di altre specie di *Phytophthora* presenti in GenBank; le sequenze sono state allineate tramite il software ClustalX v. 1.83 (Thompson *et al.*, 1997). Le analisi filogenetiche dei dati relativi alle sequenze sono state eseguite utilizzando il software PAUP* v.4.0b10 (Swofford, 2003) per l'analisi secondo il criterio della massima parsimonia (*Maximum-parsimony analysis* - MP) e con il software Mr Bayes v.3.0b4 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) per l'analisi bayesiana (*Bayesian Inference analysis* - BI), seguendo la metodologia già esposta a proposito delle analisi filogenetiche dei microrganismi fitopatogeni della chioma.

Saggi di patogenicità

I saggi di patogenicità delle specie di *Phytophthora* ottenute in questo studio sono stati effettuati seguendo il metodo del suolo infetto riportato da Scanu e coll. (2014a). I semenzali di ginepro fenicio e lentisco utilizzati nella prova sono stati ottenuti dai vivaisti dell'Ente Foreste della Sardegna (vivaio produttivo di Badesi e La Mandra di La Giua di Sassari). In totale sono stati saggiati 96 semenzali di ginepro e 88 di lentisco e le prove sono state effettuate nel mese di aprile 2014. Le piantine sono state coltivate in vasi di plastica da 0,5 L (Bamaplast), contenenti 60% terriccio e 40% sabbia. Una volta raggiunta l'altezza di circa 20-30 cm, le piantine sono state trasferite in vasi di plastica da 1 L contenenti suolo infettato con *Phytophthora*. L'inoculo di *Phytophthora* è stato preparato come di seguito riportato: dischetti di 5 mm sono stati prelevati da colonie di 5 giorni di età e posizionati all'interno di beute da 250 ml contenenti 150 ml di semi di miglio e 100 ml di brodo di V8 (200 ml V8 Juice, 3 g CaCO₃; 800 ml di acqua distillata). Le beute sono state incubate in termostato ad una temperatura di 20°C per 4-6 settimane. Trascorso tale periodo la miscela ormai colonizzata dal micelio è stata lavata ripetutamente con acqua sterile al fine di ridurre l'eccesso di nutrienti, e successivamente aggiunta (25 ml) al substrato (1 L). I vasi sono stati conservati in laboratorio e dopo 5 giorni dall'inoculazione immersi per 24 ore in vaschette di plastica contenenti acqua distillata al fine di indurre la sporulazione degli isolati di *Phytophthora*. Quattro mesi dopo l'inoculazione, l'apparato radicale delle piante inoculate è stato scannerizzato e la lunghezza delle radici misurata mediante l'impiego del software APS Assess 2.0 (*The American Phytopathological Society*, USA). Dalle radici che presentavano

necrosi sono stati effettuati gli isolamenti su SMA, al fine di confermare la presenza del patogeno.

Bonifica fitosanitaria

Prove di lotta contro le infezioni di patogeni della chioma

Al fine di risanare le formazioni boschive a leccio dell'isola di Caprera dalle infezioni del fungo patogeno *Diplodia corticola*, è stata avviata una prova sperimentale di lotta nell'area di studio numero 8 individuata nel corso delle indagini relative alla precedente convenzione con l'Ente Parco prima citata. In tale sito nella primavera del 2014 è stato avviato un piano di interventi di taglio e distruzione di materiale vegetale infetto. Nello specifico i tagli di bonifica fitosanitaria hanno riguardato 159 piante di leccio sintomatiche. Tutto il materiale vegetale tagliato è stato immediatamente distrutto in loco e i tagli sono stati protetti con un mastice specifico per potature. Le piante oggetto di intervento sono state numerate e monitorate stagionalmente dal punto di vista fitosanitario. Tutte le operazioni di taglio sono state eseguite da personale specializzato dell'Ente Foreste della Sardegna.

Prove di lotta contro le infezioni di patogeni radicali

In novembre 2014, in accordo con l'Ente Parco, il Corpo Forestale e di Vigilanza Ambientale e l'Ente Foreste della Sardegna, è stata impostata una prova sperimentale di lotta contro gli attacchi di *Phytophthora* spp. nei popolamenti di leccio dell'isola di Caprera. La prova è basata sull'uso di un ammendante, il fosfito di potassio, che oltre a possedere proprietà fungicide nei confronti degli oomiceti, e in particolare delle specie di *Phytophthora*, si comporta anche come induttore di resistenza. Esso infatti stimola la sintesi di fitoalessine endogene che sono direttamente coinvolte nei meccanismi di difesa delle piante (Guest e Grant, 1991). L'uso del fosfito di potassio è una pratica ormai comune negli ecosistemi forestali dell'Australia contro gli attacchi di *Phytophthora* spp. su diverse specie vegetali (Shearer *et al.*, 2006). In Europa, sebbene il suo impiego sia ancora limitato, promettenti risultati sono stati ottenuti in Spagna e Portogallo contro i gravi fenomeni di deperimento delle querce causati da *P. cinnamomi* (Fernández-Escobar *et al.*, 1999; Solla *et al.*, 2009).

L'esperienza nell'isola di Caprera è stata realizzata in un'area pilota di circa 1000 m² (41°13'N, 9°28'E) dove nel corso di precedenti monitoraggi erano state accertate infezioni di *Phytophthora* spp. su piante di leccio. L'area pilota, grazie al fattivo contributo dell'Ente Foreste, è stata recintata con rete metallica e dotata di idoneo cancello per impedire il passaggio degli animali selvatici e delle persone. All'interno dell'area, in prossimità dell'ingresso, è stato esposto un cartello recante le informazioni essenziali sulla sperimentazione in atto e sui motivi della restrizione (Fig. 1).

Il fosfito di potassio è stato somministrato alle piante sia per assorbimento radicale in seguito ad aspersione del terreno tutt'intorno alle piante, sia per via endoterapica mediante appositi dispensatori applicati direttamente sul fusto. I formulati a base di fosfito di potassio utilizzati in entrambe le prove sono stati appositamente studiati per il trattamento di piante arboree in aree verdi nel rispetto della direttiva 2009/128/CE del Parlamento europeo.



Figura 1. Cartello informativo sulla sperimentazione in corso nell'area pilota.

Prima di effettuare i trattamenti con fosfito di potassio sono state abbattute le piante ormai disseccate presenti all'interno dell'area e il materiale di risulta è stato asportato e bruciato in luogo idoneo. L'area pilota è stata poi suddivisa con nastro segnaletico in tre plot comprendenti ciascuno circa 50 piante di leccio (Fig. 2).

Nel plot 1 il trattamento ha previsto la distribuzione al suolo del concime fluido commerciale Kalex™, fornito dalla ditta AlbaMilagro (Parabiago, Italia), contenente fosfito di potassio alla concentrazione del 42%. In particolare è stata preparata una soluzione acquosa contenente 100g di fosfito/l che, con l'ausilio di una pompa irroratrice a spalla, è stata poi distribuita sul terreno in ragione di circa 0,2 l/m² di superficie (Fig. 3a). Il trattamento è stato effettuato a gennaio 2015 e ripetuto alla fine di maggio dello stesso anno.

Nel plot 2 il fosfito di potassio è stato somministrato alle piante per via endoterapica utilizzando, come detto, appositi dispensatori inseriti nel fusto. Allo scopo è stato utilizzato un prodotto commerciale fornito dalla ditta Fertinyect SL (Córdoba, Spagna), seguendo il metodo descritto da Fernández-Escobar e coll. (1999). In particolare, a gennaio 2015, con l'ausilio di un trapano sono stati praticati nel fusto delle piante dei fori di 3,5 mm di diametro, profondi 4-5 cm a seconda dello spessore della corteccia, ad una altezza di circa 1,3 m da terra. In tali fori sono stati poi inseriti i dispensatori Fertinyect® contenenti una soluzione di 200 ml di fosfito di potassio che è stata assorbita naturalmente dalla pianta. Il numero di dispensatori per pianta è stato scelto in funzione della dimensione del fusto a petto d'uomo, applicando un dispensatore ogni 20-30 cm di circonferenza (Fig.3 b-d). Anche in questo caso il trattamento è stato ripetuto a maggio 2015.

Infine nel plot 3 non è stato effettuato alcun trattamento in modo da poter verificare, con opportuni confronti in sede di analisi dei risultati, l'efficacia dei trattamenti effettuati negli altri due plot.

Tutte le piante presenti nei plot sono state numerate con apposita targhetta identificativa ed attentamente esaminate per caratterizzarne lo stato sanitario.

A tal fine, a ciascuna pianta è stata attribuita una "classe di malattia" compresa tra 0 e 4 in base al grado di trasparenza della chioma, come segue: 0 = pianta sana (trasparenza della chioma <5%); 1 = pianta con primi sintomi di deperimento (trasparenza della chioma 6–20%); 2 = pianta con moderati sintomi di deperimento (21–50%); 3 = pianta con marcati sintomi di deperimento (51–80%); 4 = pianta in stadio avanzato di deperimento (>80%). La valutazione dello stato sanitario delle piante è stata effettuata sia prima che dopo i trattamenti con fosfito di potassio, rispettivamente a gennaio e a novembre 2015. In quest'ultima occasione, in ciascun plot è stato valutato anche il grado di mortalità (M), calcolato dividendo il numero di piante morte (d) per il numero totale di piante (N) all'interno del plot: $M = d/N$.

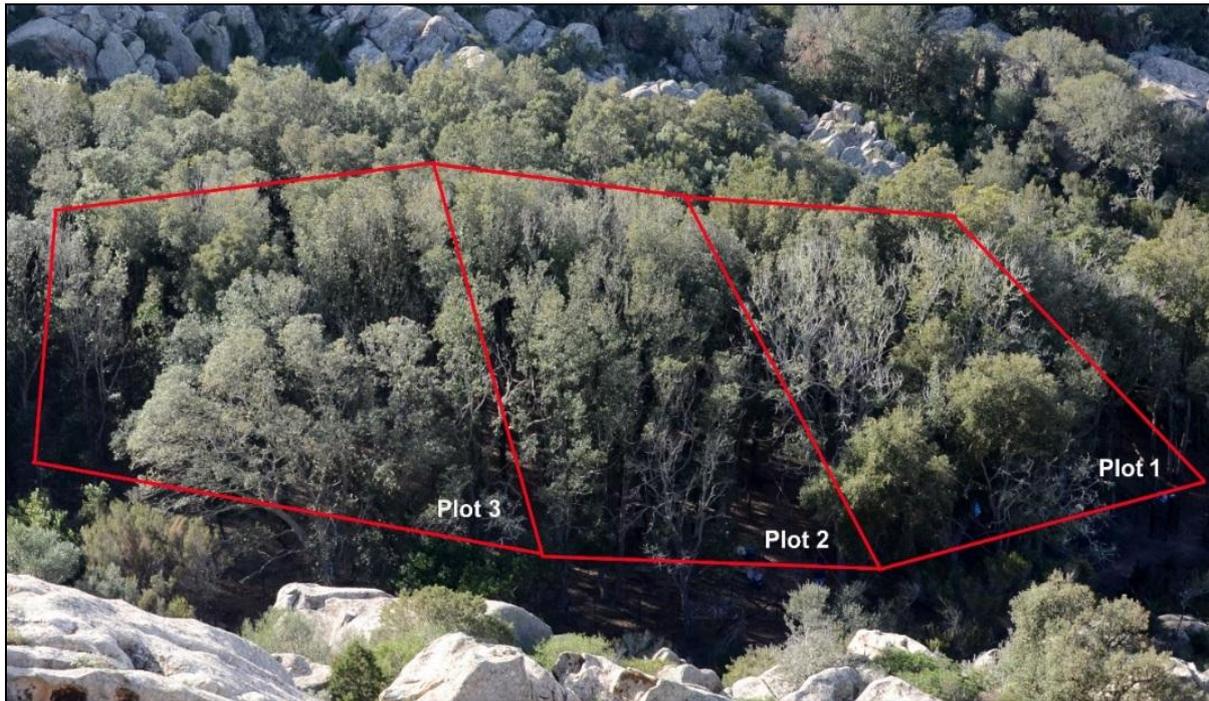


Figura 2. Visione d'insieme dell'area pilota con delimitazione dei plot soggetti a trattamenti con fosfito di potassio mediante asperzione al terreno (Plot 1) e per via endoterapica (Plot 2). Nel plot 3 non sono stati effettuati trattamenti (controllo).



Considerata l'elevata capacità di traslocazione del fosfito di potassio all'interno della pianta, in senso sia acropeto che basipeto, e la sua attività fungicida nei confronti degli oomiceti, l'efficacia dei trattamenti è stata valutata anche mediante biosaggi effettuati su rametti prelevati da ciascun plot dell'area pilota. In particolare, un mese dopo il secondo trattamento (giugno 2015), 10 porzioni di rametti di circa 1-2 cm di diametro e 50 cm di lunghezza, sono stati tagliati dalle piante di leccio trattate e non, e trasferiti in laboratorio per essere inoculati con ceppi patogeni di *Phytophthora*, seguendo il metodo descritto da Scanu e coll. (2014b).

Prima dell'inoculazione i rametti sono stati disinfettati in superficie con alcool etilico al 70% e le due estremità e le eventuali ferite sigillate con parafilm. Successivamente, ciascun rametto è stato inciso in superficie con un bisturi in modo da asportare un tratto di corteccia di circa 1 cm, ed è stato inoculato con un dischetto di micelio di 5 mm² prelevato da una coltura di *P. cinnamomi* sviluppatasi per una settimana su un substrato artificiale a base di carota-agar. Il punto di inoculo è stato quindi coperto con cotone idrofilo sterile, inumidito con acqua distillata sterile, avvolto con carta stagnola e sigillato con nastro isolante. I rametti così inoculati sono stati infine racchiusi in buste di plastica, sigillate e poste per 2 settimane in termostato ad una temperatura di circa 20°C. Trascorso tale periodo i rametti sono stati scortecciati intorno al punto di inoculazione ed è stata misurata la lunghezza delle lesioni sviluppatasi.

Elaborazione dei dati

I dati morfometrici di tutti gli isolati e quelli relativi ai saggi di patogenicità sono stati sottoposti all'analisi della varianza ANOVA, al test HSD (*Honestly Significant Difference*) di Tukey e al test di confronto multiplo LSD (*Least Significant Difference*) di Fisher utilizzando il programma statistico XLSTAT 2008 software (Addinsoft, Francia). Differenze tra le medie per $P \leq 0,05$ sono state considerate significative.

RISULTATI DELLA RICERCA

Indagini nell'isola di Budelli

Monitoraggio fitosanitario

Dai sopralluoghi effettuati è emerso che la vegetazione, costituita da specie tipiche della macchia mediterranea, si trova in buone condizioni fitosanitarie. Solo in un'area boschiva adiacente alla casa del custode è stata riscontrata la presenza diffusa di piante di ginepro, lentisco ed erica deperenti. Pertanto, l'area di saggio è stata allestita in questo sito.

Le piante di ginepro e lentisco sintomatiche mostravano un graduale disseccamento della chioma (Fig. 4). Su rami e branche erano presenti numerose aree necrotiche depresse più o meno ampie e cancri spesso umidi per l'emissione di essudati. In seguito alla rimozione dei tessuti corticali, tramite uno scalpello, erano visibili in corrispondenza dei cancri, necrosi del legno che interessavano anche il midollo. Ispezioni accurate a livello del colletto e dell'apparato radicale non hanno consentito di rilevare sintomi di marciume o di necrosi.

Le piante di erica arborea mostravano il progressivo disseccamento dei germogli dell'anno (Fig. 4), tipico sintomo ascrivibile a una nuova malattia dell'erica recentemente descritta a Caprera da Linaldeddu *et al.* (2015).



Figura 4. Principali quadri sintomatologici riscontrati nell'isola di Budelli: ginepro fenicio con sintomi di disseccamento del ramo apicale (a), necrosi del legno a livello di un cancro su branca di ginepro fenicio (b), disseccamento progressivo di ampie porzioni della chioma in piante di ginepro fenicio (c), disseccamento dei getti dell'anno in piante di erica arborea (d), lentisco con rami disseccati (e).

All'interno dell'area di saggio sono state censite complessivamente 35 piante, di cui 32 di ginepro fenicio e 3 di lentisco. Poco meno della metà di quelle di ginepro erano asintomatiche, le restanti erano in gran parte ormai morte. Tutte e 3 le piante di lentisco erano sintomatiche (Tab. 1).

Tabella 1. Numero di piante di ginepro e lentisco monitorate e campionate nell'area di saggio allestita nell'isola di Budelli e relativo stato sanitario.

Area di saggio	Coordinate geografiche	Specie vegetale	Numero piante				
			Totale	Asintomatiche	Deperenti	Morte	Campionate
1	41°16'48"N 09°21'22"E	Ginepro	32	15	4	13	3
		Lentisco	3	-	3	-	3

Individuazione di microrganismi patogeni

Dai tre campioni di ginepro fenicio sono state isolate colonie fungine appartenenti alla specie *Diplodia africana* Damm & Crous, patogeno recentemente segnalato su ginepro a Caprera (Linaldeddu *et al.*, 2011). Dagli isolamenti effettuati su lentisco si sono sviluppate tre colonie fungine, due appartenenti alla specie *Neofusicoccum cryptoaustrale* Pavlic, Maleme, Slippers & M.J. Wingf. e una alla specie *Neofusicoccum luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips.

L'identificazione di tutti gli isolati è stata confermata dall'analisi delle sequenze ITS e EF1- α . Per entrambe le regioni geniche la *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze della ex-coltura tipo di *D. africana* (ITS: EF445343; EF1- α : EF445382), *N. cryptoaustrale* (ITS: FJ752742; EF1- α : FJ752713) e *N. luteum* (ITS: AY259091; EF1- α : AY573217).

Da un punto di vista scientifico è importante sottolineare che questo rinvenimento rappresenta la prima segnalazione di *N. cryptoaustrale* e *N. luteum* su lentisco.

Nei campioni di suolo e radici prelevati da piante sintomatiche di ginepro fenicio e lentisco non è stata riscontrata la presenza di specie di *Phytophthora*.

Indagini nell'isola di Caprera

Monitoraggio fitosanitario

Le indagini sono state indirizzate a valutare lo stato sanitario prevalentemente delle formazioni a ginepro fenicio e a lentisco, ma anche di altre specie tipiche della macchia mediterranea come asparago e cisto.

Le piante sintomatiche di lentisco mostravano un disseccamento progressivo dei germogli, dei rami e delle branche. Nel periodo primaverile i nuovi germogli disseccavano rapidamente e nei rami più giovani era possibile osservare la presenza di estese aree necrotiche e di cancri. In sezione trasversale i cancri mostravano ampi settori necrotici estesi fino al midollo dalla caratteristica forma a "V". L'area necrotica spesso interessava l'intera circonferenza del ramo. Le foglie sui rami sintomatici viravano rapidamente al giallo, al marrone ed infine al rosso scuro. Esse spesso rimanevano attaccate ai rami a lungo anche dopo il loro disseccamento. In alcuni casi le piante infette reagivano emettendo nuovi germogli alla base dei rami disseccati (Fig. 5).



Figura 5. Principali quadri sintomatologici riscontrati su piante di lentisco nell'isola di Caprera: disseccamento dei germogli (a), disseccamento progressivo di ampie porzioni della chioma (b-c), necrosi sottocorticale su branca (d), sezione trasversale di un ramo con in evidenza un settore necrotico a forma di "V" in corrispondenza del cancro (e), getti epicormici su rami (f).

Le piante di ginepro sintomatiche mostravano gli stessi sintomi già riscontrati su piante deperenti nel corso di precedenti monitoraggi in un'area limitata dell'isola (sito n. 3); sintomi che furono associati ad infezioni di specie di *Phytophthora*. Nello specifico i sintomi osservati variavano da un deperimento cronico a una morte repentina delle piante (Fig. 6a-e). Nel primo caso le piante manifestavano progressivi stadi di rarefazione della chioma, disseccamento delle porzioni apicali dei rami e la presenza di numerosi getti epicormici sul fusto e sulle branche. Nel secondo caso le piante mostravano un parziale o completo disseccamento della chioma; le foglie inizialmente viravano al giallo e, successivamente, al rosso opaco ed infine al marrone-cenerino e spesso rimanevano attaccate a lungo ai rami anche dopo il loro disseccamento. Spesso a questi sintomi nella chioma erano associati sintomi di marciume a livello del colletto e delle radici. Sulle piante più giovani la rimozione dell'intera pianta ha rilevato la completa assenza di apparato radicale e in particolare delle radici laterali più sottili.

Sintomi riconducibili ad attacchi di specie di *Phytophthora* sono stati riscontrati anche su diverse specie arbustive della macchia mediterranea, in particolare su cisto, lentisco e asparago (Fig. 6f, g). Le piante colpite mostravano il disseccamento repentino di intere porzioni della chioma e spesso marciumi a livello del colletto e delle grosse radici.



Figura 6. Principali quadri sintomatologici riscontrati nell'isola di Caprera su piante della macchia mediterranea attaccate da specie di *Phytophthora*: rarefazione della chioma, disseccamenti e comparsa di rami epicormici su fusto e branche (a) e sintomi di morte repentina sia su alberi maturi (b) sia su piante giovani di *Juniperus phoenicea* (c); particolare delle necrosi sotto corticali a livello del colletto (d) e delle grosse radici su ginepro (e); disseccamenti e morie su *Pistacia lentiscus* (f) e *Asparagus albus* (g).

Da segnalare, infine, che in alcune aree dell'isola di Caprera è stata riscontrata sia la presenza di diverse piante di ginepro ormai morte di cui non è stato possibile stabilire la causa, sia una marcata riduzione della rinnovazione naturale di ginepro e di leccio.

I risultati dei rilevamenti effettuati nelle aree di saggio 1 e 2, allestite per indagare sui patogeni della chioma, sottolineano soprattutto la gravità della situazione sanitaria del lentisco, sia per l'elevato numero di piante con sintomi di malattia, sia per l'intensità dei sintomi che le stesse manifestavano (Tab. 2). In totale sono state monitorate 20 piante: 18 (90%) mostravano disseccamenti su rami e branche, essudati, rami epicormici e cancri, e 2 (10%) erano disseccate. Nell'area di saggio 3, allestita per indagare sui patogeni radicali, sono state monitorate 14 piante di ginepro e 10 di lentisco (Tab. 2): il 78% delle piante di ginepro mostravano sintomi di deperimento e oltre il 36% erano disseccate; per il lentisco il 40% delle piante monitorate erano asintomatiche, mentre il 60% presentavano sintomi di deperimento.

In ciascuna area di saggio è stato inoltre monitorato lo stato sanitario delle altre specie arbustive della macchia mediterranea: nell'area di saggio 2 entrambe le piante di fillirea presenti mostravano cancri nei rami e disseccamenti, mentre nell'area di saggio 3 erano presenti 8 piante di asparago, di cui solo erano 2 asintomatiche, e 6 piante di cisto di cui solo 1 appariva in buone condizioni sanitarie.

Individuazione di microrganismi patogeni

Dagli isolamenti effettuati dai tessuti legnosi e corticali dei cancri prelevati dalle piante di lentisco sono stati ottenuti complessivamente 20 isolati fungini appartenenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae*. Essi sulla base dei caratteri morfologici sono stati suddivisi in 2

gruppi. Cinque isolati inseriti nel primo gruppo mostravano su PDA un micelio compatto e radente, inizialmente bianco poi virante al grigio scuro. Le colonie differenziavano dapprima
Tabella 2. Numero di piante di lentisco, di ginepro e di altre specie di macchia monitorate e campionate nelle aree di saggio allestite a Caprera e relativo stato fitosanitario.

Area di saggio	Coordinate geografiche	Specie vegetale	Numero piante				
			Totale	Asintomatiche	Deperenti	Morte	Campionate
1	41°12'51"N 09°27'01"E	Lentisco	12	-	10	2	10
		Ginepro	5	-	1	4	-
2	41°12'36"N 09°27'42"E	Lentisco	8	-	8	-	8
		Fillirea	2	-	2	-	-
3	41°12'34"N 09°27'17"E	Ginepro	14	2	7	5	10
		Lentisco	10	4	6	-	5
		Asparago	8	2	5	1	4
		Cisto	6	1	4	1	3

numerosi picnidi contenenti conidi ialini e asettati misuranti $24,5 \times 12,5 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di 1,96. La dimensione e la forma dei conidi unitamente al rapporto tra lunghezza e larghezza è in accordo con i valori riportati da Lazzizzera *et al.* (2008) per la specie *Diplodia olivarum* A.J.L. Phillips, Frisullo & Lazzizzera. L'identificazione è stata confermata dall'analisi delle sequenze ITS e EF1- α . Per entrambe le regioni geniche la *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze della ex-coltura tipo di *D. olivarum* (ITS: EU392302; EF1- α : EU392279).

Le colonie del secondo gruppo, il più numeroso (15 isolati), mostravano dei caratteri morfologici peculiari che non hanno consentito di identificarli a livello di specie. Tutte le colonie erano caratterizzate da un micelio a rapida crescita inizialmente bianco e dopo 4-5 giorni virante prima al grigio chiaro e infine al grigio scuro (Fig. 7).

Le colonie differenziavano i picnidi solo sui rametti di leccio sterili posizionati nelle piastre di PDA. I picnidi contenevano conidi pigmentati con parete finemente ornamentata, subcilindrici e misuranti $18,21\text{-}(22,63)\text{-}25,88 \times 9,12\text{-}(11,68)\text{-}14,41 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di $1,95 \pm 0,23$ (media \pm deviazione standard; $n = 50$) (Fig. 7). La dimensione dei conidi e il rapporto tra la loro lunghezza e larghezza risulta essere differente da quello riportato per tutte le altre specie conosciute nel genere *Diplodia*. Anche le indagini molecolari hanno messo in evidenza la presenza di differenze tra la sequenza nucleotidica dei 15 isolati e quelle delle specie finora descritte nell'ambito del genere *Diplodia*.

Le analisi filogenetiche hanno consentito di chiarire la sistematica di questi isolati. Entrambe le analisi, Bayesiana e ML, hanno prodotto alberi filogenetici con la stessa topologia, differenti solo nella ridistribuzione spaziale dei *clade* (Fig. 8).

Ciascun *sub-clade* identifica correttamente una specie nell'ambito del genere. I tre isolati ottenuti da lentisco in questa indagine (evidenziati in rosso) si inseriscono in un *sub-clade* con due isolati ottenuti da Frassino in Sardegna (Alves *et al.*, 2014). Pertanto, gli studi filogenetici hanno confermato che gli isolati da lentisco appartengono ad una nuova specie fungina, filogeneticamente vicina alle specie *Diplodia pseudoseriata* C.A. Pérez, Blanchette, Slippers & M.J. Wingf. e *Diplodia alatafructa* Mehl & Slippers recentemente descritte su Myrtaceae in Uruguay (Pérez *et al.*, 2010) la prima e su *Pterocarpus angolensis* DC. in Sud Africa (Mehl *et al.*, 2011) la seconda. È attualmente in corso la descrizione ufficiale di questa nuova specie.

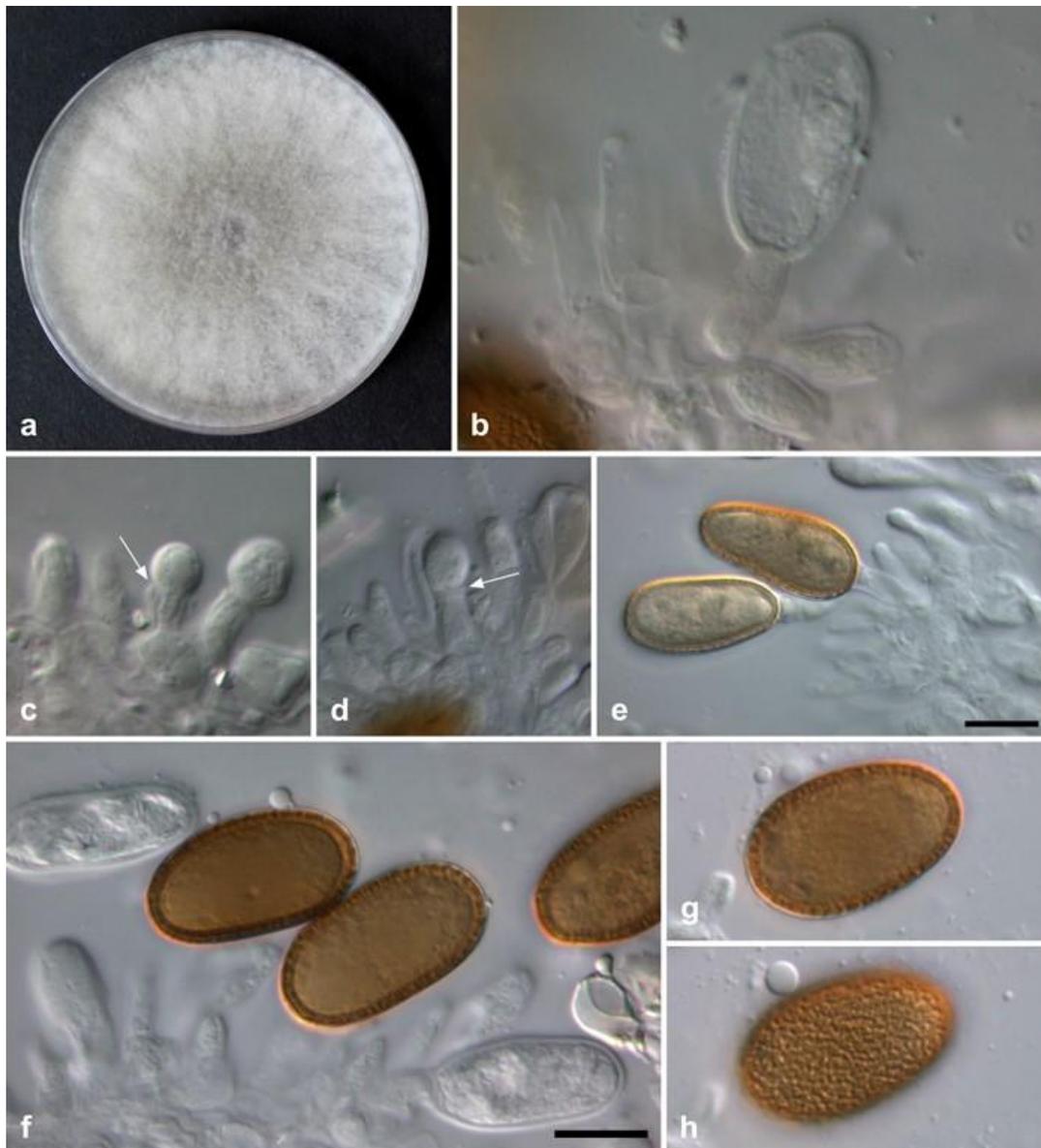


Figura 7. Morfologia della colonia di *Diplodia* sp. dopo 7 giorni di crescita a 25 °C su PDA (a); ontogenesi conidica e cellule conidiogene (a-e); conidi maturi (pigmentati) con in evidenza la parete finemente ornamentata (f); conidio maturo su due piani focali differenti (g-h). La barra della scala indica 10 μ m.

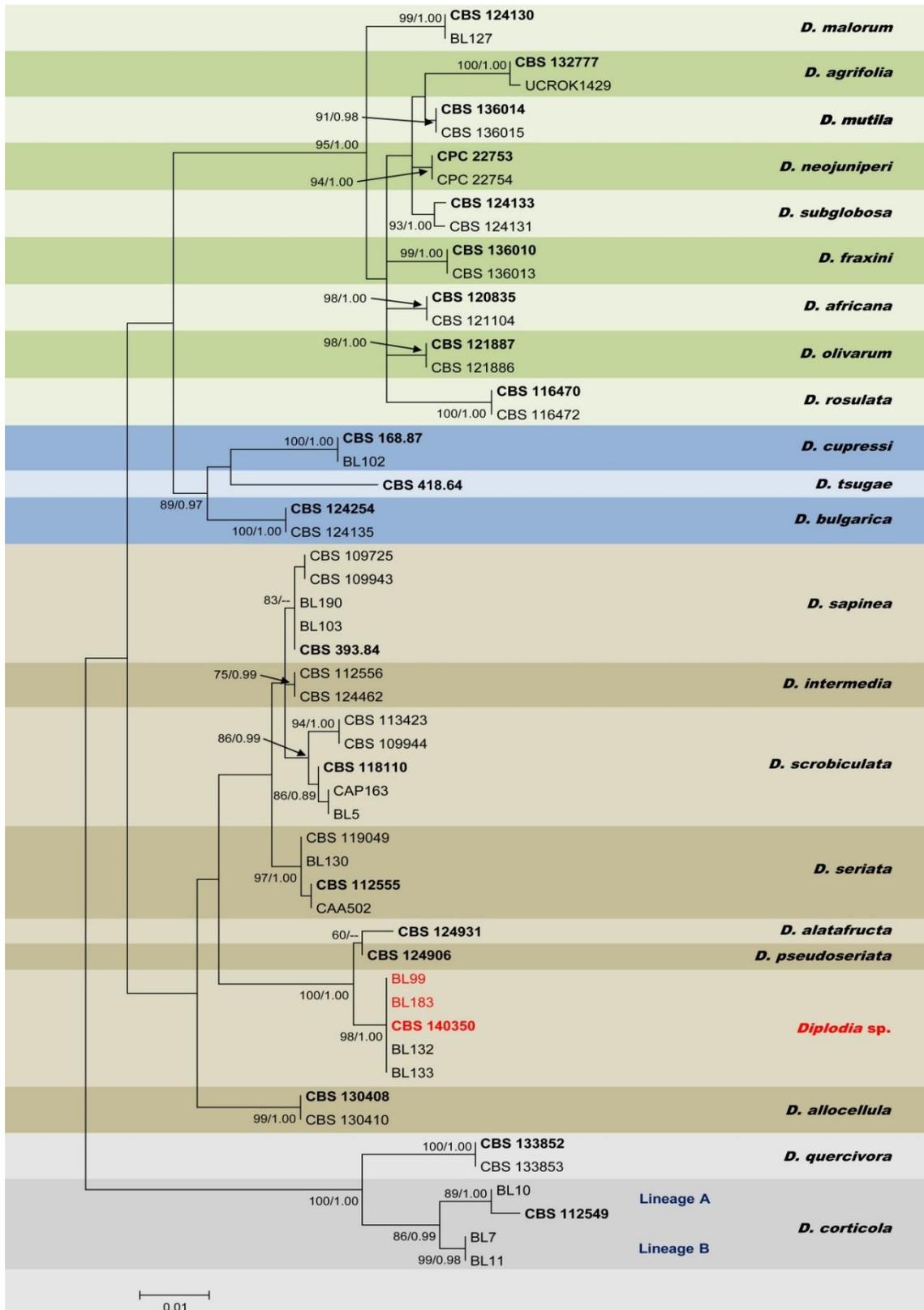


Figura 8. Albero di massima verosimiglianza risultante dall'analisi combinata delle sequenze ITS e EF1- α di tutte le specie del genere *Diplodia*. I valori di *Bootstrap* e quelli della probabilità a posteriori della analisi Bayesiana sono riportate nei nodi. Gli isolati tipo di ciascuna specie sono evidenziati in grassetto mentre gli isolati ottenuti da lentisco sono riportati in rosso. La barra della scala rappresenta il numero di sostituzioni per sito.

Dagli isolamenti effettuati dai campioni di suolo e radici prelevati in prossimità di piante sintomatiche di ginepro, lentisco, asparago e cisto nell'area di saggio 3 sono stati ottenuti diversi isolati di specie appartenenti al genere *Phytophthora*. Sulla base dei caratteri morfologici e delle analisi delle sequenze ITS sono state identificate 7 specie di *Phytophthora*, in particolare: *P. asparagi*, *P. bilorbang*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. gonapodyides*, *P. melonis* e *P. syringae*. Inoltre altre due specie isolate da ginepro e lentisco sono risultate nuove per la scienza; sulla base dei risultati ottenuti in questo studio sono state descritte come *P. crassamura* B. Scanu, A. Deidda & T. Jung sp. nov. e *P. ornamentata* B. Scanu, B. Linaldeddu & T. Jung sp. nov. (Scanu *et al.*, 2015).

Phytophthora crassamura è stata isolata da campioni di suolo e radici prelevati da 6 delle 10 piante di ginepro campionate e da 2 piante deperenti di lentisco. Tutti gli isolati formavano colonie stellate, 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 (Fig. 9 a-h). Le loro dimensioni erano di $60,3 \pm 6,0 \times 37,4 \pm 3,6 \mu\text{m}$ (media \pm deviazione standard), con rapporto lunghezza/larghezza di 1,6. Tutti gli isolati in coltura singola producevano oogoni sub-sferici con parete liscia (Fig. 9 i-m) e diametro medio $45,4 \pm 2,6 \mu\text{m}$, con oospore aploeritiche e con parete particolarmente spessa pari a $3,0 \pm 0,9 \mu\text{m}$. Gli anteridi erano sia paragini che anfigini (Fig. 9 i-m). La temperatura ottimale per la crescita è di 25°C, con massima compresa tra 32,5 e 35°C.

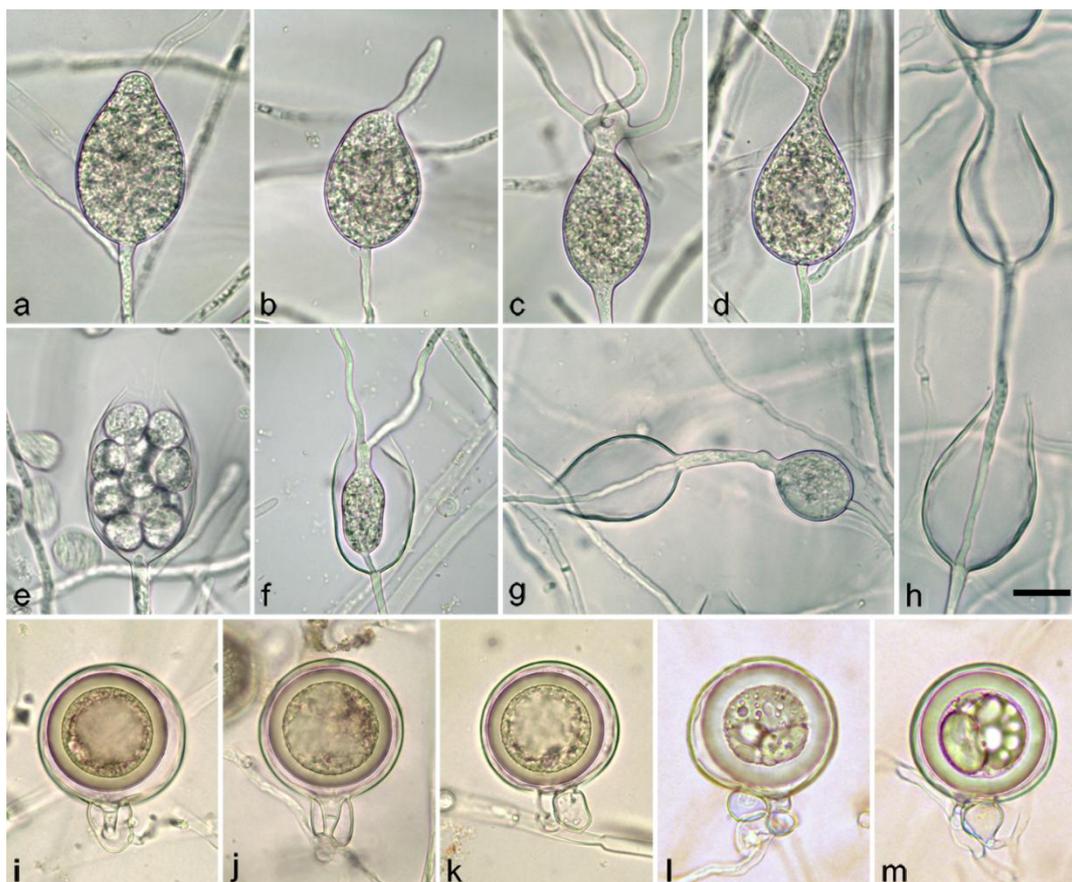


Figura 9. Principali caratteri morfologici di *Phytophthora crassamura*: sporangi non-papillati e persistenti (a-h); oogoni con parete liscia, oospore e anteridi (i-m). La barra della scala indica 20 μm .

Phytophthora ornamentata è stata isolata da campioni di suolo e radici prelevati da 4 piante sintomatiche di lentisco. Tutti gli isolati formavano colonie uniformi con micelio aereo cotonoso e margine regolare. Gli sporangi venivano prodotti su substrati liquidi; essi erano non-papillati, da limoniformi a ovoidali (Fig. 10 a-h). Le loro dimensioni erano di $59,5 \pm 6,2 \times 36,8 \pm 3,7 \mu\text{m}$ (media \pm deviazione standard), con rapporto lunghezza/larghezza di 1,6. Tutti gli isolati in coltura singola producevano oogoni sub-sferici con parete ornamentata (Fig. 10 i-m) e diametro medio $45,4 \pm 2,6 \mu\text{m}$, con oospore aploeritiche e con parete particolarmente spessa pari a $4,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$. Gli anteridi erano sia paragini che anfigini (Fig. 10 i-m). La temperatura ottimale per la crescita era di 25°C e la massima compresa tra $32,5$ e 35°C .

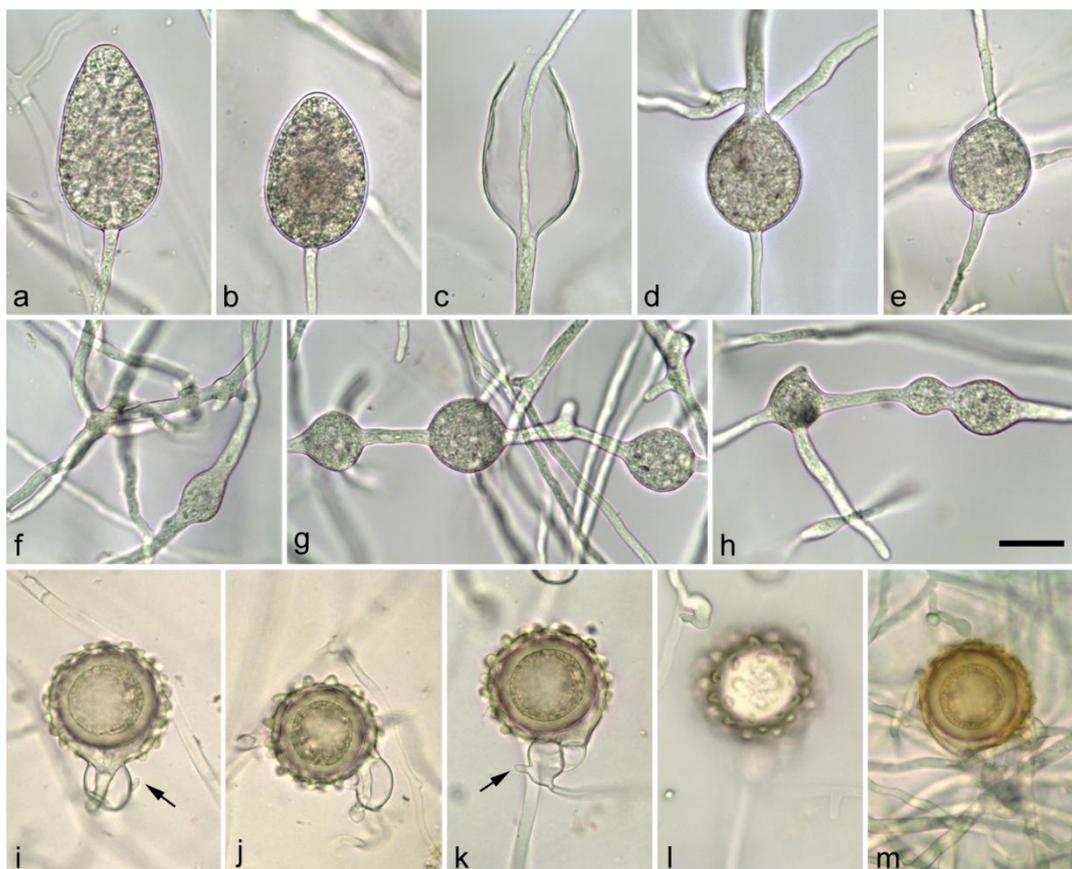


Figura 10. Principali caratteri morfologici di *Phytophthora ornamentata*: sporangi non-papillati e persistenti (a-h); oogoni con parete ornamentata, oospore e anteridi (i-m). La barra della scala indica $20 \mu\text{m}$.

Sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi filogenetiche entrambe le specie, *P. crassamura* e *P. ornamentata*, risiedono all'interno del *Clade 6, sub-clade II* (Fig. 11).

In generale, tutte le specie ad oggi rinvenute nel Parco Nazionale dell'Arcipelago di La Maddalena risiedono all'interno di 6 degli 11 *clade* evoluti riconosciuti nel genere *Phytophthora*. Il *Clade* maggiormente rappresentato è risultato il *clade 6*, uno dei raggruppamenti tassonomici attualmente maggiormente studiato dalla comunità scientifica del settore.

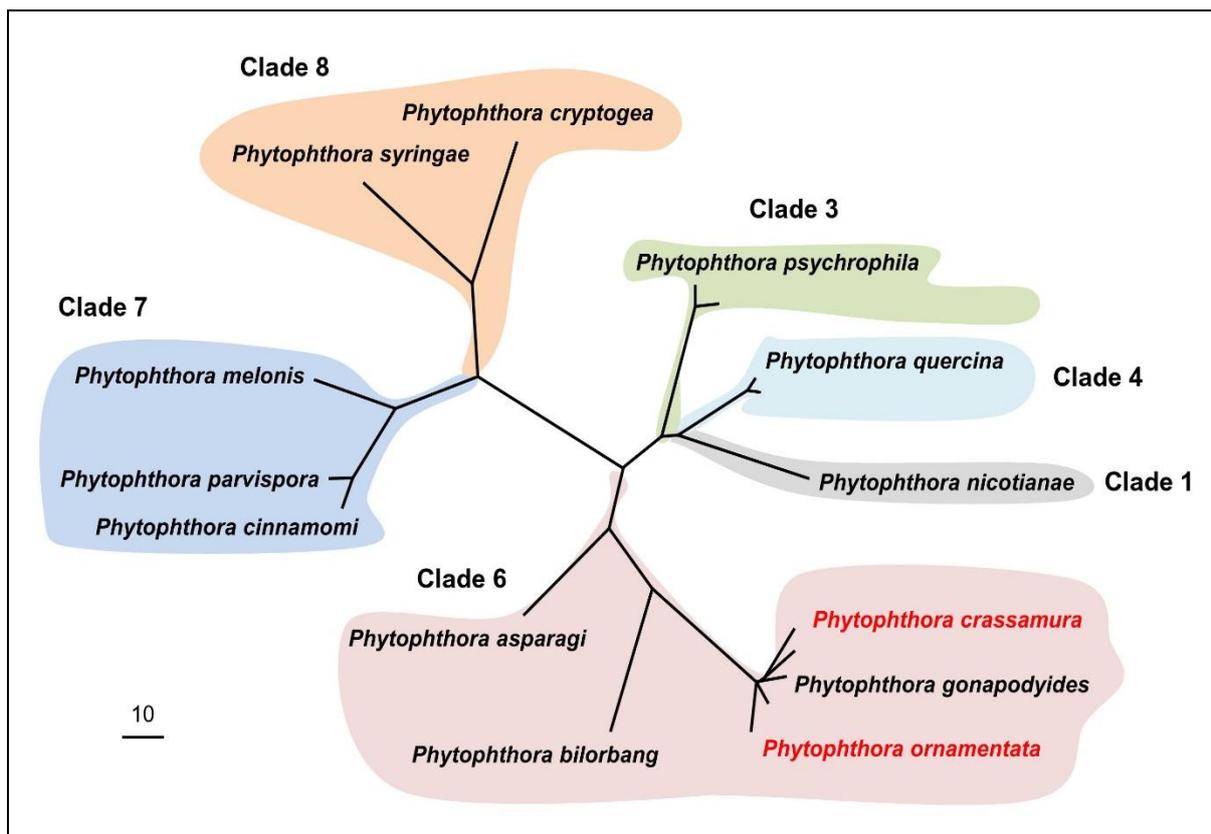


Figura 11. Filogenesi delle specie di *Phytophthora* rinvenute nell'isola di Caprera. I gruppi evidenziati con diverso colore rappresentano i *clade* evolutivi, mentre le specie marcate in rosso sono risultate nuove per la scienza.

Indagini nelle isole di Mortorio e Le Camere

Monitoraggio fitosanitario

La vegetazione dell'isola di Mortorio è costituita da specie di macchia con predominanza di lentisco, fillirea, ginestra, cisto, asparago; sporadicamente si riscontrano elementi di olivastro, alaterno e ginepro. Le piante di quest'ultima specie sia mature che di rinnovazione non manifestano evidenti sintomi di deperimento. Nel complesso la situazione dal punto di vista fitosanitario è apparsa buona (simile a quella rilevata nella parte non turistica dell'isola di Budelli); qualche criticità è stata osservata per le piante di lentisco e alaterno.

La vegetazione presente nelle isole Le Camere è costituita principalmente da specie di macchia bassa tra cui cisto, ginestra e fillirea, mentre sia il lentisco che il ginepro sono presenti solo in modo sporadico. Le piante di queste due ultime specie non presentavano disseccamenti a livello della chioma, o sintomi di marciume a livello di colletto o radici.

In un'area ristretta dell'isola di Mortorio è stata riscontrata la presenza di piante di lentisco e alaterno con sintomi di disseccamento dei rami e delle branche (Fig. 12). Le piante di lentisco mostravano gli stessi sintomi osservati nelle isole di Budelli e di Caprera precedentemente descritti. Le piante di alaterno mostravano un progressivo disseccamento dei germogli, dei rami e delle branche e la presenza di rami epicormici. Nei rami più giovani erano presenti estese aree necrotiche della lunghezza di alcuni centimetri. Le aree necrotiche spesso interessavano l'intera circonferenza dei rami. Le foglie sui rami sintomatici viravano rapidamente al giallo opaco ed infine al marrone scuro.



Figura 12. Principali quadri sintomatologici riscontrati su piante di lentisco e alaterno nell'isola di Mortorio: disseccamento dei germogli e dei rami su lentisco (a); disseccamento progressivo dei rami su alaterno (b).

I controlli fitosanitari condotti nell'area di saggio nell'isola di Mortorio hanno consentito di rilevare la presenza di 2 piante di alaterno deperienti e di 13 piante di lentisco di cui 5 asintomatiche e 8 con sintomi di malattia (Tab. 3).

Tabella 3. Numero di piante di lentisco e alaterno monitorate e campionate nell'area di saggio allestita nell'isola di Mortorio e relativo stato fitosanitario.

Area di saggio	Coordinate geografiche	Specie vegetale	Numero piante				Campionate
			Totale	Asintomatiche	Deperenti	Morte	
1	41°04'28"N 09°36'10"E	Alaterno	2	-	2	-	2
		Lentisco	13	5	8	-	6

Individuazione di microrganismi patogeni

Gli isolati fungini ottenuti in coltura pura a partire dai tessuti sintomatici delle piante di lentisco 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 olivarum* (1 isolato), *Neofusicoccum cryptoaustrale* (2 isolati) e *N. luteum* (1 isolato). La specie *N. cryptoaustrale* è stata isolata anche dai tessuti sintomatici delle 2 piante di alaterno.

Dai campioni di suolo e radici prelevati in prossimità di piante sintomatiche di ginepro fenicio e lentisco non è stata riscontrata la presenza di specie di *Phytophthora*.

Indagini nell'isola di Santa Maria

Monitoraggio fitosanitario

La vegetazione dell'isola è rappresentata principalmente da cisto, fillirea, ginepro, lentisco e olivastro. I principali problemi sanitari riguardano il ginepro. In più punti dell'isola (sia nelle aree a vocazione turistica sia in quelle più interne e remote) è stata riscontrata la presenza di focolai con un'elevata incidenza di piante morte (Fig. 13a, b). Tuttavia, sull'intera isola è stata anche osservata la presenza di piante giovani di ginepro (rinnovazione naturale) in buone condizioni sanitarie. Oltre al ginepro anche altre specie della macchia quali il lentisco presentavano sintomi di malattia seppure con un'incidenza inferiore (Fig. 13g-i).



Figura 13. Principali quadri sintomatologici riscontrati su piante di ginepro e lentisco nell'isola di Santa Maria: focolai di malattia con numerose piante di ginepro morte (a-b); particolare del disseccamento del getto apicale in pianta di ginepro (c), ginepro interessato dal disseccamento di intere branche (d); ginepro morto lungo strada (e); vari stadi di malattia su lentisco (g-i).

In totale sono state monitorate 32 piante di cui 27 di ginepro e 5 di lentisco (Tab. 4). Sotto il profilo sanitario la situazione è molto critica per il ginepro considerando che oltre il 66% delle piante erano disseccate. Delle 5 piante di lentisco, 3 erano sintomatiche e 2 asintomatiche.

Tabella 4. Numero di piante di ginepro e lentisco monitorate e campionate nell'aree di saggio allestita nell'isola di Santa Maria e relativo stato fitosanitario.

Area di saggio	Coordinate geografiche	Specie vegetale	Numero piante				
			Totale	Asintomatiche	Deperenti	Morte	Campionate
1	41°17'47"N 09°22'25"E	Ginepro	27	3	6	18	3
		Lentisco	5	2	3	-	3

Individuazione di microrganismi patogeni

Dagli isolamenti effettuati dai campioni di ginepro sono state ottenute esclusivamente colonie appartenenti alla specie *Diplodia africana*, mentre tutti i campioni di lentisco sono risultati positivi alla nuova specie afferente al genere *Diplodia* riscontrata a Caprera su lentisco.

Dai campioni di suolo e radici prelevati in prossimità di piante sintomatiche di ginepro fenicio e lentisco non è stata riscontrata la presenza di specie di *Phytophthora*.

Indagini nell'isola di Santo Stefano

Monitoraggio fitosanitario

Dai sopralluoghi effettuati nelle aree boschive dell'isola di Santo Stefano è emerso che una vasta superficie, popolata da leccio, quercia da sughero e da un folto sottobosco di specie della macchia mediterranea, è interessata da fenomeni di "deperimento" di gravità paragonabile a quella rilevata nell'isola di Caprera nel corso delle indagini effettuate nell'ambito della precedente convenzione. In particolare, le piante di quercia da sughero 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. 14). Le piante deperenti mostravano a livello del fusto e delle branche aree necrotiche depresse più o meno ampie e cancri spesso umidi per l'emissione di essudati nerastri. Osservate in sezione trasversale le necrosi in corrispondenza dei cancri si estendevano sino al midollo con una caratteristica forma a "V". Oltre agli alberi di quercia da sughero, erano interessate da disseccamenti e morie diffuse anche piante di asparago, eucalipto, leccio, olivo e ginepro (Fig. 14). Altresì numerose piante di alterno mostravano gravi sintomi di deperimento e numerosi cancri a livello delle branche.



Figura 14. Principali quadri sintomatologici riscontrati nell'isola di Santo Stefano: diffusa moria di piante di quercia da sughero (a); cancro depresso su fusto di quercia da sughero (b); essudato su branca di quercia da sughero e particolare della necrosi del legno in sezione trasversale (c-d); pianta di leccio morta (e); olivo con disseccamenti generalizzati della chioma (f); diffusa moria di piante di ginepro (g); pianta di alaterno con disseccamento progressivo di rami e branche (h); particolare della necrosi del legno in corrispondenza di un cancro su ramo di alaterno (i).

I risultati dei rilevamenti effettuati nelle 2 aree di saggio, sottolineano la gravità della situazione fitosanitaria delle formazioni a ginepro e a quercia da sughero dell'isola di Santo Stefano. Gravità dovuta sia all'elevato numero di piante con sintomi di deperimento presenti in entrambe le aree di saggio, sia all'intensità dei sintomi osservati. In totale sono state monitorate 21 piante di cui: solo 5 (20%) erano asintomatiche, tutte le altre erano deperienti e/o disseccate (Tab. 5).

Tabella 5. Numero di piante di ginepro e quercia da sughero monitorate nell'aree di saggio allestite nell'isola di Santo Stefano e relativo stato fitosanitario.

Area di saggio	Coordinate geografiche	Specie vegetale	Numero piante			
			Totale	Asintomatiche	Deperenti	Morte
1	41°11'39"N 09°24'09"E	Ginepro	14	4	5	5
2	41°11'47"N 09°24'32"E	Sughera	11	1	6	4

Individuazione di microrganismi patogeni

Dagli isolamenti effettuati dai tessuti legnosi e corticali prelevati da piante di sei specie legnose presenti nell'isola di Santo Stefano (sia all'interno che all'esterno dell'area di saggio), sono state ottenute complessivamente 18 colonie fungine appartenenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae*. Queste colonie sulla base dei caratteri morfologici e colturali sono state suddivise in 6 gruppi appartenenti rispettivamente alle specie: *Diplodia africana*, *D. corticola* A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque, *D. olivarum*, *Dothiorella* sp., *Neofusicoccum cryptoaustrale* e *N. luteum*.

In tabella 6 è riportata la relativa frequenza di ciascuna specie fungina sulle piante campionate. *Neofusicoccum cryptoaustrale* è risultata la specie maggiormente polifaga in quanto rinvenuta su ben 4 ospiti differenti. Allo stesso tempo è interessante rimarcare la presenza su alterno di una nuova specie afferente al genere *Dothiorella*, per la quale sono attualmente in corso delle indagini filogenetiche volte a stabilirne la reale posizione sistematica. Le indagini molecolari hanno consentito di caratterizzare gli isolati di *Diplodia corticola* e di stabilire che appartengono al *lineage* evolutivo A, recentemente caratterizzato da Linaldeddu *et al.* (2013).

Dagli isolamenti effettuati dai campioni di suolo e radici prelevati da piante sintomatiche sia all'interno che all'esterno delle aree di saggio nell'isola di Santo Stefano, sono stati ottenuti complessivamente 16 isolati appartenenti al genere *Phytophthora*. In seguito alle analisi dei caratteri morfologici e delle sequenze ITS tutti gli isolati sono stati identificati come *P. cinnamomi*. In particolare, questo patogeno è stato isolato da piante deperienti di leccio e sughera (6 isolati) presenti nella parte centrale dell'isola. Inoltre la sua presenza è stata riscontrata su alaterno (4 isolati), ginepro (3 isolati) e cisto (1 isolato) dislocate su quasi tutto il territorio dell'isola e su piante di eucalipto lungo la costa sud occidentale dell'isola.

Tabella 6. N° di piante campionate di ciascuna specie vegetale e relativi patogeni fungini associati.

Specie vegetale	N. piante campionate	Specie fungina					
		<i>D. africana</i>	<i>D. corticola</i>	<i>D. olivarum</i>	<i>Dothiorella</i> sp.	<i>N. cryptoaustrale</i>	<i>N. luteum</i>
Alaterno	7	-	-	2/7	2/7	1/7	1/7
Eucalipto	3	-	-	-	-	1/3	3/3
Ginepro	1	-	-	-	-	1/1	-
Lentisco	5	-	-	2/5	-	2/5	-
Olivo	1	1/1	-	-	-	-	-
Sughera	3	-	3/3	-	-	-	-

Indagini nell'isola di Spargi

Monitoraggio fitosanitario

Nella parte sud e centro orientale dell'isola è stata riscontrata la presenza diffusa di piante di ginepro con sintomi di disseccamento simili a quelli descritti a Caprera da Linaldeddu *et al.* (2011). Tuttavia, i sintomi rinvenuti nel corso del monitoraggio presentavano delle peculiarità, in quanto il disseccamento improvviso della parte apicale dei rami era generalizzato su tutta la chioma e non partiva da una sola branca per poi estendersi ai rami e al fusto in direzione basipeta come comunemente avviene per le infezioni da *Botryosphaeriaceae* (Fig. 15). Spesso queste piante presentavano estese aree necrotiche a livello delle grosse radici e del colletto (Fig. 15). Similmente a quanto osservato nell'isola di Caprera è stata riscontrata la presenza di numerose piante di ginepro disseccate, molto probabilmente in seguito ad attacchi epidemici progressivi.

Sintomi di disseccamento sono stati inoltre osservati anche su altre specie di piante tipiche della macchia mediterranea, tra cui lentisco, asparago e cisto (Fig. 16).



Figura 15. Principali sintomi su ginepro fenicio riscontrati nell'isola di Spargi, caratterizzati da un disseccamento dell'intera chioma spesso associato alla presenza di necrosi sottocorticali a livello del colletto e delle grosse radici (foto in basso a sinistra).



Figura 16. Sintomi riscontrati su specie della macchia mediterranea nell'isola di Spargi: disseccamento di rami in piante di lentisco (a) e asparago (b); clorosi e avvizzimento delle foglie su cisto (c).

I rilievi in campo hanno permesso di constatare che tutte le piante presenti all'interno dell'area di saggio erano deperienti e/o morte (Tab. 7).

Tabella 7. Numero di piante di ginepro monitorate e campionate nell'area di saggio allestita nell'isola di Spargi e relativo stato fitosanitario.

Area di saggio	Coordinate geografiche	Specie vegetale	Numero piante				
			Totale	Asintomatiche	Deperenti	Morte	Campionate
1	41°14'04"N 09°21'11"E	Ginepro	17	-	12	5	3
		Lentisco	2	-	2	-	2

Individuazione di microrganismi patogeni

Gli isolamenti in laboratorio effettuati sui campioni di ginepro hanno permesso di isolare dai tessuti necrotizzati della corteccia e del legno, una specie fungina afferente al genere *Cytospora*. I dati ottenuti dalle indagini morfologiche e molecolari non hanno consentito la sua identificazione a livello di specie, in quanto probabilmente anche questo fungo appartiene a una nuova specie non ancora descritta. Dai due campioni di lentisco, invece, è stata isolata la specie *D. olivarum*.

Dagli isolamenti effettuati dai campioni di suolo e radici prelevati da piante sintomatiche all'interno dell'area di saggio nell'isola di Spargi, sono stati ottenuti complessivamente 10 isolati appartenenti al genere *Phytophthora*. Sulla base delle analisi dei caratteri morfologici, fisiologici e molecolari gli isolati sono stati identificati come *P. asparagi* e *P. bilorbang*. La specie rinvenuta con maggiore frequenza è risultata *P. asparagi* isolata da piante sintomatiche sia di ginepro che asparago. Sebbene le sequenze ITS mostravano una similarità del 100% con quelle della coltura tipo di *P. asparagi*, morfologicamente gli isolati ottenuti in questo studio differiscono per la presenza di clamidospore, la prevalenza di anteridi paragoni e una temperatura massima di crescita 35°C, piuttosto che 30°C come riportato nella descrizione originale di *P. asparagi* (Saude *et al.*, 2008).

Phytophthora bilorbang è stata rinvenuta in due piante deperenti di lentisco campionate all'interno dell'area di saggio.

Saggi di patogenicità

Patogeni della chioma

I test di patogenicità sono stati condotti per tutte le nuove associazioni ospite/patogeno rinvenute su lentisco. Quaranta giorni dopo l'inoculazione, tutte le branche di lentisco infettate in bosco con gli isolati di *Diplodia olivarum*, *Diplodia* sp., *Neofusicoccum cryptoaustrale* e *N. luteum* mostravano in prossimità del punto di inoculo evidenti cancri e lesioni necrotiche nei tessuti corticali e legnosi. Le lesioni necrotiche causate da *N. cryptoaustrale* e *Diplodia* sp. progressivamente circondavano l'intera branca causando il completo disseccamento della porzione distale della stessa. Entrambi i patogeni hanno riprodotto i sintomi osservati in natura. Le sei branche testimoni, inoculate solo con un frammento di PDA sterile, sono rimaste asintomatiche (Fig. 17).

Tra le quattro specie saggiate sono emerse differenze statisticamente significative in relazione alla lunghezza delle lesioni necrotiche causate sulle branche di lentisco. In particolare, l'isolato di *N. cryptoaustrale* ha causato le necrosi più estese, mentre non sono emerse differenze significative tra gli isolati delle altre 3 specie fungine (Fig. 18). Tutti e quattro i patogeni inoculati sono stati re-isolati con successo dai tessuti sintomatici (legno e corteccia) di tutte le branche saggiate, completando così i postulati di Koch.

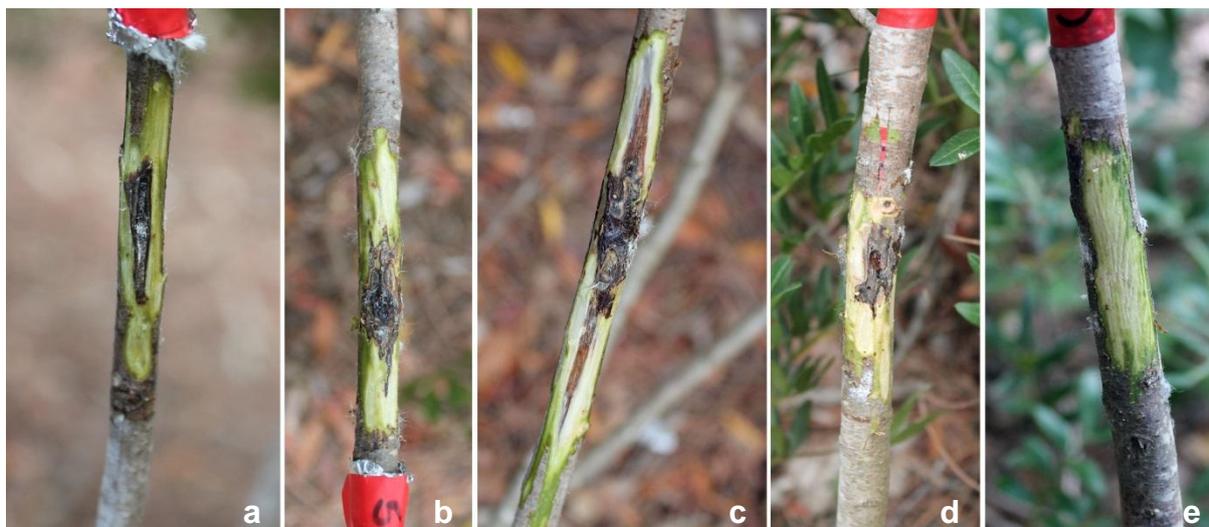


Figura 17. Particolare delle necrosi sottocorticali causate da *Diplodia olivarum* (a), *Diplodia* sp. (b), *Neofusicoccum cryptoaustrale* (c) e *N. luteum* (d), 40 giorni dopo l'inoculazione su branche di piante di lentisco. Branca asintomatica utilizzata come controllo (e).

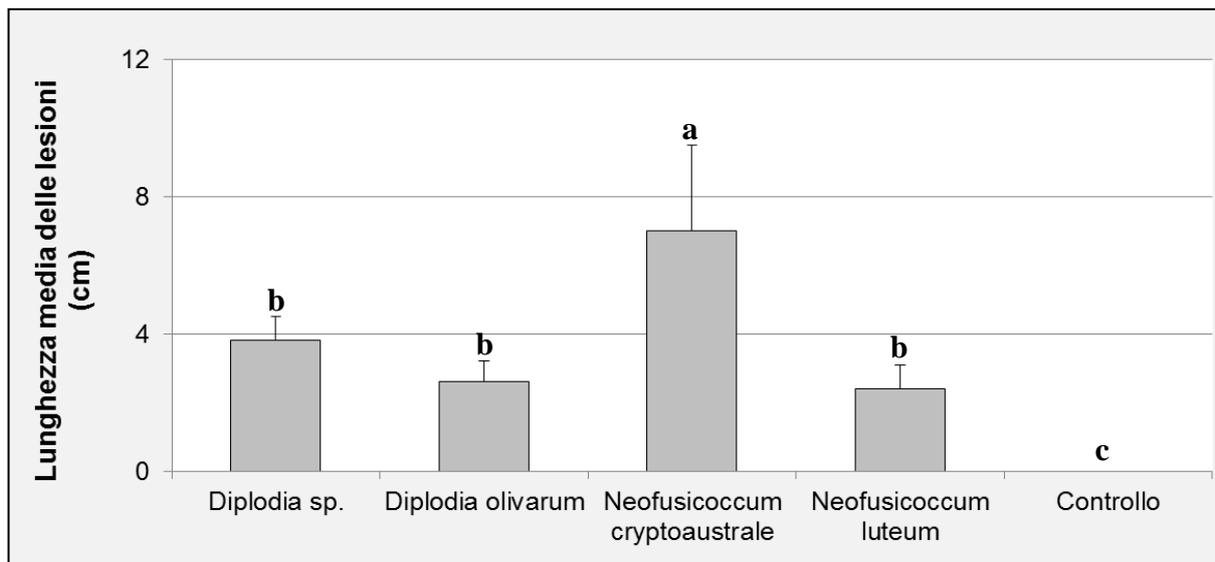


Figura 18. Lunghezza media delle lesioni necrotiche causate da *Diplodia* sp., *D. olivarum*, *Neofusicoccum cryptoaustrale* e *N. luteum* su branche di lentisco. Le barre rappresentano la deviazione standard. Istogrammi contrassegnati da lettere differenti differiscono in modo statisticamente significativo al test di confronto multiplo LSD per ($P=0,05$).

Patogeni radicali

Sulla base del grado di mortalità osservato nei semenzali di ginepro fenicio 4 mesi dopo l'inoculazione, *P. asparagi* and *P. bilorbang* sono risultate le specie più aggressive in grado di provocare la morte rispettivamente del 50% e del 37,5% dei semenzali inoculati. Altre specie come *P. cinnamomi* e *P. syringae* hanno allo stesso modo causato la morte dei semenzali, ma con una percentuale di mortalità inferiore (25%). Le restanti specie hanno causato solo sintomi di avvizzimento e clorosi. Nei saggi di patogenicità effettuati su semenzali di lentisco, quasi tutte le specie di *Phytophthora* utilizzate hanno causato la morte delle piante 4 mesi dopo l'inoculazione. La specie più aggressiva è risultata *P. cinnamomi* (100% dei semenzali morti), confermando il suo ruolo primario anche su specie della macchia mediterranea. Un grado di mortalità delle piante superiore al 50% è stato riscontrato nei semenzali inoculati con *P. asparagi*, *P. crassamura*, *P. bilorbang*, *P. melonis* e *P. ornamentata*. Le piante testimoni non hanno manifestato sintomi di malattia.

Tutte le specie di *Phytophthora* saggiate hanno causato una riduzione significativa della lunghezza totale dell'apparato radicale nei semenzali di ginepro e lentisco (Fig. 19). Su ginepro la lunghezza totale delle radici dei semenzali inoculati con *P. asparagi* differiva in modo statisticamente significativo rispetto alla lunghezza delle radici dei semenzali inoculati con le altre specie. Su lentisco le specie più aggressive sono risultate *P. cinnamomi*, *P. asparagi* e *P. ornamentata* con una riduzione della lunghezza totale delle radici superiore al 60%. Tutte le specie di *Phytophthora* saggiate sono state re-isolate sia dal suolo sia dalle radici necrotiche.

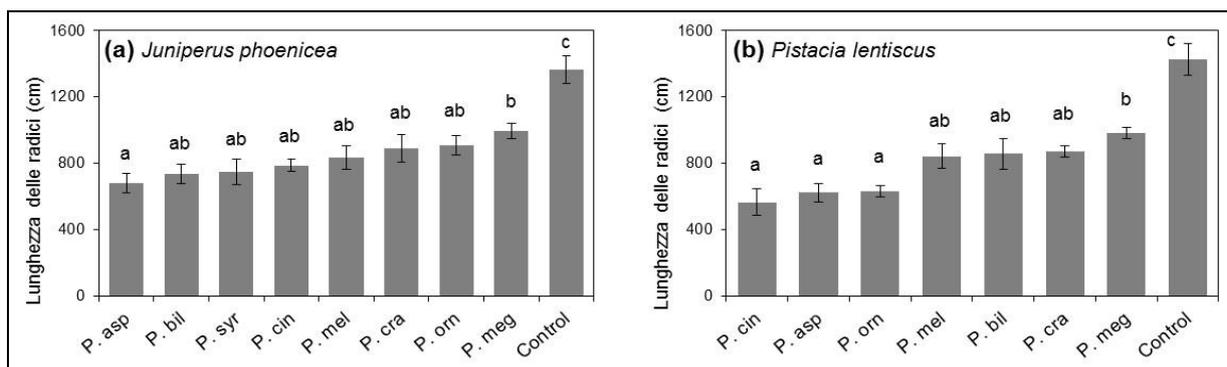


Figura 19. Lunghezza totale media delle radici di ginepro (a) e lentisco (b) 4 mesi dopo l'inoculazione con le specie di *Phytophthora* (P.) ottenute in questo studio (asp=asparagi, bil=bilorbang, syr=syringae, cin=cinnamomi, mel=melonis, cra=crassamura, orn=ornamentata, meg=megasperma, Control=controllo). Le lettere diverse indicano una differenza tra le tesi statisticamente significativa al test di Tukey (P = 0,05). La barra verticale rappresenta l'errore standard.

Bonifica fitosanitaria

Prove di lotta contro gli attacchi di patogeni della chioma

Tenendo conto che la lotta contro le malattie complesse del legno come quelle causate da *Botryosphaeriaceae*, caratterizzate da andamento cronico, è molto difficile da attuare, le operazioni di risanamento condotte nella primavera del 2014, attraverso il taglio raso di tutti gli alberi infetti sembrano, al momento, aver prodotto dei risultati incoraggianti.

Nello specifico, un anno e mezzo dopo l'intervento ben 157 delle 159 piante trattate hanno emesso nuovi polloni (Tab. 8 e Fig. 20). Centotrentacinque delle 157 ceppaie vitali mostravano polloni più o meno vigorosi e asintomatici, mentre 12 presentavano un numero variabile di polloni con sintomi di disseccamento e necrosi del legno. Su 9 ceppaie è stata rilevata la presenza di danni da insetti sulle foglie e/o di animali selvatici sulla corteccia dei polloni. Solo una ceppaia è morta dopo l'emissione dei polloni. I sintomi (morte repentina) rilevati su questa ceppaia e l'assenza di nuovi getti suggeriscono un probabile attacco all'apparato radicale da parte di patogeni ad *habitus* terricolo.

Le indagini diagnostiche effettuate sui campioni prelevati dalle ceppaie sintomatiche hanno consentito di accertare che l'agente patogeno responsabile delle infezioni è *Diplodia corticola*. I rilievi effettuati durante il periodo sperimentale hanno anche messo in evidenza che le infezioni di questo patogeno sui nuovi polloni si verificano principalmente alla fine della primavera.

Tabella 8. Numero di piante di leccio oggetto di intervento e campionate nell'area sperimentale a Caprera e stato sanitario delle relative ceppaie.

Sito	Coordinate geografiche	Specie vegetale	Numero ceppaie						
			Totale	Attive	Asintomatiche	Infette*	Danni da insetti°	Morte	Campionate
8	41°12'23"N 09°28'11"E	Leccio	159	157	135	12	9	1	12



Figura 20. Ceppaie di leccio oggetto di interventi di bonifica fitosanitaria: non vitale senza polloni (a); vitale con numerosi polloni asintomatici (b); vitale con polloni sia asintomatici sia sintomatici (c); vitale con danni da insetti (d); non vitale con sintomi di morte repentina dei polloni (e).

Prove di lotta contro gli attacchi di patogeni radicali.

Dalle indagini effettuate nell'area pilota per valutare lo stato sanitario delle piante dopo 10 mesi dai trattamenti è emerso un generale peggioramento delle condizioni sanitarie delle piante situate nel plot 3 di controllo (Fig. 21).

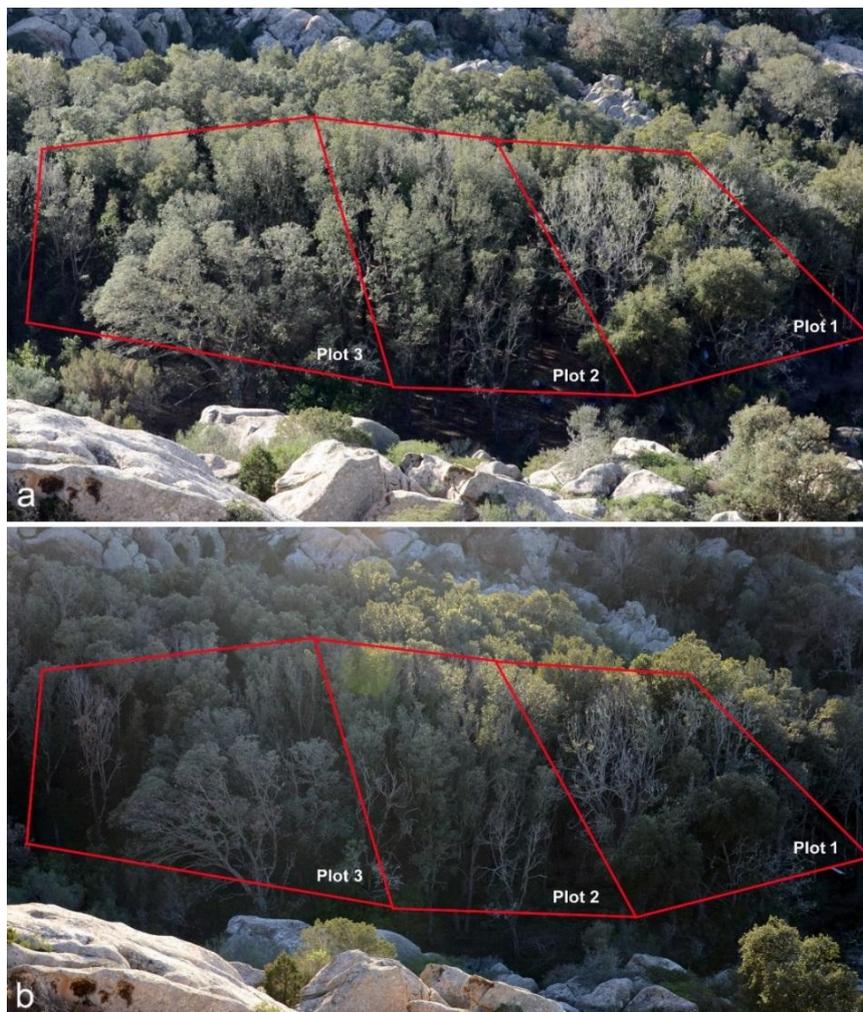


Figura 21. Aspetto della vegetazione nell'area pilota a gennaio 2015 prima dell'esecuzione dei trattamenti (a) e 11 mesi dopo (b). Plot soggetti a trattamenti con fosfito di potassio mediante aspersione al terreno (Plot 1) e per via endoterapica (Plot 2). Nel plot 3 non sono stati effettuati trattamenti (controllo).

Per contro nelle piante sottoposte a trattamenti endoterapici è stato riscontrato un miglioramento dello stato vegetativo, con riduzione della microfillia, ma soprattutto con produzione di chioma epicormica e ricaccio di nuovi getti a livello del colletto e lungo il fusto (Fig. 22). Più in particolare, in entrambi i plot soggetti a trattamenti con fosfito di potassio si è avuto un incremento del numero di piante ricomprese nelle classi 0 e 1 di malattia, mentre nel plot di controllo il numero delle piante all'interno di queste due classi si è ridotto (Tab. 9). Peraltro, nella classe 2 di malattia si è avuta una riduzione sensibile del numero di piante nei plot 1 e 2, mentre nel plot 3 il numero di piante è aumentato. Infine nelle classi di malattia superiori (3 e 4), in tutti i plot il numero di piante è rimasto invariato o è leggermente aumentato, anche in seguito alla morte di alcune piante, in particolare nel plot di controllo e in quello in cui sono stati effettuati i trattamenti al terreno.



Figura 22. Principali sintomi riscontrati sulle piante di leccio all'interno dell'area pilota, 10 mesi dopo i primi trattamenti con fosfito di potassio: abbondante emissione di getti epicormici su branche e rami in piante del plot 2 (a); albero in uno stadio avanzato di deperimento nel plot 1 (b); emissione di nuovi getti a livello del colletto e sul fusto di una pianta soggetta a trattamenti per via endoterapica (c); nuovi getti disseccati riscontrati su piante presenti all'interno del plot 3 (d, e).

Tabella 9. Distribuzione delle piante per classi di malattia (0-4) a gennaio e novembre 2015 all'interno dei plot sottoposti a trattamenti con fosfito di potassio mediante aspersione al terreno (P1) e per via endoterapica (P2) e nel plot (P3) in cui non sono stati effettuati trattamenti (controllo).

Periodo di valutazione	Classe di malattia														
	0			1			2			3			4		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
01/2015	1	2	11	28	17	27	16	21	8	3	6	5	1	1	3
11/2015	1	4	10	33	22	20	9	16	12	3	4	6	3	1	6

Va comunque sottolineato che le variazioni del numero di piante nelle classi 3 e 4 rilevate da gennaio a novembre 2015 nei plot in cui sono stati effettuati i trattamenti (Plot 1 e 2), sono probabilmente legate al fatto che le piante, trovandosi in uno stato di deperimento avanzato, hanno assorbito con difficoltà il fosfito di potassio, in particolare per via endoterapica.

Calcolo del grado di mortalità. Il grado di mortalità è risultato più elevato ($M=0,09$) nel plot 3 di controllo dove non sono stati effettuati trattamenti. Sia nel plot 1, trattato per aspersione del terreno, che nel plot 2 trattato per via endoterapica, è stato riscontrato un grado di mortalità inferiore, rispettivamente di 0,06 e 0,04. Tuttavia, e sebbene sia trascorso quasi un anno dal trattamento, appare ancora prematura una valutazione definitiva della sua efficacia in base a questo parametro.

Biosaggi su rami di leccio. In tutti i rametti inoculati con *P. cinnamomi* sono state osservate lesioni più o meno estese in corrispondenza del punto di inoculazione, con differenze anche statisticamente significative (Fig. 23). In particolare, lesioni mediamente superiori a 10 cm sono state riscontrate nei rametti prelevati da piante non trattate con fosfito di potassio (Plot 3), mentre lesioni di lunghezza inferiore sono state rilevate nei rametti prelevati da piante trattate per aspersione del suolo (Plot 1) e per via endoterapica (Plot 2); queste ultime in modo statisticamente significativo rispetto alle lunghezze delle lesioni rilevate in tutti gli altri rametti. *Phytophthora cinnamomi* è stata sempre re-isolata dal margine delle lesioni sviluppatesi in tutti i rametti inoculati.

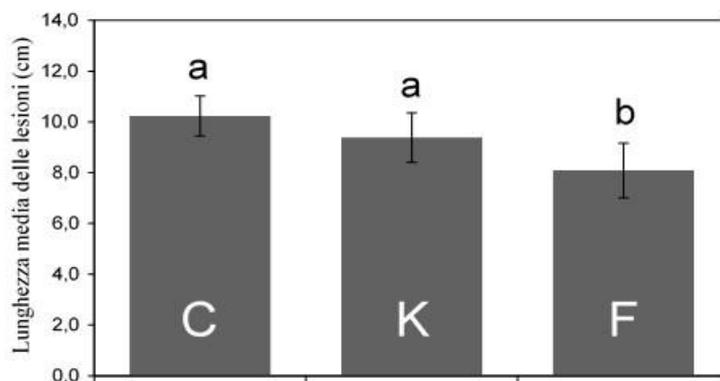


Figura 23. Lunghezza media (cm) delle lesioni causate da *Phytophthora cinnamomi* su rami prelevati da piante di leccio non trattate (C) e trattate con fosfito di potassio per aspersione al suolo (K) e per via endoterapica (F). Istogrammi con lettere uguali non differiscono in modo statisticamente significativo al test LSD per $P \leq 0,05$. La barra verticale rappresenta la deviazione standard.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Analisi dei risultati

Monitoraggio fitosanitario delle isole

Le ricerche condotte nell'ambito della convenzione in oggetto hanno permesso di ampliare le conoscenze sui fenomeni di deperimento riscontrati nei popolamenti di ginepro fenicio, lentisco e altre specie legnose della macchia mediterranea che vegetano nelle isole dell'Arcipelago di La Maddalena, e di identificare e caratterizzare i patogeni coinvolti, completando gli obiettivi prefissati.

L'attività di monitoraggio ha consentito di individuare l'esistenza di gravi criticità legate ad attacchi di microrganismi patogeni sia della chioma, afferenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae*, sia radicali appartenenti al genere *Phytophthora*. Si tratta di patogeni che, molto probabilmente, sono stati introdotti e/o hanno trovato le condizioni ottimali di sviluppo in periodi differenti dato che nelle diverse aree boschive la malattia si riscontra in stadi evolutivi differenti.

Nel complesso è stata riscontrata una minore incidenza di fitopatie nelle isole di Budelli, Mortorio e Spargi, sebbene nelle aree a maggior flusso turistico di queste ultime due isole sia stata rilevata un'elevata presenza di piante malate e morte, soprattutto di ginepro. Diversamente, nell'isola di Santa Maria è stata osservata una presenza diffusa di focolai (*hot-spot*) di malattia. Questi focolai, seppure di estensione limitata, comprendono un elevato numero di piante morte e sono distribuiti *at random* sia nelle aree a vocazione turistica, sia in quelle più interne e meno accessibili. Essi costituiscono di sicuro dei pericolosi serbatoi di inoculo dei patogeni infettivi rinvenuti nel corso delle indagini.

Tra le isole monitorate, Santo Stefano è senza dubbio quella che presenta le aree boschive con i maggiori problemi sotto il profilo sanitario. Ad evidenziare la complessità eziologica delle malattie presenti in quest'isola è emblematico il caso dell'alternò sul quale sono state rinvenute ben 4 nuove associazioni ospite/patogeno: alternò/*Diplodia olivarum*; alaternò/*Dothiorella* sp.; alaternò/*Neofusicoccum cryptoaustrale* e alaternò/*N. luteum*. Degno di nota è anche il rinvenimento su olivo del fungo *Diplodia africana*, finora riscontrato patogeno solo su ginepro. Quest'ultimo fatto suggerisce che alcune specie forestali possono fungere da "ponte" per i patogeni esotici ed invasivi, favorendo le loro infezioni anche su piante di interesse agrario.

Dal punto di vista ecologico, è particolarmente grave la situazione sanitaria dei popolamenti di quercia da sughero. Gli attacchi di *Diplodia corticola* alle piante di sughera si sono moltiplicati dopo l'estrazione del sughero – come dimostrano i numerosi cancri sul fusto delle piante sviluppatasi proprio in seguito alla decortica delle stesse – hanno assunto ormai una dimensione epidemica, e rischiano concretamente di causare l'estinzione di questa specie forestale nell'isola di Santo Stefano.

Sull'isola di Caprera, ma anche in alcune aree delle isole di Santa Maria, Santo Stefano e Spargi, sono state riscontrate numerose piante di ginepro completamente disseccate con danni evidenti anche a livello radicale. Sebbene in questi casi non sia stato possibile formulare diagnosi certe, è molto probabile che queste piante siano morte in seguito ad attacchi pregressi di patogeni ad *habitus* terricolo. Eventi simili sono stati segnalati più di recente, nell'autunno 2015, dall'Ente Parco sia nella parte nord-orientale dell'isola di Caprera in prossimità di Cala Coticcio, sia nella parte meridionale in località Due Mari. Anche in questi casi le piante di ginepro apparivano disseccate e presentavano lesioni necrotiche a livello delle grosse radici e del colletto. Un piccolo focolaio infettivo con gli stessi quadri sintomatologici è stato rinvenuto nella parte nord-occidentale dell'isola di La Maddalena (isola che, tra l'altro, non è

stata mai oggetto di monitoraggio fitosanitario). Attualmente sono in corso le analisi dei campioni prelevati a Caprera per stabilire le cause di questi fenomeni.

L'attività di monitoraggio effettuata a Caprera ha inoltre consentito di rilevare lungo le strade principali dell'isola la presenza di diversi alberi adulti di pino e di leccio con problemi strutturali, spesso aggravati da processi cariogeni in atto che ne pregiudicano la stabilità meccanica e aumentano il rischio di schianti improvvisi di branche o dell'intera pianta. Considerata l'elevata frequentazione dell'isola da parte di persone e mezzi è appena il caso di sottolineare l'importanza di prevedere nel breve termine un'analisi accurata delle condizioni di stabilità di questi alberi e stabilire i conseguenti interventi necessari a garantire condizioni di sicurezza nella viabilità pubblica dell'isola.

In relazione ai disseccamenti e morie delle piante di lentisco riscontrati in tutte le isole dell'Arcipelago si rileva che la loro eziologia è molto complessa, considerando che vi sono associate ben 4 specie di *Botryosphaeriaceae*: *Diplodia olivarum*, *Diplodia* sp., *Neofusicoccum cryptoaustrale* e *N. luteum*. Tutte queste specie fungine vengono qui segnalate per la prima volta come patogeni del lentisco, sebbene l'associazione diretta di ognuna di esse con la malattia non sia ancora ben chiara. *Diplodia olivarum* è risultata la specie più diffusa, mentre *Diplodia* sp. quella isolata con maggiore frequenza. Nei saggi di patogenicità tutte e 4 le specie hanno causato la comparsa di cancri e necrosi sulle branche; *Diplodia* sp. e soprattutto *N. cryptoaustrale* hanno riprodotto anche i sintomi fogliari osservati in bosco, presumibilmente dovuti alla produzione fitotossine. *Neofusicoccum cryptoaustrale* è un patogeno polifago originariamente descritto nell'emisfero australe su piante native dell'Australia. Di recente è stato segnalato come un patogeno invasivo su numerose specie vegetali di interesse sia agrario sia forestale in varie parti del pianeta. Nell'isola di Caprera è stato rinvenuto patogeno su piante di ginepro; suoi isolati hanno dimostrato di produrre numerosi composti fitotossici (Andolfi *et al.*, 2012).

I risultati delle analisi effettuate sui campioni di suolo e radici prelevati da piante sintomatiche di ginepro, lentisco e altre specie della macchia mediterranea (cisto, asparago), hanno messo in evidenza la presenza di specie di *Phytophthora* in 3 isole (Caprera, Santo Stefano e Spargi) delle 7 monitorate (Fig. 24). Più in dettaglio, nell'isola di Caprera nuove segnalazioni di specie di *Phytophthora* sono state effettuate nella parte sud-occidentale dell'isola, prevalentemente su leccio e ginepro ma anche su diverse altre specie della macchia mediterranea. Inoltre, come detto, sono attualmente in corso le analisi dei campioni prelevati da piante di ginepro nelle località di Cala Coticcio (41°13'N, 9°28'E) e Due Mari (41°10'N, 9°27'E), dove almeno finora non era stata mai segnalata la presenza di questi patogeni. Nell'isola di Santo Stefano, specie di *Phytophthora* sono state rinvenute in tutte le aree di saggio e su diversi ospiti. In particolare, sono state isolate da piante deperienti di quercia da sughero e leccio presenti nella parte centrale dell'isola (41°11'N, 9°24'E). Inoltre, la loro presenza è stata riscontrata anche su piante sintomatiche di alaterno, cisto e ginepro dislocate su quasi tutto il territorio dell'isola e su piante di eucalipto lungo la costa sud-occidentale (41°13'N, 9°23'E). Infine, nell'isola di Spargi la presenza di questi patogeni è stata rinvenuta nei ginepreti dislocati nella parte sud-orientale dell'isola (41°13'N, 9°21'E).



Figura 24. Rappresentazione geografica delle isole dell’Arcipelago di La Maddalena: in rosso quelle dove è stata riscontrata la presenza di specie di *Phytophthora*, in verde quelle esenti da infezioni di questi patogeni.

In merito agli isolati di *Phytophthora* ottenuti dalle piante deperienti della macchia mediterranea, le indagini svolte in laboratorio hanno consentito di identificare 9 specie. Alcune di queste, tra le quali *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. gonapodyides* e *P. syringae*, sono state già riscontrate in ambienti forestali e naturali in Europa, altre, come *P. asparagi*, *P. bilorbang* e *P. melonis*, sono invece considerate rare o addirittura sconosciute in Europa, e infine due specie sono risultate nuove per la scienza per cui sono state descritte nell’ambito di questi studi come *P. crassamura* e *P. ornamentata*.

Tra tutte le specie di *Phytophthora* riscontrate, *P. asparagi* è risultata una delle più diffuse: è stata isolata da asparago, ginepro e lentisco. I saggi di patogenicità hanno evidenziato la sua elevata aggressività sia su ginepro che lentisco. Sulla base di quanto riportato in letteratura questa specie è stata originariamente descritta come agente del marcime delle radici e dei germogli su *Asparagus officinalis* in Michigan, USA (Saude *et al.*, 2008). Successivamente *P. asparagi* è stata riportata su diversi generi della famiglia delle *Agavaceae* (*Agave*, *Yucca* e *Furcraea*) e su *Aloe* sp. presso il *Royal Botanic Gardens* di Melbourne, in Australia (Cunnington *et al.*, 2005). In Italia, *P. asparagi* è stata segnalata su piante di *Agave attenuata* coltivate in un vivaio in Sicilia (Cacciola *et al.*, 2006).

Di particolare rilievo è il rinvenimento di *P. bilorbang* su ginepro e lentisco, ma anche lungo i corsi d’acqua e negli stagni presenti nell’isola di Caprera. Quest’ultimo fatto conferma quanto riportato in letteratura circa la capacità di questa specie di comportarsi sia da saprotrofo su materiale vegetale inerte in ambienti acquatici (Reeser *et al.*, 2011), sia da patogeno opportunisto su ospiti vegetali. *Phytophthora bilorbang* è una specie di recente descrizione, riportata patogena su *Rubus anglocandicans* in Australia (Aghighi *et al.*, 2012).

Analogamente a *P. asparagi*, *P. melonis* è stata rinvenuta per la prima volta in ambiente naturale e su ginepro. Precedentemente questa specie è stata associata solo ad attacchi su melone in campo agrario in Asia (Ho *et al.*, 2007); il suo rinvenimento nell’isola di Caprera rappresenta una nuova segnalazione per l’Europa. *Phytophthora melonis* è una specie

particolarmente termofila e in grado di sopravvivere a periodi prolungati di siccità attraverso la formazione di oospore caratterizzate da una parete spessa, difficilmente degradabile. Sebbene la sua frequenza di isolamento sia risultata inferiore a quella delle altre specie, i saggi di patogenicità hanno evidenziato che può essere coinvolta nell'eziologia del deperimento del ginepro.

Tra le altre specie rinvenute, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea* e *P. gonapodyides* sono state riscontrate già in precedenza nell'isola di Caprera associate al deperimento di piante di leccio (Linaldeddu *et al.*, 2014). *Phytophthora cinnamomi* è una specie a distribuzione cosmopolita ed è nota per essere ritenuta la principale causa della distruzione dei boschi di querce penisola iberica (Brasier *et al.*, 1993) e in grado di destabilizzare interi ecosistemi forestali in Australia (Dunstan *et al.*, 2010). In Sardegna le segnalazioni di questo patogeno sono aumentate negli ultimi anni sia in ecosistemi forestali naturali, sia in vivaio, parchi e giardini (Scanu *et al.*, 2013). Oltre che sull'isola di Caprera, *P. cinnamomi* è stata frequentemente rinvenuta nei campioni di suolo e radici prelevati da piante deperienti di alaterno, eucalipto, leccio e sughera nell'isola di Santo Stefano. I saggi di patogenicità hanno evidenziato una riduzione significativa dell'apparato radicale nei semenzali di ginepro e lentisco inoculati con *P. cinnamomi*, confermando l'elevata polifagia di questa specie e soprattutto evidenziando come questa specie possa rappresentare una potenziale minaccia anche per gli ecosistemi a macchia mediterranea. Le altre due specie, *P. cryptogea* e *P. gonapodyides*, sono state rinvenute nei corsi d'acqua e stagni presenti nell'isola di Caprera. Sebbene queste specie siano state già riscontrate in ecosistemi forestali mediterranei (Pérez-Sierra *et al.*, 2013), il loro rinvenimento in questo studio rappresenta la prima segnalazione su specie della macchia mediterranea.

Infine, *P. syringae* è stata isolata da due piante di ginepro nell'isola di Caprera. Questa specie è stata già riportata in ambienti forestali in Italia, apparentemente senza causare danni di rilievo (Vettraino *et al.*, 2002). Recentemente, *P. syringae* è stata associata ai fenomeni di deperimento delle querce mediterranee riscontrati nella parte orientale della Spagna (Pérez-Sierra *et al.*, 2013).

Di particolare rilievo sotto il profilo scientifico è il rinvenimento su ginepro e lentisco di due nuove specie di *Phytophthora* che, come detto, sono state qui descritte come *P. crassamura* e *P. ornamentata*. *Phytophthora crassamura*, erroneamente identificata in passato come *P. megasperma* in Australia e USA, è agente di marciume del colletto e delle radici di numerose specie di piante ornamentali e di interesse agrario. Il suo rinvenimento nell'isola di Caprera rappresenta la prima segnalazione di questa specie in Europa. *Phytophthora ornamentata*, sulla base delle sequenze depositate nel database online GenBank, non risulta che sia stata mai riportata altrove. Entrambe le due nuove specie sono risultate ootattiche e con oospore a parete molto spessa che perciò bene si adattano agli ambienti mediterranei caratterizzati da periodi piovosi alternati a periodi siccitosi. I saggi di patogenicità su semenzali di ginepro e lentisco hanno confermato la virulenza di *P. crassamura* e *P. ornamentata*, suggerendo quindi un loro possibile coinvolgimento nei fenomeni di deperimento riscontrati su specie della macchia mediterranea nelle isole dell'Arcipelago di La Maddalena.

In conclusione, gli attuali rinvenimenti di 9 specie di *Phytophthora* su diverse piante della macchia mediterranea, e quelli precedenti di *P. parvispora* su corbezzolo (Scanu *et al.*, 2014a), di *P. cinnamomi*, *P. psychrophila* e *P. quercina* su leccio (Scanu *et al.*, 2013), dimostrano la presenza di un'elevata e insolita diversità di specie di *Phytophthora* in un'area geografica di estensione limitata come quella delle isole dell'Arcipelago di La Maddalena. Ciò molto probabilmente è la conseguenza della facilità con cui questi microrganismi patogeni vengono diffusi da regioni, paesi e continenti diversi. Oggigiorno il commercio delle piante rappresenta il principale mezzo di diffusione delle specie di *Phytophthora* (Jung *et al.*, 2015), soprattutto in Europa dove i controlli fitosanitari appaiono del tutto inadeguati (Brasier

et al., 2008). Precedenti segnalazioni in Europa di alcune specie rinvenute in questo studio (*P. asparagi* e *P. crassamura*) esclusivamente in ambienti vivaistici o in aree geografiche distanti (*P. bilorbang* e *P. melonis*), e la diffusione di impianti artificiali di specie esotiche per la protezione delle dune costiere (come *Acacia cyanophylla* e *Eucalyptus camaldulensis*), suggeriscono come le specie patogene di *Phytophthora* possano essere state introdotte proprio attraverso l'impiego di materiale vivaistico infetto nelle operazioni di imboscamento e/o rimboscamento. Tale ipotesi nel caso specifico di Caprera, Santo Stefano e Spargi è molto plausibile in quanto in queste isole in passato sono stati effettuati diversi interventi di rimboscamento.

Peraltro, non appare casuale il fatto che le specie di *Phytophthora* siano state riscontrate proprio nelle isole maggiormente sottoposte a pressione antropica, prevalentemente su piante dislocate lungo strade e sentieri regolarmente percorsi da escursionisti e turisti. Ciò suggerisce che una volta introdotte, le specie di *Phytophthora* possono essere state diffuse attraverso la movimentazione di suolo infetto per esempio con le scarpe, le ruote delle biciclette, di moto o auto, come è stato accertato in altri ecosistemi a clima mediterraneo (Shearer e Tippet, 1989). Allo stesso modo, da non trascurare è il ruolo degli animali selvatici nella diffusione dei propaguli di questi patogeni (Li et al., 2014). Di certo, l'elevato numero di cinghiali presenti nell'isola di Caprera e molto probabilmente anche nelle isole di Santo Stefano e Spargi può aver contribuito in modo determinante alla diffusione dei propaguli di *Phytophthora* presenti nel suolo, ma anche di altre specie patogene, come le *Botryosphaeriaceae*, che sporulano in cancri situati nella parte del fusto delle piante raggiunta dagli animali.

Bonifica fitosanitaria

I risultati promettenti conseguiti nella prova di lotta contro gli attacchi di *D. corticola* nella lecceta dell'isola di Caprera, qualora venissero nel tempo ulteriormente confermati, suggeriscono l'opportunità di prevedere interventi selettivi di ceduzione delle piante infette almeno nei siti dove esiste un'elevata incidenza della malattia. Ciò consentirebbe di abbattere l'inoculo del patogeno e limitare notevolmente la diffusione delle sue infezioni anche alle altre specie suscettibili della macchia mediterranea. In ogni caso, stante la recrudescenza degli attacchi di questo patogeno, sarebbe auspicabile proseguire la sperimentazione sui mezzi di lotta per: i) verificare il risultato dei tagli di risanamento oltre che su leccio anche su altre specie vegetali (per es. ginepro); ii) saggiare l'efficacia di formulati a base di antagonisti naturali per la protezione delle ferite che rappresentano la via preferenziale di penetrazione del patogeno nei tessuti della pianta; iii) accertare l'effetto di ammendanti quali il fosfito di potassio nel contrastare/confinare i processi infettivi all'interno dei tessuti legnosi.

Per quanto riguarda la prova contro gli attacchi di *Phytophthora* spp. su leccio, si può affermare che i risultati relativi all'uso del fosfito di potassio appaiono incoraggianti. Infatti, nel complesso si è avuta una regressione dei sintomi nelle piante trattate e soprattutto i trattamenti hanno impedito la diffusione della malattia alle piante sane. Dalle prime osservazioni effettuate è emersa una risposta più attiva da parte delle piante trattate mediante iniezioni endoterapiche rispetto a quelle in cui il fosfito di potassio è stato somministrato al suolo. L'efficacia dei trattamenti è parsa migliore sulle piante con lievi sintomi di deperimento o comunque non compromesse da altre malattie, in particolare da infezioni di *Diplodia corticola*. La presenza nel fusto di cancri attivi causati da questo patogeno potrebbe compromettere il completo assorbimento del fungicida o comunque il raggiungimento di una sua concentrazione efficace nella pianta.

Dal punto di vista applicativo, il tipo di intervento mediante iniezioni sul fusto pone alcuni problemi di natura tecnica ed economica. In primis, il costo elevato dei dispensatori

Fertinyect che ne sconsiglia l'uso su vaste aree o in popolamenti ad elevata densità come quelli di leccio dell'isola di Caprera. In questi casi è consigliabile effettuare l'endoterapia avvalendosi di siringhe multiuso, riutilizzabili, come quelle prodotte dalla ditta Arbocap (Kit Endoterapia ARBOCAP) di Gavirate (Varese), non eccessivamente dispendiose e di facile manutenzione: dopo l'uso è sufficiente lavarle con acqua eventualmente addizionata di candeggina.

In ogni caso è bene ribadire che la lotta contro le infezioni di *Phytophthora* spp. sarà tanto più efficace quanto più attenta sarà l'applicazione delle buone pratiche di gestione sostenibile del bosco. Ciò a cominciare da un'attenta e costante attività di monitoraggio fitosanitario delle aree boschive al fine di individuare tempestivamente eventuali focolai infettivi ed attuare tutte le misure necessarie per prevenire la diffusione epidemica di questi pericolosi patogeni del suolo. Tra queste misure appare determinante la delimitazione delle aree infette per impedire il passaggio di animali selvatici e regolamentare la fruizione delle stesse da parte delle persone, prevedendo nei punti di accesso la realizzazione di zone attrezzate per il lavaggio con acqua a pressione e disinfezione con soluzioni di ipoclorito di sodio delle scarpe e delle ruote dei veicoli. Tali misure consentirebbero di applicare efficacemente le misure di lotta per eradicare il patogeno e di impedire la diffusione delle sue forme di conservazione riducendo notevolmente il rischio di nuove infezioni soprattutto nelle isole dell'Arcipelago di La Maddalena in cui la malattia non è stata ancora riscontrata.

Azioni future

Le indagini effettuate hanno evidenziato che nelle aree boschive delle isole dell'Arcipelago esiste una concentrazione elevata di patogeni invasivi diversi, appartenenti in particolare alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae* (7 specie) e al genere *Phytophthora* (9 specie). Da un lato è molto probabile che tale biodiversità, peraltro in un'area così limitata del mediterraneo, sia una conseguenza dei mutamenti globali del clima intervenuti negli ultimi anni, che hanno influenzato la biologia di questi patogeni favorendone la sopravvivenza, crescita e virulenza. Dall'altro lato è altresì probabile che la forte pressione antropica cui sono sottoposti gli ambienti indagati possa aver influenzato in maniera importante anche la loro ecologia. Le conoscenze in proposito sono ancora lacunose e meriterebbero di essere chiarite in particolare riguardo alle barriere e ai corridoi naturali che possono impedire/favorire l'insediamento, lo sviluppo e la diffusione di questi patogeni nei territori. Risposte concrete in tal senso sono essenziali per poter definire interventi efficaci e linee guida di salvaguardia della biodiversità vegetale delle isole dell'Arcipelago.

Pertanto, e alla luce dei risultati finora ottenuti, sarebbe opportuno continuare le attività di ricerca e sperimentazione con l'intento di:

- allestire due aree permanenti di monitoraggio in ciascuna isola dell'Arcipelago al fine di valutare l'impatto ecologico delle malattie e il rischio di estinzione delle specie vegetali maggiormente interessate dai fenomeni di deperimento;
- creare una mappa di diffusione nello spazio e nel tempo dei principali patogeni con lo scopo di acquisire maggiori informazioni sui corridoi naturali di diffusione;
- collocare in ciascuna isola captaspore volumetrici permanenti al fine di verificare i periodi di diffusione delle spore di ciascun patogeno;
- sistemare in ciascuna isola centraline meteorologiche in modo da verificare l'esistenza di correlazioni tra andamento termo-pluviometrico e bio-ecologia dei patogeni;

- individuare i principali vettori dei propaguli dei microrganismi patogeni;
- estendere le sperimentazioni di bonifica sanitaria ad altre specie vegetali della macchia mediterranea, in particolare al ginepro;
- sperimentare l'efficacia di formulati a base di antagonisti naturali nella protezione delle ferite fresche prodotte nel corso dei tagli di risanamento;
- verificare l'effetto di sostanze ammendanti quali per esempio il fosfito di potassio nel contrastare i processi infettivi da *Botryosphaeriaceae* nei tessuti legnosi;
- favorire la diffusione di specie arboree che mostrano caratteri di resistenza contro gli attacchi di *Botryosphaeriaceae* e *Phytophthora* spp.;
- sensibilizzare l'opinione pubblica sui rischi ambientali derivanti dalla diffusione di patogeni invasivi ed esotici, promuovendo incontri informativi e giornate di studio.

Allegati:

1. Mappa tematica 1
2. Mappa tematica 2
3. Mappa tematica 3
4. Mappa tematica 4
5. Divulgazione della ricerca

Prodotti della Ricerca:

- N. 2 articoli scientifici pubblicati su riviste internazionali indicizzate
- N. 3 comunicazioni orali a convegni nazionali e internazionali
- N. 1 poster a convegno nazionale
- N. 1 seminario divulgativo

BIBLIOGRAFIA

- Aghighi S., Hardy G.E.S.J., Scott J.K., Burgess T.I. (2012). *Phytophthora bilorbang* sp. nov., a new species associated with the decline of *Rubus anglocandicans* (European blackberry) in Western Australia. *Eur J Plant Pathol* 133: 841-855.
- Alves A., Linaldeddu B.T., Deidda A., Scanu B., Phillips A.J.L. (2014). The complex of *Diplodia* species associated with *Fraxinus* and some other woody hosts in Italy and Portugal. *Fungal Diversity* 67: 143-156.
- Andolfi A., Maddau L., Cimmino A., Linaldeddu B.T., Franceschini A., Serra S., Basso S., Melck D., Evidente A. (2012). Cyclobotryoxide, a phytotoxic metabolite produced by the plurivorous pathogen *Neofusicoccum australe*. *Journal of Natural Products* 75: 1785-1791.
- Brasier C.M. (2008). The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathol* 57: 792-808.
- Brasier C.M., Robredo F., Ferraz J.F.P. (1993). Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathol* 42: 140-145.
- Cacciola S.O., Pane A., Raudino F., Chimento A., Scibetta S., Davino S., et al. (2006). Bud and heart rot of fox tail agave (*Agave attenuata*) caused by *Phytophthora asparagi*. *J Plant Pathol* 88 (3S): S34-S34.
- Cunnington J.H., Alwis S.de, Pascoe I.G., Symes P. (2005). The 'asparagus' *Phytophthora* infecting members of the Agavaceae at the Royal Botanic Gardens, Melbourne. *Australas Plant Path* 34: 413-414.
- Dunstan W.A., Rudman T., Shearer B.L., Moore N.A., Paap T., Calver M.C., Dell B., Hardy G.E.StJ (2010). Containment and spot eradication of a highly destructive, invasive plant pathogen (*Phytophthora cinnamomi*) in natural ecosystems. *Biological Invasions* 12: 913-925.
- Felsenstein J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fernández-Escobar R., Gallego F.J., Benlloch M., Membrillo J., Infante J., Pérez de Algaba A. (1999). Treatment of oak decline using pressurized injection capsules of antifungal materials. *European Journal of Plant Pathology* 29: 29-38.
- Guest D., Grant (1991). The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews*, 66: 159-187.
- Hall T. (2001). BioEdit version 5.0.6. Department of Microbiology, North Carolina State University. Available: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
- Ho H.H., Gallegly M.E., Hong C.X. (2007). Re-description of *Phytophthora melonis*. *Mycotaxon* 102: 339-345.
- Inderbitzin P., Bostock R.M., Trouillas F.P., Michailides T.J. (2010). A six-locus phylogeny reveals high species diversity in *Botryosphaeriaceae* from California almond. *Mycologia* 102: 1350-1368.
- Jung T., Orlikowski L., Henricot B., Abad-Campos P., Aday A.G., Aguín Casal O. et al. (2015). Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. *Forest Path.* DOI:101111/efp12239.
- Lazzizzera C., Frisullo S., Alves A., Lopes J., Phillips A.J.L. (2008). Phylogeny and morphology of *Diplodia* species on olives in southern Italy and description of *Diplodia olivarum*. *Fungal Diversity* 31: 63-71.

- Li A.Y., Williams N., Fenwick S.G., Hardy G.E.S.J., Adams P.J. (2014). Potential for dissemination of *Phytophthora cinnamomi* by feral pigs via ingestion of infected plant material. *Biological Invasions* 16: 765-774.
- Linaldeddu B.T., Scanu B., Maddau L., Franceschini A. (2011). *Diplodia africana* causing dieback disease on *Juniperus phoenicea*: a new host and first report in the northern hemisphere. *Phytopathologia Mediterranea* 50 (3): 473-477.
- Linaldeddu B.T., Franceschini A., Alves A., Phillips A.J.L. (2013). *Diplodia quercivora* sp. nov.: a new species of *Diplodia* found on declining *Quercus canariensis* trees in Tunisia. *Mycologia* 105 (5): 1266-1274.
- Linaldeddu B.T., Scanu B., Maddau L., Franceschini A. (2014). *Diplodia corticola* and *Phytophthora cinnamomi*: The main pathogens involved in holm oak decline on Caprera Island (Italy). *Forest Pathol* 44: 191-200.
- Linaldeddu B.T., Scanu B., Seddaiu S., Deidda A., Maddau L., Franceschini A. (2015). A new disease of *Erica arborea* in Italy caused by *Neofusicoccum luteum*. *Phytopathologia Mediterranea* 54 (1): 124-127.
- Mehl J.M.W., Slippers B., Roux J., Wingfield M.J. (2011). *Botryosphaeriaceae* associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa. *Mycologia* 103: 534-553.
- Page R.D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357-358.
- Pérez C.A., Wingfield M.J., Slippers B., Altier N.A., Blanchette R.A. (2010). Endophytic and canker-associated *Botryosphaeriaceae* occurring on non-native *Eucalyptus* and native *Myrtaceae* trees in Uruguay. *Fungal Diversity* 41: 53-69.
- Pérez-Sierra A., López-García C., León M., García-Jiménez J., Abad-Campos P., Jung T. (2013). Previously unrecorded low temperature *Phytophthora* species associated with *Quercus* decline in a Mediterranean forest in Eastern Spain. *Forest Pathol* 43: 331-339.
- Reeser P.W., Sutton W., Hansen E.M., Remigi P., Adams G.C. (2011). *Phytophthora* species in forest streams in Oregon and Alaska. *Mycologia* 103: 22-35. doi: 10.3852/10-013 PMID: 20943547.
- Rodriguez F., Oliver J.F., Marin A., Medina J.R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitutions. *Journal of Theoretical Biology* 142, 485-501.
- Ronquist F.R., Huelsenbeck J.P. (2003). MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574. PMID: 12912839.
- Saude C., Hurtado-Gonzales O.P., Lamour K.H., Hausbeck M.K. (2008). Occurrence and characterization of a *Phytophthora* sp. pathogenic to asparagus (*Asparagus officinalis*) in Michigan. *Phytopathology* 98: 1075–1083. doi: 10.1094/PHYTO-98-10-1075 PMID: 18943453.
- Scanu B., Linaldeddu B.T., Franceschini A., Anselmi N., Vannini A., Vettraino A.M. (2013). Occurrence of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak forests in Italy. *Forest Pathol* 43: 340-343.
- Scanu B., Hunter G.C., Linaldeddu B.T., Franceschini A., Maddau L., Jung T., et al. (2014a) A taxonomic reevaluation reveals that *Phytophthora cinnamomi* and *P. cinnamomi* var. *parvispora* are separate species. *Forest Pathol* 44: 1-20.
- Scanu B., Linaldeddu B.T., Pérez-Sierra A., Deidda A., Franceschini A. (2014b). *Phytophthora ilicis* as a leaf and stem pathogen of *Ilex aquifolium* in Mediterranean islands. *Phytopathologia Mediterranea* 53: 480-90.
- Scanu B., Linaldeddu B.T., Deidda A., Jung T. (2015). Diversity of *Phytophthora* species from declining Mediterranean maquis vegetation, including two new species, *Phytophthora crassamura* and *P. ornamentata* sp. nov. *PLoS ONE* 10 (12). Doi:10.1371/journal.pone.0143234.

-
- Shearer B.L., Tippet J.T. (1989). Jarrah dieback: The dynamics and management of *Phytophthora cinnamomi* in the jarrah (*Eucalyptus marginata*) forest of south-western Australia. Department of Conservation and Land Management Research Bulletin Como, Western Australia. 3: 76 pp.
- Shearer B.L., Fairman R.G., Grant M.J. (2006). Effective concentration of phosphite in controlling *Phytophthora cinnamomi* following stem injection of *Banksia* species and *Eucalyptus marginata*. Forest Pathology 36: 119-135.
- Solla A., García L., Pérez A., Cordero A., Cubera E., Moreno G. (2009). Evaluating potassium phosphonate injections for the control of *Quercus ilex* decline in SW Spain: implications of low soil contamination by *Phytophthora cinnamomi* and low soil water content on the effectiveness of treatments. Phytoparasitica 37(4): 303-316.
- Swofford D.L. (2003). PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30: 2725-2729.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25: 4876-4882.
- Vettraiño A.M., Barzanti G.P., Bianco M.C., Ragazzi A., Capretti P., Paoletti E. (2002). Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. Forest Pathol 32: 19-28.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplified and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego, pp 315-322.