



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Dipartimento di Agraria – Sede gemmata di Nuoro

Laurea Magistrale in Sistemi Forestali e Ambientali

Curriculum in Protezione Civile

**Il disseccamento del ginepro fenicio
sull'Isola di Budelli: cause e possibili
strategie di controllo**

Relatore:

Dott. Bruno Scanu

Correlatori:

Dott.ssa Paola Brundu

Dott. Andrea Brandano

Tesi di Laurea di:
Alessio Mustazzu

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

	PAG.
RIASSUNTO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUZIONE	3
1.1. Il Parco Nazionale dell’Arcipelago di La Maddalena	4
<i>1.1.1. Inquadramento climatico</i>	6
<i>1.1.2. Aspetti vegetazionali</i>	6
<i>1.1.3. Gli habitat a ginepro</i>	10
<i>1.1.4. Il disseccamento del ginepro fenicio</i>	13
2. OBIETTIVI DELLA TESI	15
3. MATERIALI E METODI	16
3.1. Siti di indagine	16
3.2. Attività di campo	17
<i>3.2.1. Interventi di bonifica fitosanitaria</i>	17
<i>3.2.2. Monitoraggio fitosanitario</i>	18
<i>3.2.3. Cattura delle spore fungine</i>	19
3.3. Attività di laboratorio	20
<i>3.3.1. Quantificazione del potenziale d’inoculo</i>	20
<i>3.3.2. Identificazione morfologica degli isolati fungini</i>	21
<i>3.3.3. Identificazione molecolare degli isolati fungini</i>	21
<i>3.3.4. Saggi di patogenicità</i>	22
<i>3.3.5. Analisi dei dati</i>	23
4. RISULTATI	24
4.1. Stato fitosanitario dei ginepreti	24
4.2. Dinamica dell’inoculo in aree trattate e non trattate	26
4.3. Caratterizzazione degli isolati di <i>Cytospora</i> sp.	27
<i>4.3.1. Caratteri morfologici</i>	27
<i>4.3.2. Analisi delle sequenze geniche</i>	28
<i>4.3.3. Patogenicità</i>	32
3. CONCLUSIONI	34
4. BIBLIOGRAFIA	36

RIASSUNTO

Il disseccamento del ginepro fenicio sull'Isola di Budelli: cause e possibili strategie di controllo

La *Diplodia africana* è un patogeno esotico emergente in ambiente mediterraneo dove il fungo è stato associato a fenomeni di disseccamento e moria di piante di *Juniperus phoenicea*. Il patogeno è stato riscontrato per la prima volta sull'Isola di Caprera, diffondendosi rapidamente nelle altre isole dell'Arcipelago di La Maddalena, tra cui l'Isola di Budelli, dove l'Ente Parco Nazionale in collaborazione con l'Università di Sassari ha avviato un piano di lotta volto al contenimento della malattia. In particolare, all'interno di un'area pilota sono stati effettuati degli interventi di bonifica fitosanitaria volti a ridurre l'incidenza degli attacchi del fungo attraverso il taglio e l'eliminazione di tutto il materiale vegetale ormai disseccato. Le piante sottoposte ai trattamenti sono state monitorate a cadenza annuale per la presenza dei sintomi della malattia. Inoltre, attraverso l'ausilio di trappole capta spore è stato rilevato il quantitativo di inoculo sia all'interno dell'area pilota sia in aree non sottoposte a interventi come controlli positivi. Dai risultati ottenuti è emersa l'efficacia degli interventi in termini sia di riduzione dei sintomi che del quantitativo di inoculo. Le indagini di laboratorio hanno consentito di identificare le specie fungine associate a questa malattia, tra cui una nuova specie all'interno del genere *Cytospora* caratterizzata sia morfologicamente che molecularmente. I saggi di patogenicità hanno confermato la capacità del fungo di colonizzare i tessuti legnosi, tuttavia ulteriori analisi sono necessarie per definire il suo ruolo nei fenomeni di deperimento del ginepro nell'arcipelago di La Maddalena.

ABSTRACT

Dieback of Juniper trees on Budelli Island: causes and possible control strategies

Diplodia africana is an emerging plant pathogen in the Mediterranean area, where this fungus has been associated with dieback and mortality of *Juniperus phoenicea* trees. The pathogen was first reported on Caprera Island and from there it spread rapidly to the other islands of the La Maddalena Archipelago, among which the Budelli Island where the National Park in cooperation with the University of Sassari made a control plan to try to contain the disease. In particular, phytosanitary treatments were carried out within a pilot area aimed at reducing the incidence of fungal infection by removing all dead woody material. Treated juniper trees were monitored every year for the occurrence of disease symptoms. In addition, through the use of spore traps the amount of inoculum was quantified within the pilot area and in sites with non-treated trees as positive control. The results obtained showed the efficacy of the phytosanitary treatments for reducing both symptoms development and amount of inoculum. Lab analyses allowed to identify the fungal species associated with this disease, among which a new species in the genus *Cytospora* was detected and morphologically and molecularly characterized. Pathogenicity tests confirmed the ability of the fungus to colonize woody tissues, however further analyses are necessary to define its role in the juniper decline phenomena in the La Maddalena Archipelago.

Il disseccamento del ginepro fenicio sull'Isola di Budelli: cause e possibili strategie di controllo



Uno scorcio dell'Isola di Budelli, il simbolo del Parco Nazionale dell'Arcipelago di La Maddalena, un arenile dal caratteristico colore rosa corallino dovuto alla presenza di bioclasti derivanti da briozoi e foraminiferi, alimentati dalla posidonia, un ambiente unico nel bacino del Mediterraneo.

1. INTRODUZIONE

La globalizzazione dei mercati, con conseguente commercio di materiale vegetale infetto, ha portato a un progressivo aumento di specie esotiche e invasive in ambienti forestali in cui non erano presenti con effetti spesso devastanti sulle piante arboree (Liebhold *et al.*, 2012; Santini *et al.*, 2013). A ciò va aggiunta anche l'azione dei cambiamenti climatici che non solo stanno creando le condizioni per lo stabilirsi e il diffondersi di specie esotiche in ambienti non nativi, ma stanno facilitando l'emergenza di patogeni fungini ormai considerati endemici, favoriti dalle condizioni di stress delle piante ospiti, indotte sia dall'anomala distribuzione delle precipitazioni sia dalla riduzione delle stesse (Sturrock *et al.*, 2011). In queste condizioni gli alberi sono soggetti a stress vegetativi ripetuti e intensi che ne limitano la funzionalità e li predispongono a rinnovati attacchi da parte dei parassiti

normalmente presenti nei vari ecosistemi. Tali parassiti vengono definiti “opportunisti” in quanto approfittano della ridotta reattività delle piante in stress per colpire i vari organi o aggredire quelli che già li ospitano, causando disfunzioni e disseccamenti che possono divenire sistemici fino a configurare sindromi, definite genericamente col termine di “deperimento”, che esprimono un degrado vegetativo delle piante progressivo e irreversibile verso un esito letale.

Il caso della *Diplodia africana* Damm & Crous rappresenta un esempio di malattia emergente in ambiente forestale mediterraneo e in particolare in Sardegna. Il patogeno è stato rinvenuto per la prima volta nel 2009 sull’Isola di Caprera, associato a fenomeni di disseccamento dei rami e morie di piante di *Juniperus phoenicea* L. (Linaldeddu *et al.*, 2011). Successivamente attacchi di *D. africana* sono stati riscontrati in altre isole dell’Arcipelago di La Maddalena e in particolare sull’Isola di Budelli. Visto l’elevato valore ecologico che l’habitat dei ginepreti riveste nell’arcipelago, in quanto rappresenta l’unica specie a portamento arboreo nativa insieme al leccio, sin da subito l’Ente Parco Nazionale dell’Arcipelago di La Maddalena si è attivato al fine di definire e attuare delle misure di contenimento della diffusione di questa malattia. In collaborazione con il Dipartimento di Agraria, dell’Università degli Studi di Sassari, nel 2018 in un’area pilota sull’Isola di Budelli, sono stati effettuati degli interventi di bonifica fitosanitaria volti a ridurre l’incidenza degli attacchi del fungo attraverso il taglio e l’eliminazione di tutto il materiale vegetale ormai disseccato. In tale contesto l’obiettivo del presente lavoro, anche alla luce della mancanza di interventi simili nella letteratura scientifica, è stato quello di valutare l’efficacia degli interventi condotti attraverso un monitoraggio fitosanitario e del quantitativo di inoculo in aree sottoposte ai trattamenti e non.

1.1. Il Parco Nazionale dell’Arcipelago di La Maddalena

Il Parco Nazionale dell’Arcipelago di La Maddalena, istituito con Legge n. 10 del 4 gennaio 1994, rappresenta il primo parco nazionale della Sardegna. L’istituzione dell’area parco, secondo quanto previsto dalla Legge quadro sulle aree protette per le regioni a statuto speciale, discende dall’intesa tra Stato e Regione Sardegna, documento diretto all’attuazione di interventi significativi nel campo della tutela e della valorizzazione ambientale che, oltre al coinvolgimento della popolazione locale, perseguono la finalità di una fruizione sostenibile delle risorse ambientali e storico-culturali, mantenendo in vita le consuetudini, gli usi civici e il modello di vita della popolazione residente nell’arcipelago.

L'Arcipelago di La Maddalena è costituito da sette isole maggiori e da numerose isole minori e scogli, per uno sviluppo costiero complessivo pari a 176,2 km, un decimo dell'intera costa sarda, ed una superficie territoriale complessiva di circa 49 km². Gli isolotti, di natura granitica e scistosa con forme che sembrano monumenti naturali, rappresentano un complesso strettamente interdipendente di mare e terra e costituisce uno dei paesaggi considerati tra i più suggestivi al mondo per morfologia, paesaggio vegetale, mare e biocenosi marine, anche in ragione della sua collocazione geografica nello stretto di Bonifacio. L'Ente gestore del Parco e le Norme di salvaguardia attualmente vigenti, sono stati istituiti con Decreto del Presidente della Repubblica del 17 maggio 1996. Sono in corso di elaborazione il Piano e il Regolamento del Parco, con la cui approvazione potranno essere introdotte modifiche alla zonizzazione prevista dal D.P.R. istitutivo dell'area protetta.

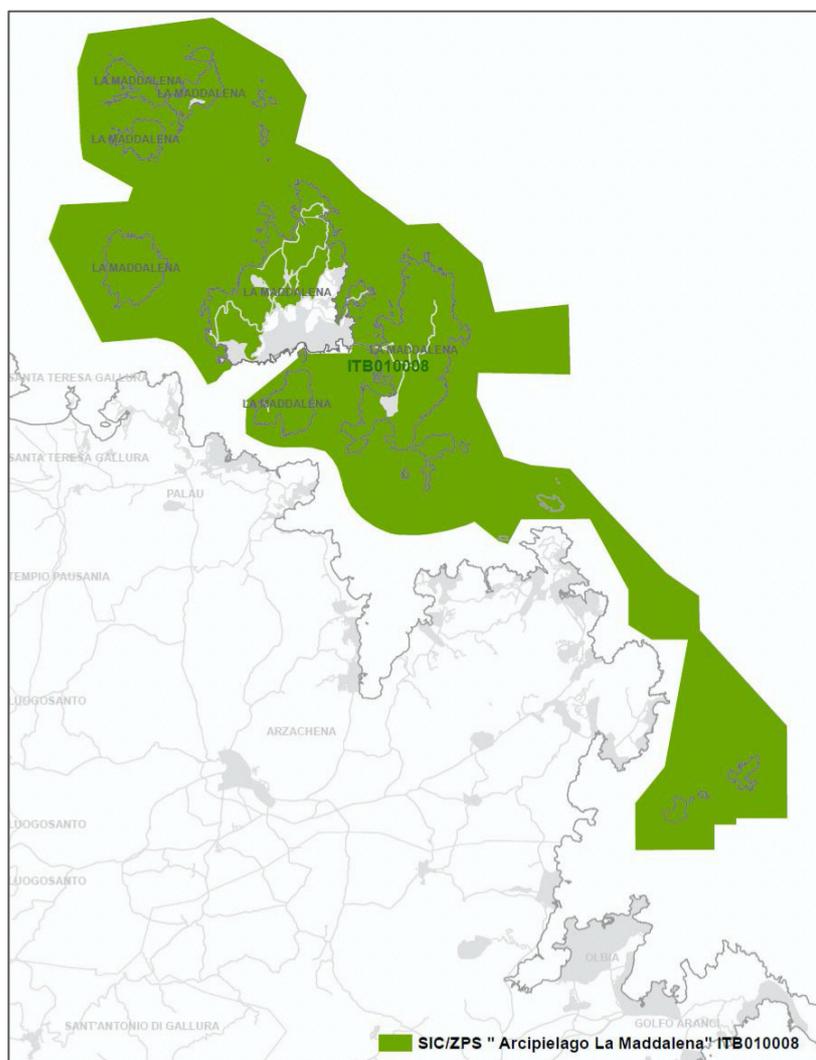


Figura 1. Inquadramento territoriale del Parco Nazionale dell'Arcipelago di La Maddalena.

1.1.1. Inquadramento climatico

L'Arcipelago di La Maddalena presenta aspetti climatici tipicamente mediterranei, caratterizzati da un regime pluviometrico mediamente compreso fra i 500 e i 900 mm di precipitazione annui, sostanzialmente concentrati da ottobre ad aprile, e un periodo arido variabile a seconda dell'area ma sempre prolungato (Tabella 1). Il clima locale è caratterizzato da un forte deficit idrico estivo che si manifesta da metà giugno fino alla fine del mese di settembre; le precipitazioni sono concentrate nella stagione invernale e in quella autunnale, con un minimo nel periodo estivo, in cui possono verificarsi comunque eventi pluviometrici di una certa intensità.

Gli inverni sono miti, con medie del mese più freddo comprese fra i 5 e i 15 °C e solo raramente la temperatura scende sotto lo zero. Il periodo freddo è limitato e il mese più freddo è gennaio. In estate le temperature medie sono normalmente elevate e nei mesi di luglio e agosto, quando la temperatura diurna dell'aria può superare i 30°C e la temperatura al suolo nei punti di maggiore insolazione diventare molto elevata (Arrigoni, 1968). Per quanto riguarda nello specifico il clima della Sardegna Settentrionale, gli aspetti caratteristici sono legati all'azione del vento, frequente in tutte le stagioni e prevalentemente da ovest, circa il 42% sul totale del vento istantaneo e il 51,6% sul totale delle raffiche giornaliere.

Tabella 1. Andamento pluviometrico nell'Arcipelago di La Maddalena. Rielaborazione su dati ARPAS, periodo di riferimento 01/01/2009 – 31/12/2018.

Mese	G	F	M	A	M	G	L	A	S	O	N	D	Anno
Precipitazioni (mm)	83,9	80,2	78,9	38,4	39,8	16	4,7	6,2	39,6	76,5	95,8	40,7	600,7
Giorni piovosi	15,7	14,8	12,7	9,5	7,3	4,1	1,9	2,4	6,9	11,8	15,2	12,2	114,5

1.1.2. Aspetti vegetazionali

Il patrimonio floristico dell'Arcipelago di La Maddalena si aggira intorno alle 750 entità vegetali, che rappresentano circa un terzo della flora sarda. Sono presenti 51 specie endemiche e 39 specie rare o di interesse fitogeografico. Queste ultime sono spesso specie legate ad ambienti sensibili, come quelle che abitano gli ambienti umidi dulciacquicoli, o legate agli ambienti dunali, su cui si esercita una pressione antropica notevole.

L'Arcipelago di La Maddalena presenta un alto numero di ambienti, habitat, associazioni vegetali e di specie di notevole interesse botanico, sia per la specificità della flora che per i tipi di vegetazione con diverse associazioni endemiche. Oltre alle specie di elevato valore ecologico-naturalistico l'arcipelago è caratterizzato da 30 habitat di cui alla Direttiva 92/43/CEE (Fig. 2).

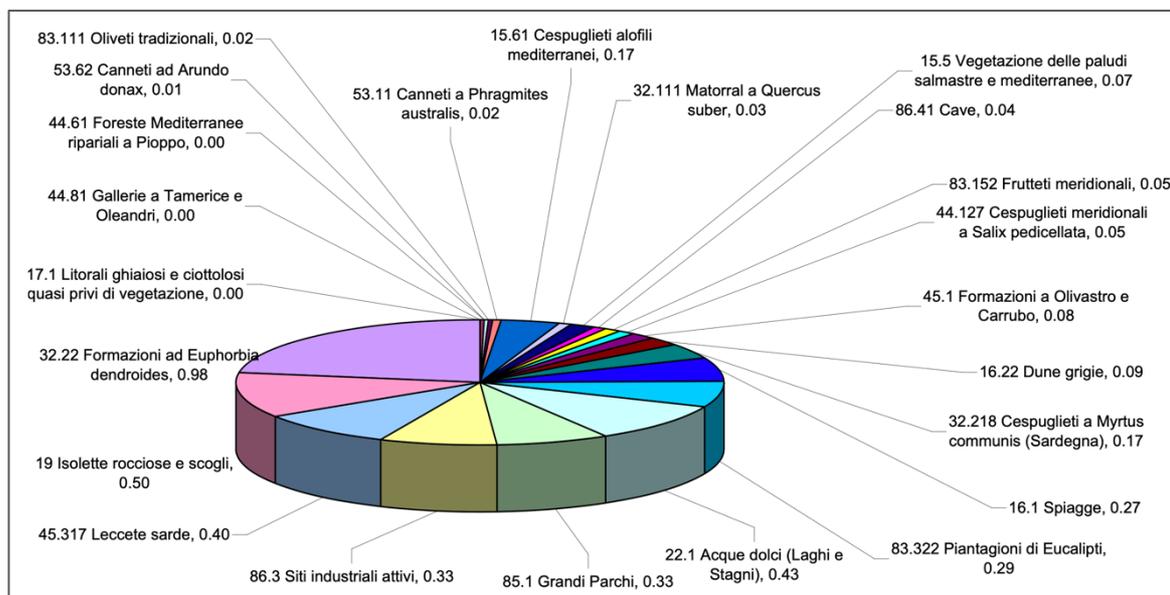
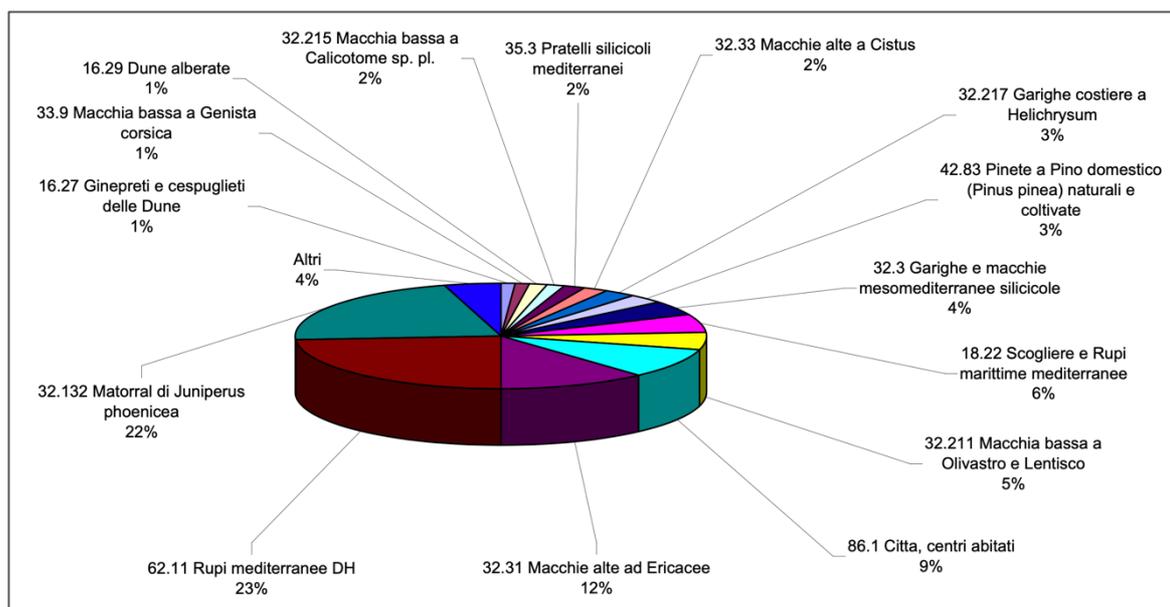


Figura 2. In alto % degli habitat e in basso presenza di habitat con superficie inferiore all'1% nel territorio dell'Arcipelago di La Maddalena.

Le principali formazioni vegetali sono quelle tipiche della fascia costiera mediterranea: è presente una macchia dominata da ginepro, corbezzolo, fillirea, lentisco, mirto, erica, calicotome, cisto ed euforbia; verso la costa la vegetazione degrada dalla macchia più bassa alla gariga dove, tra le fitocenosi più caratteristiche, occorre menzionare quelle alofile. Le superfici sabbiose e i luoghi più o meno salsi consentono la presenza di formazioni di alimietti, salicomietti e di vegetazione psammofila. Il paesaggio vegetale delle isole è, tuttavia, fortemente condizionato dal fattore vento, insolazione aridità e povertà dei suoli, dal gradiente altitudine nonché dalla distanza dalla terra ferma. Le quote complessivamente modeste dei rilievi non consentono una stratificazione in piani di vegetazione ed in effetti si ricade sempre nelle macchie termofile di sclerofille mediterranee.

Solamente in pochi luoghi è possibile riscontrare boschi di leccio (Isola di Caprera), ginepretti a ginepro fenicio evoluti (Budelli, Caprera, Spargi), tamariceti (Santa Maria). In alcune isole come a Razzoli, la vegetazione climatica non sembra in grado di elevarsi oltre la gariga ed una modesta formazione di macchia bassa, mentre negli isolotti di minori dimensioni la vegetazione risulta priva anche degli elementi costitutivi della macchia, lasciando ad *Helichrysum microphyllum* e *Artemisia densiflora* la caratterizzazione del manto vegetale delle aree più degradate. Il paesaggio appare quindi dominato dalle macchie di sclerofille sempreverdi e soprattutto dalle garighe, che sfumano nella vegetazione casmofitica discontinua sui rocciai granitici. In linea generale, il ginepro, il corbezzolo, la fillirea, il lentisco, il mirto, le eriche, la calicotome, i cisti, l'euforbia arborea e la ginestra corsica sono le specie più rappresentate e caratterizzanti del paesaggio vegetale. Nell'entroterra, lungo tutta la costa settentrionale, il paesaggio vegetale appare egualmente degradato anche a causa di una maggiore pressione delle attività turistiche, che hanno interessato ampi tratti di territorio delle zone costiere. I boschi di leccio sono relegati su canaloni o su aree impervie, mentre gli oleastreti sono diffusi un po' ovunque; ma sono sempre le macchie termo-xerofile a dare l'impronta complessiva al paesaggio, almeno dove le attività umane non riducono in modo drastico la possibilità di evoluzione progressiva della vegetazione. Permangono, lungo i corsi d'acqua, fragmiteti, tamariceti a tamerice maggiore e canneti ad *Arundo donax*. Formazioni miste a *Myrtus communis* ed *Erica scoparia* sono presenti nei canaloni di Caprera e nelle garighe di Razzoli, dove il disturbo antropico è stato minore.

I boschi di origine artificiale, dovuti ai rimboschimenti effettuati agli inizi del secolo, sono ancora presenti a Caprera con impianti a *Pinus pinea* e *Pinus halepensis*, *Eucalyptus camaldulensis* e boschetti di *Acacia cyanophylla*.

Col tempo diversi fattori hanno ridotto la superficie originaria rimboschita - incendi, aerosol marino, siccità, fitopatie e cambiamenti socio-economici; tuttavia ancora oggi sono presenti numerosi nuclei, soprattutto di pineta, residui dell'impianto originario, che hanno acquisito ulteriori valenze rispetto allo scopo iniziale di protezione, anche in considerazione dell'incremento turistico avvenuto dal 1996, anno di istituzione del Parco Nazionale. Infatti, oltre alla protezione del suolo queste pinete diversificano il paesaggio, offrono riparo dalla calura estiva, sono l'unico modello di bosco "colonnare" che molte generazioni di nativi dell'arcipelago hanno conosciuto sin dalla nascita tanto da divenire per gli abitanti un bene "identitario" più del museo Garibaldino (Bonanno, 2003). Attualmente l'estensione totale dei soprassuoli puri di pino nell'arcipelago è di 109,23 ha dei quali 95,27 ha nella sola isola di Caprera. Nonostante le pinete siano nate come sistemi boscati molto semplificati e uniformi sul territorio in quanto prodotti da un impianto artificiale estensivo, si può affermare che attualmente c'è grande complessità e diversità tra i nuclei di pineta dislocati nell'arcipelago. La diversità è legata sia agli interventi ad esse applicati sia alle dinamiche naturali di rinnovazione in atto.

Tabella 2. Tipologie forestali dell'Arcipelago di La Maddalena. Definizione di bosco: Decreto legislativo 3 aprile 2018, n. 34 Testo unico in materia di foreste e filiere forestali.

Tipologia forestale	Superficie %
Macchia bassa	31.15
Macchia alta	24.43
Rimboschimenti di conifere	6.65
Piantagioni di Acacie e Eucalitti	1.06
Leccete con latifoglie sempreverdi	0.2
Boschi aree umide	0.11
Totale superficie boscata	63.6

1.1.3. Gli habitat a ginepro

Definiti come “*Matorral*”, sulla base della descrizione degli Habitat dell’Arcipelago di La Maddalena nella legenda Corine Biotopes e corrispondenza con Eunis e Natura 2000 (Camarda *et al.*, 2015), i ginepreti sulle isole dell’arcipelago sono caratterizzati dalla tipica struttura con le piante isolate che si elevano dalla sottostante copertura di *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea angustifolia* e, nelle zone con suoli più profondi, di *Arbutus unedo*, *Erica arborea*, *Rhamnus alaternus*. Complessivamente si possono distinguere dal punto di vista fisionomico due aspetti legati nel processo evolutivo che porta dal *matorral* alle boscaglie mature con la netta prevalenza di ginepro fenicio (*Juniperus phoenicea* L.). Le formazioni mature di *J. phoenicea* con esemplari di grandi dimensioni presenti particolarmente a Spargi e Budelli e sporadicamente qua e là.



Figura 3. Tipico paesaggio a *Juniperus phoenicea* nel territorio dell’Arcipelago di La Maddalena.

Il ginepro fenicio è la specie forestale più rappresentata e con maggiori potenzialità, se si considerano le condizioni ambientali complessive delle isole, che nonostante i suoi lenti accrescimenti rappresenta spesso la specie climatica delle boscaglie di sclerofille sempreverdi. Il ginepro fenicio si trova inoltre sporadico in tutte le situazioni aperte e appare

come la specie che, nonostante il lento accrescimento, presenta maggiore possibilità di affermazione nelle aree più degradate.

Il nome specifico botanico fa riferimento al colore rosso porpureo degli strobili e del legno e pertanto non presenta alcun significato geografico; questa attribuzione ha creato confusione; infatti viene spesso usato il nome di cedro licio con chiaro intento di un richiamo geografico. Specie molto longeva, di solito a portamento arbustivo con chioma ovato-piramidale, può raggiungere forme arboree di 10-15 m (in questi casi presenta chioma espansa ed irregolare, tronco ramificato dal suolo e diametri sino a 70-80 cm) presenta corteccia fibrosa desquamantesi longitudinalmente in lamine sottili e spiralmate nei rami adulti. I rami di 1 mm di diametro presentano foglie di 0,5-1 mm ovato-rombiche, cuspidate, squamiformi, con una linea resinifera centrale. Nelle forme giovanili le foglie sono aciculari, in verticilli di tre, lunghe 10-15x 1-2 mm, pungenti. Nei rami adulti le foglie si trovano molto brevi (1mm), con apice ottuso e bordo finemente denticolato; sono portate in due coppie opposte e decussate, fortemente appressate al ramo (si possono trovare anche in verticilli di tre). Le infiorescenze sono portate su piante diverse (specie monoica) in amenti terminali su giovani rami laterali; quelle maschili sono lunghe 3-5 mm, erette, con squame amentifere cartilaginee suborbicolari; i galbuli, inizialmente verdi (Fig. 4), diventano rosso porpora lucente a maturità (2° anno) e sono sostenuti da un peduncolo eretto; sono sferici (diametro intorno a 8-14 mm) costituiti da squame stopposo-carnose e contengono 3-9 semi.

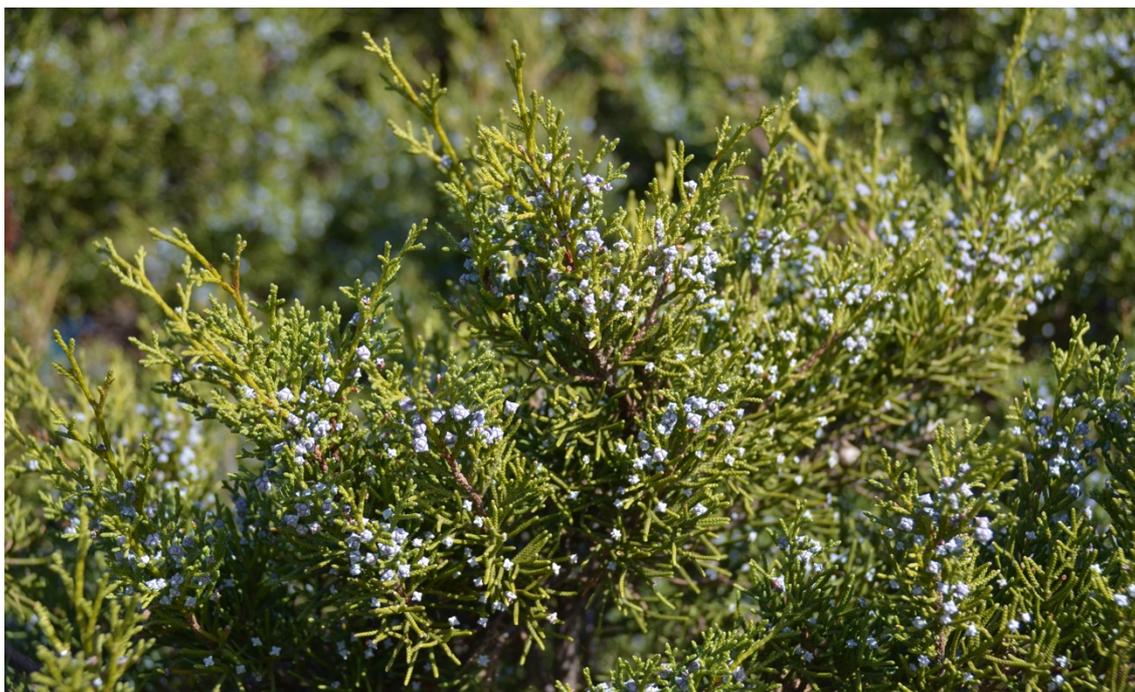


Figura 4. Galbuli e foglie squamiformi di *Juniperus phoenicea* nella la stagione primaverile.

L'areale di distribuzione del ginepro fenicio si estende a tutto il bacino del Mediterraneo sino all'Asia Minore, compresa l'Europa meridionale l'Africa Settentrionale e le Isole Canarie (Fig. 5). È una specie fortemente eliofila e xerofila che vegeta su qualsiasi tipo di substrato. In Africa, sui monti dell'Atlante, si spinge sino a 3.000 m di altitudine; in Sardegna, nelle zone calcaree centro-orientali, si rinviene sino a 800-1000 m sui versanti rocciosi esposti a mezzogiorno. Entra a far parte della vegetazione arbustiva litoranea, talvolta misto a *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *oxycedrus* e *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *macrocarpa* (Sibth e Sm) Ball.

Micro o mesofanerofita, fiorisce a gennaio marzo (nelle zone più elevate ad aprile-maggio). I frutti maturano al secondo anno e permangono nella pianta per più anni. Non presenta capacità pollonifera e risulta molto sensibile agli incendi. È una specie ad accrescimento lento ma molto longeva; in condizioni favorevoli costituisce formazioni chiuse entrando in concorrenza con le specie più termofile della macchia mediterranea. Il legno duro e compatto è molto apprezzato in ebanisteria.

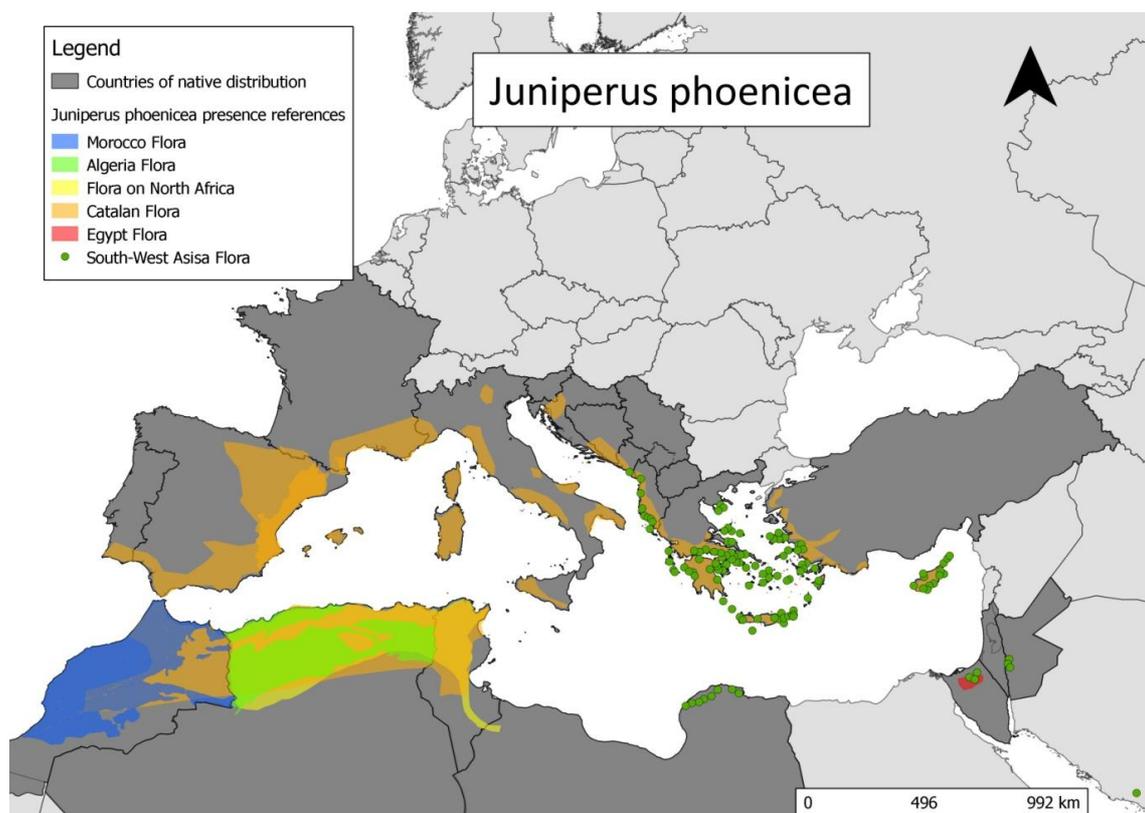


Figura 5. Areale del *Juniperus phoenicea* L. (Fonte: Gathering geographic data from published sources and using the collected information to complete and improve the accuracy of distribution maps of 24 Mediterranean tree species - COST-STSM-FP1202-18711).

1.1.4. Il disseccamento del ginepro fenicio

Nel 2009, in seguito a una attività di monitoraggio fitosanitario nell'Isola di Caprera, è stata riscontrata la presenza diffusa di piante di ginepro fenicio con sintomi di deperimento grave. Nello specifico le piante colpite mostravano un progressivo disseccamento dei germogli, dei rami e delle branche a partire dalla branca principale. Erano interessate da questo quadro sintomatologico piante di diversa età, sia adulte che giovani e in contesti vegetazionali diversi (Fig. 6). Nel 2010, le piante monitorate l'anno precedente mostravano porzioni disseccate della chioma più ampie; quelle colpite più gravemente morivano nel corso della stagione vegetativa (Fig. 6). Sempre nello stesso anno in altre aree boschive dell'Isola di Caprera è stata riscontrata la presenza di nuove piante sintomatiche suggerendo che la malattia era in una fase espansiva.

Le piante sintomatiche mostravano alla base dei rami e delle branche disseccate piccoli cancri, spesso resinosi, caratterizzati dallo scollamento dei tessuti corticali da quelli legnosi (Fig. 7). A livello sottocorticale erano spesso presenti aree necrotiche di forma allungata che interessavano i tessuti legnosi. Queste ultime apparivano più evidenti in seguito alla asportazione della corteccia esterna con uno scalpello. Spesso, le lesioni necrotiche e i cancri interessavano anche la base del fusto principale. Lo sviluppo dei cancri e delle necrosi nei rami e nel fusto procedeva dall'alto verso il basso. Ciò, molto probabilmente, in seguito alla percolazione lungo i rami e il fusto dell'acqua piovana che veicola i propaguli infettivi prodotti dai patogeni coinvolti. Peraltro, nei tessuti morti erano ben visibili numerosi picnidi fungini scuri ed erompenti dalla corteccia. Le foglie sui rami sintomatici viravano inizialmente al giallo e, successivamente, al rosso opaco ed infine al marrone-cenerino. Esse spesso rimanevano attaccate a lungo ai rami anche dopo il loro disseccamento.

L'agente causale di questa malattia fu identificato come *Diplodia africana* Damm & Crous (Linaldeddu *et al.*, 2011), il cui rinvenimento rappresentò il primo report di questo fungo patogeno nell'emisfero nord nonché una nuova associazione ospite-patogeno. Oltre all'Isola di Caprera, la *D. africana* è stata rinvenuta sempre su ginepro fenicio nell'Isola di Budelli e più recentemente nella costa orientale della Sardegna e più in particolare nei sistemi dunali di Capo Comino (Siniscola).



Figura 6. Piante di *Juniperus phoenicea* con porzioni di chioma disseccate (a sinistra) associate alla presenza di cancri resinosi sulla branca principale (a destra).

2. OBIETTIVI DELLA TESI

Nell'ambito delle attività previste nella convenzione di ricerca stipulata tra l'Ente Parco Nazionale dell'Arcipelago di La Maddalena e il Dipartimento di Agraria, dell'Università degli Studi di Sassari, volte alla valutazione dell'incidenza delle fitopatie nelle aree più antropizzate, sperimentazione di trattamenti endoterapici alle piante, predisposizione di una mappa del rischio fitosanitario e di *best-practice* per evitare la diffusione dei patogeni negli ecosistemi naturali del Parco Nazionale, sono state condotte delle indagini per verificare l'efficacia di interventi fitosanitari su *Juniperus phoenicea* condotti tra maggio e giugno del 2018 in un'area pilota nell'isola di Budelli. Gli interventi di bonifica fitosanitaria sono stati realizzati sul versante orientale dell'isola, in un'area caratterizzata da un'incidenza elevata di piante che presentavano sintomi di disseccamento a livello della chioma, riconducibili agli attacchi del fungo ascomicete *Diplodia africana* Damm & Crous, precedentemente rinvenuto nell'arcipelago e in particolare nell'isola di Caprera (Linaldeddu *et al.* 2011). L'obiettivo di tali interventi era quello di ridurre il potenziale di inoculo del fungo attraverso il taglio selettivo, la bruciatura tempestiva di rami disseccati e piante già morte e la protezione dei tagli con mastice cicatrizzante. Gli interventi sono stati effettuati da una ditta specializzata sotto la supervisione dei ricercatori del Dipartimento di Agraria e del personale competente dell'Ente Parco.

In tale contesto l'obiettivo del presente lavoro di tesi, anche alla luce della mancanza di interventi simili nella letteratura scientifica, è stato quello di valutare l'efficacia degli interventi di bonifica fitosanitaria attraverso un monitoraggio fitosanitario e del quantitativo di inoculo in aree sottoposte ai trattamenti e non. Inoltre, il rinvenimento di alcune specie nuove di funghi, isolati dai cancri resinosi su piante colpite dalla malattia, ha indirizzato la ricerca ad approfondire gli studi sulla caratterizzazione, sia su base morfologica che molecolare, dei suddetti isolati fungini. Di seguito si riferisce in dettaglio sulle attività svolte di monitoraggio in campo e in laboratorio, e sui principali risultati ottenuti.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Siti d'indagine

I siti oggetto di studio sono stati individuati in seguito a precedenti indagini di monitoraggio fitosanitario condotte dai ricercatori del Dipartimento di Agraria che hanno portato ad una mappatura delle fitopatie nelle isole dell'Arcipelago di La Maddalena (Fig. 7). In particolare, come accennato in premessa, nel versante sud-orientale dell'Isola di Budelli è stata riscontrata un'area dove le piante di ginepro fenicio mostravano gravi sintomi di disseccamento causati da *Diplodia africana*.

L'area interessata dal fenomeno è caratterizzata da una componente arborea e arbustiva costituita principalmente da piante disetanee di ginepro, in consociazione con altre specie tipiche della macchia mediterranea quali cisto, corbezzolo, erica, fillirea, mirto e olivastro. Da un punto di vista strutturale l'habitat a ginepro fenicio non differisce da quello presente nelle altre isole come Caprera e Spargi.

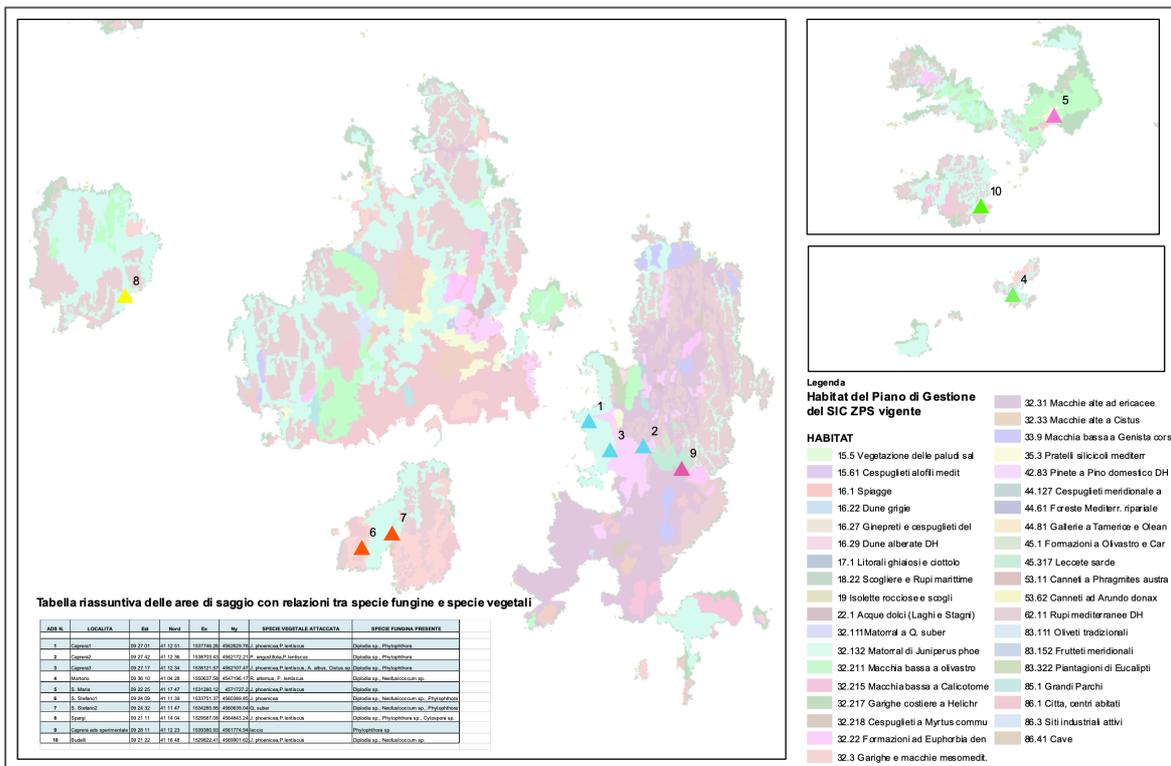


Figura 7. Localizzazione delle aree di monitoraggio delle fitopatie negli habitat dell'area Parco. In alto a destra il sito oggetto di studio sull'Isola di Budelli.

3.2. Attività di campo

3.2.1. Interventi di bonifica fitosanitaria

Al fine di risanare il ginepreto interessato dalle infezioni del fungo patogeno *Diplodia africana* sull'Isola di Budelli è stata avviata una prova sperimentale di lotta effettuando gli interventi in un'area pilota di circa 2 ha, individuata nel corso delle indagini relative alla convenzione di ricerca tra l'Ente Parco e l'Università di Sassari prima citata e delimitata in base alla diffusione del focolaio infettivo sull'isola (Fig. 8). In tale sito nella primavera del 2018 è stato avviato un piano di interventi di taglio e distruzione di materiale vegetale infetto. Nello specifico gli interventi di bonifica fitosanitaria hanno riguardato tutte le piante di ginepro fenicio sintomatiche presenti all'interno dell'area e consistevano in tagli di ceduzione, capitozzatura, potatura delle branche più grosse e dei rami apicali ormai disseccati (Fig. 9). Tutto il materiale vegetale tagliato è stato immediatamente distrutto in loco mediante abbruciamento in fusti cilindrici in ferro per evitare rischi di incendio (Fig. 9). Successivamente, i tagli effettuati sono stati protetti, con un mastice cicatrizzante specifico per potature, attraverso l'ausilio di un pennello.



Figura 8. Delimitazione dell'area pilota sottoposta agli interventi di bonifica fitosanitaria sull'Isola di Budelli, geo-localizzazione dei ginepri monitorati e delle 3 aree di saggio.



Figura 9. Interventi di bonifica fitosanitaria: potatura dei rami disseccati (in alto a sinistra), pianta sottoposta a interventi (in alto a destra), materiale vegetale di risulta (in basso a sinistra) e abbruciamento (in basso a destra).

3.2.2. Monitoraggio fitosanitario

All'interno dell'area sottoposta agli interventi sono state individuate *at random* 75 piante sulle quali è stata posizionata una targhetta con un numero identificativo. Per valutare lo stato fitosanitario delle piante sottoposte agli interventi, nel marzo del 2019, all'interno dell'area pilota sono state individuate 3 aree di saggio circolari di 20 metri di diametro (Fig. 8). All'interno di ciascuna area di saggio sono state esaminate tutte le piante presenti con diametro superiore a 5 cm, rilevando la presenza di sintomi specifici a livello del fusto e

della chioma, attraverso la compilazione di una scheda di valutazione appositamente predisposta. In particolare, ciascuna pianta è stata considerata “pianta sana = priva di sintomi”, “sintomatica = presenza di disseccamenti”, “pianta morta = priva di attività vegetativa” e infine “tagliata = pianta sottoposta a ceduzione”.

3.2.3. Cattura delle spore fungine

Al fine di valutare l'efficacia degli interventi, circa 8 mesi (febbraio-marzo 2019) dopo i tagli di bonifica fitosanitaria, all'interno dell'area pilota sono state posizionate, in prossimità di piante di ginepro sottoposte ai tagli (N 41° 16' 48" E 9° 21' 23"), 8 palettine di 40 cm di altezza, contenenti 4 vetrini portaoggetti che, previa applicazione di un nastro biadesivo, fungevano da trappole capta spore (Fig. 10). A fine di avere un controllo positivo, la stessa prova è stata condotta all'esterno dell'area pilota (N 41° 16' 44" E 9° 21' 06") in prossimità di piante non sottoposte a interventi (8 trappole) e in due siti sull'Isola di Caprera (N 41° 12' 46" E 9° 27' 47"; N 41° 11' 67" E 9° 27' 31") dove il patogeno è particolarmente diffuso (10 trappole). In tutti i casi le prove sono state programmate in periodi piovosi o comunque in giornate in cui sono state rilevate precipitazioni significative, in quanto considerate condizioni favorevoli per la diffusione delle spore fungine attraverso acqua e vento. Dopo 7 giorni, le trappole capta spore sono state prelevate inserendo i vetrini all'interno di una busta di plastica, sulla quale sono stati riportati i riferimenti del prelievo (data, n° pianta e coordinate) e trasferite in giornata in laboratorio per le analisi.



Figura 10. Trappola capta spore costituita da 4 vetrini portaoggetti (foto a sinistra) e sviluppo di colonie fungine su piastra Petri contenente PDA (foto a destra).

3.3. Analisi dei campioni in laboratorio

3.3.1. Quantificazione del potenziale d'inoculo

Dei quattro vetrini di ciascuna paletta, 1 è stato utilizzato per la conta dei conidi al microscopio ottico, 1 per gli isolamenti su piastra Petri contenente PDA e i restanti 2 vetrini sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA fungino. La conta dei conidi al microscopio ottico è stata effettuata rilevando di tutti i conidi presenti lungo un transetto ipotetico individuato sul nastro biadesivo a 400 ingrandimenti tramite il programma in dotazione alla camera digitale modello Leica DFC495 collegata al microscopio. Inoltre, da ciascun vetrino sono stati effettuati gli isolamenti, in particolare il vetrino è stato posizionato all'interno di una provetta Falcon contenente 50 mL di acqua sterile, agitato per 30 minuti e centrifugato per 10 minuti. Successivamente è stato prelevato il surnatante (fase acquosa superiore) e il pellet (precipitato) è stato reidratato in 1 mL di acqua sterile, dal quale sono stati prelevati 500 microlitri, piastrati su PDA ed incubati a 20 °C.

Per l'estrazione del DNA fungino, tutto il materiale depositatosi sul nastro biadesivo è stato raschiato attraverso l'ausilio di un bisturi e raccolto all'interno di una provetta da 1.5 mL. Previa estrazione del DNA fungino è stata effettuata l'amplificazione e il sequenziamento della regione degli spaziatori interni trascritti (ITS1 e ITS2) incluso il gene 5.8S del rDNA, seguendo un apposito protocollo. Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state lette ed analizzate attraverso il programma BioEdit v. 5.0.6 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>).

Contestualmente all'analisi degli isolati fungini ottenuti dai vetrini sono stati effettuati degli isolamenti da campioni di rametti disseccati che presentavano i tipici cancri da *Diplodia* prelevati da piante all'interno delle aree di studio. In particolare, frammenti di circa 3-4 mm² di tessuto corticale e legnoso sono stati 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 quattro differenti substrati: CA (carota e agar, Oxoid), PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid), estratto di malto agar (MEA, Oxoid) alla concentrazione di 20 g/L e V8.agar (Oxoid). Le piastre sono state conservate in termostato a 20°C fino alla differenziazione nelle colonie dei caratteri morfologici idonei per l'identificazione della specie fungina.

3.3.2. Identificazione morfologica degli isolati fungini

L'identificazione morfologica degli isolati è stata effettuata esaminando i caratteri colturali 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 formatisi 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 acqua sterile 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. 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. Per ognuna delle specie identificate su base morfologica sono stati selezionati uno o più isolati rappresentativi per essere impiegati in ulteriori studi biomolecolari e per i saggi di patogenicità.

3.3.3. Identificazione molecolare degli isolati fungini

L'identificazione su base genetica è stata effettuata attraverso l'amplificazione, il sequenziamento e l'analisi delle sequenze dell'intera regione degli spaziatori interni trascritti (ITS1 e ITS2) e il gene 5.8S del rDNA e una porzione del gene del fattore di allungamento della traduzione EF1- α . 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), seguendo le istruzioni della casa produttrice. Gli estratti sono stati quindi conservati a - 20°C fino al loro successivo utilizzo. Con la reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata amplificata la regione ITS utilizzando i primers universali ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Per alcuni isolati fungini sono state inoltre amplificate e sequenziate ulteriori regioni geniche tra cui la large subunit (LSU) con i primers LR0R e LR7 (Vilgalys & Hester 1990), la regione *partial actin* (act1) con i primers ACT512F e ACT783R (Carbone & Kohn 1999), l'elongation factor 1-alpha (tef1- α) con i primers EF1-728F e EF1-986R (Carbone & Kohn 1999) e la beta-tubulin (tub2) con i primers Bt2a e Bt2b (Glass & Donaldson 1995).

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 Fan *et al.* (2020). 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. Le sequenze nucleotidiche sia in forward che in reverse sono state lette ed analizzate attraverso il programma BioEdit v. 5.0.6 (Hall, 2001) e i nucleotidi dedotti sono stati infine confrontati con i dati disponibili nel database online GenBank utilizzando il programma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.3.4. Saggi di patogenicità

Poiché l'identificazione molecolare di alcuni isolati ha portato all'individuazione di una specie nuove afferente al genere *Cytospora*, mai segnalata su ginepro, si è ritenuto importante saggiarne la patogenicità al fine di completare i postulati di Koch e comprendere il suo potenziale coinvolgimento nei fenomeni di deperimento dei ginepreti nelle isole dell'arcipelago. I test di patogenicità sono stati condotti sia su semenzali di ginepro fenicio sia su rami asintomatici di piante mature in bosco.

La patogenicità di un isolato rappresentativo di *Cytospora* sp. è stata saggiata su 20 semenzali di ginepro fenicio di 2 anni di età in fitocella e ottenuti dal vivaio dell'Agenzia Fo.Re.S.T.A.S. (vivaio produttivo di Badesi). In particolare, è stata praticata con un bisturi sterile un'incisione longitudinale di circa 0,5 cm sulla parte centrale del fusto di ciascun semenzale. Nella ferita è stata quindi inoculata una porzione di micelio di circa 3-5 mm², prelevata dal margine di colonie di 5 giorni di età su PDA. Per evitare la rapida disidratazione del micelio, il punto d'inoculo è stato avvolto per una settimana con cotone sterile inumidito e protetto con carta stagnola. Dieci piante sono state usate come controllo negativo. Esse sono state trattate come le precedenti, ma inoculate solo con un frammento di PDA sterile. Le piante così inoculate sono state monitorate settimanalmente per lo sviluppo di eventuali sintomi della malattia e alla fine della prova è stata rilevata la lunghezza delle lesioni necrotiche in corrispondenza del punto di inoculazione. Infine, da tutte le piante inoculate

sono stati effettuati gli isolamenti dai tessuti corticali e legnosi necrotici, al fine di accertare la presenza del patogeno inoculato.

I saggi di patogenicità su piante mature in bosco sono stati effettuati inoculando 20 rami asintomatici di ginepro fenicio (10 con l'isolato fungino e 10 come testimone). Anche in questo caso i rami sono stati inoculati ponendo una porzione di micelio (3-4 mm²), prelevata dal margine di una colonia in attiva crescita su PDA, su una ferita superficiale di circa 3 mm² fatta con un bisturi sterile sulla corteccia di ciascun ramo. Dieci 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 con cotone sterile inumidito e protetto con carta stagnola e nastro isolante alle estremità. Al termine del periodo sperimentale (90 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.

3.3.5. Elaborazione dei dati

I dati morfometrici rilevati dagli isolati afferenti alla specie *Cytospora* sp. 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.

4. RISULTATI

4.1. Stato fitosanitario dei ginepreti

L'attività di monitoraggio in campo attraverso l'individuazione di 3 aree di saggio ha consentito di rilevare lo stato sanitario di 254 piante di ginepro (Tabella 3 e 4). In particolare, dai rilievi effettuati a maggio del 2019, 12 mesi dopo gli interventi di bonifica fitosanitaria, oltre il 65% delle piante sono risultate asintomatiche e quindi vegetavano in condizioni di salute, mentre solo il 2,4% delle piante presentavano sintomi di disseccamento dei rami e 6 piante sono state considerate ormai morte (Fig. 11). Quest'ultimo dato indica l'elevata capacità rigenerativa del ginepro, anche a seguito di interventi intensivi di questo tipo. All'interno delle tre aree di saggio sono state rilevate le ceppaie di ben 75 piante di ginepro, che indicavano un'intensità dei tagli di ceduzione intorno al 30% delle piante presenti prima degli interventi. Solo in alcuni casi dalle piante ceduate sono stati osservati nuovi germogli a dimostrazione della perdita di vitalità delle piante deperienti.

Tabella 3. Stato sanitario delle piante di *Juniperus phoenicea* nelle 3 aree di saggio all'interno dell'area pilota di Budelli rilevato a maggio 2019.

Area di saggio	N. Piantе asintomatiche	N. Piantе sintomatiche	N. Piantе morte	N. Piantе ceduate	Tot. piante
1	35	3	3	23	64
2	52	0	0	28	80
3	80	3	3	24	110
Totale	167	6	6	75	254

Dai rilievi effettuati a maggio del 2020, 24 mesi dopo gli interventi di bonifica fitosanitaria, il 54% delle piante sono risultate asintomatiche, mentre è stato riscontrato un aumento delle piante con sintomi di disseccamento, passando dal 2,4 al 14,2% complessivamente, e con un incremento più marcato in particolare nell'area di saggio n° 3 rispetto alle altre due (Fig. 11). Le piante considerate ormai morte invece sono aumentate di una unità, passando da 6 a 7. Il numero delle piante ceduate riscontrate nelle aree di saggio

è rimasto invariato, in quanto non è stato effettuato alcun intervento di bonifica delle piante morte. Anche nel rilievo del 2020, solo in alcuni casi dalle piante ceduate sono stati osservati nuovi germogli a dimostrazione della perdita di vitalità delle piante deperienti.

Tabella 4. Stato sanitario delle piante di *Juniperus phoenicea* nelle 3 aree di saggio all'interno dell'area pilota di Budelli rilevato a maggio 2020.

Area di saggio	N. Piante asintomatiche	N. Piante sintomatiche	N. Piante morte	N. Piante ceduate	Tot. piante
1	29	10	3	23	64
2	47	4	1	28	80
3	62	20	3	24	110
Totale	138	36	7	75	254

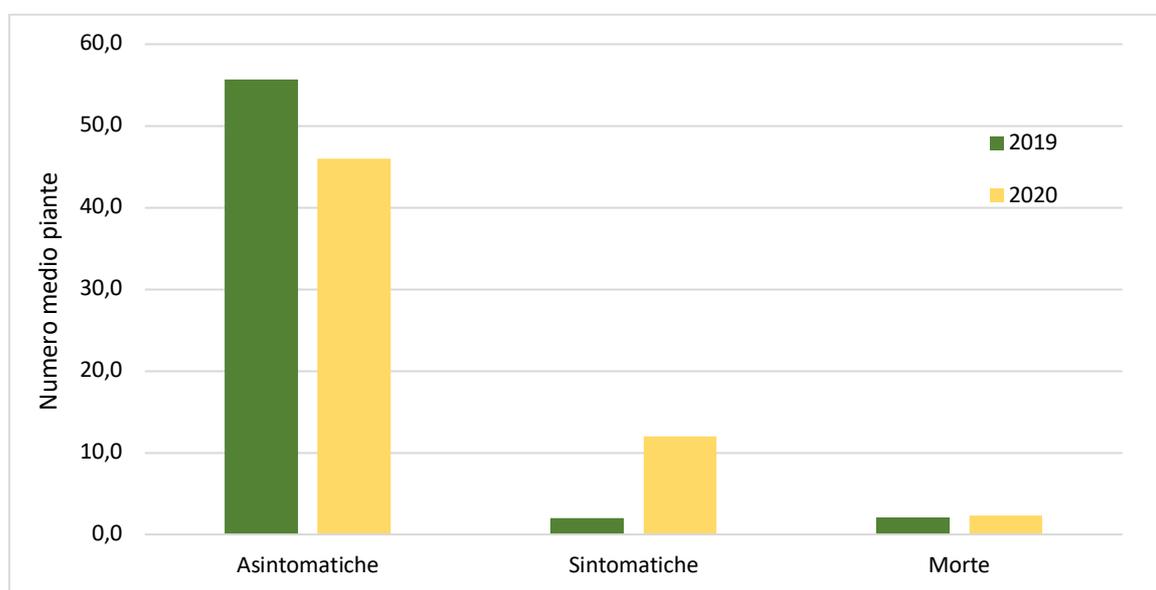


Figura 11. Numero medio di piante per area di saggio delle tre categorie rilevate: piante asintomatiche, piante sintomatiche e piante morte.

4.2. Dinamica dell'inoculo in aree trattate e non trattate

Dalle indagini effettuate nell'area pilota per valutare l'efficacia degli interventi fitosanitari è emersa una riduzione significativa del potenziale di inoculo. In particolare, dalle due prove condotte sull'isola di Budelli e Caprera, il numero di spore (conidi) rilevato all'interno dell'area sottoposta ai trattamenti è risultato in entrambi i casi inferiore rispetto a quello rilevato in prossimità delle piante non trattate a Budelli (all'esterno dell'area pilota) e Caprera (Fig. 12).

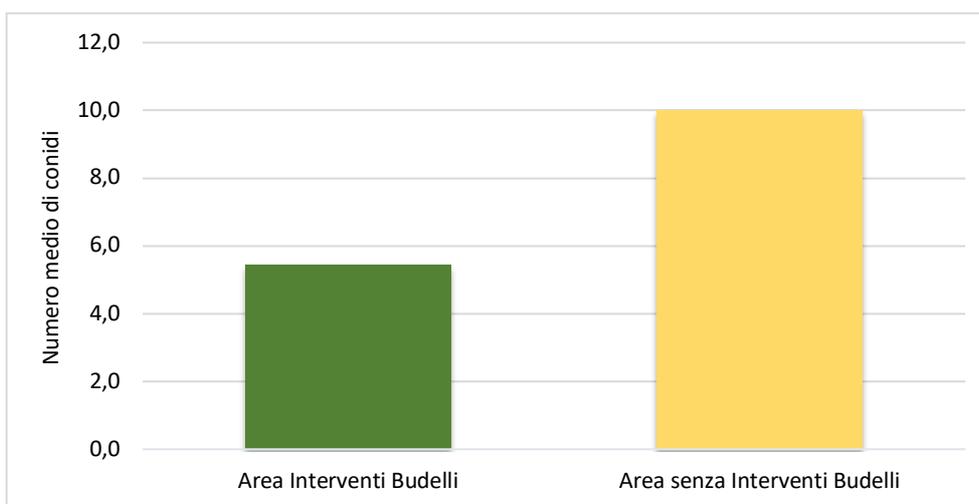


Figura 12. Numero medio di conidi riconducibili a *Diplodia africana* rilevato dai vetrini nella prova condotta a Budelli, all'interno dell'area pilota (barra verde) e fuori (barra gialla).

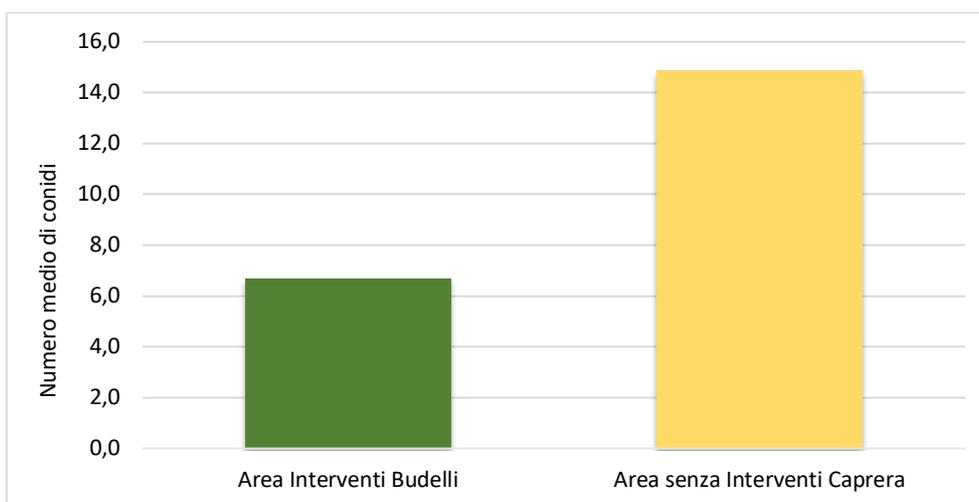


Figura 13. Numero medio di conidi riconducibili a *Diplodia africana* rilevato dai vetrini nella prova condotta a Budelli, all'interno dell'area pilota (barra verde) e a Caprera (barra gialla).

4.3. Caratterizzazione degli isolati di *Cytospora* sp.

4.3.1. Caratteri morfologici

Su PDA le colonie si presentavano di colore bianco-giallastro nelle prime fasi di sviluppo, stellato, con margine ben definito e micelio radente. Dopo 10 giorni, il fungo aveva colonizzato l'intera piastra per poi assumere con il passare del tempo una colorazione marrone-giallastra con la comparsa dei primi picnidi sulla superficie (Fig. 14).

Da un'analisi al microscopio è stato possibile osservare le ife conidiofore ialine, ramificate alla base, con parete sottile; i conidi si presentano anch'essi ialini, di forma ellittica allungata, lisci, asettati, con parete sottile, e una lunghezza media di 5,1 μm , variando da un minimo di 4,4 μm ad un massimo di 5,9 μm ed una larghezza media di 1,05 μm (Fig. 14).

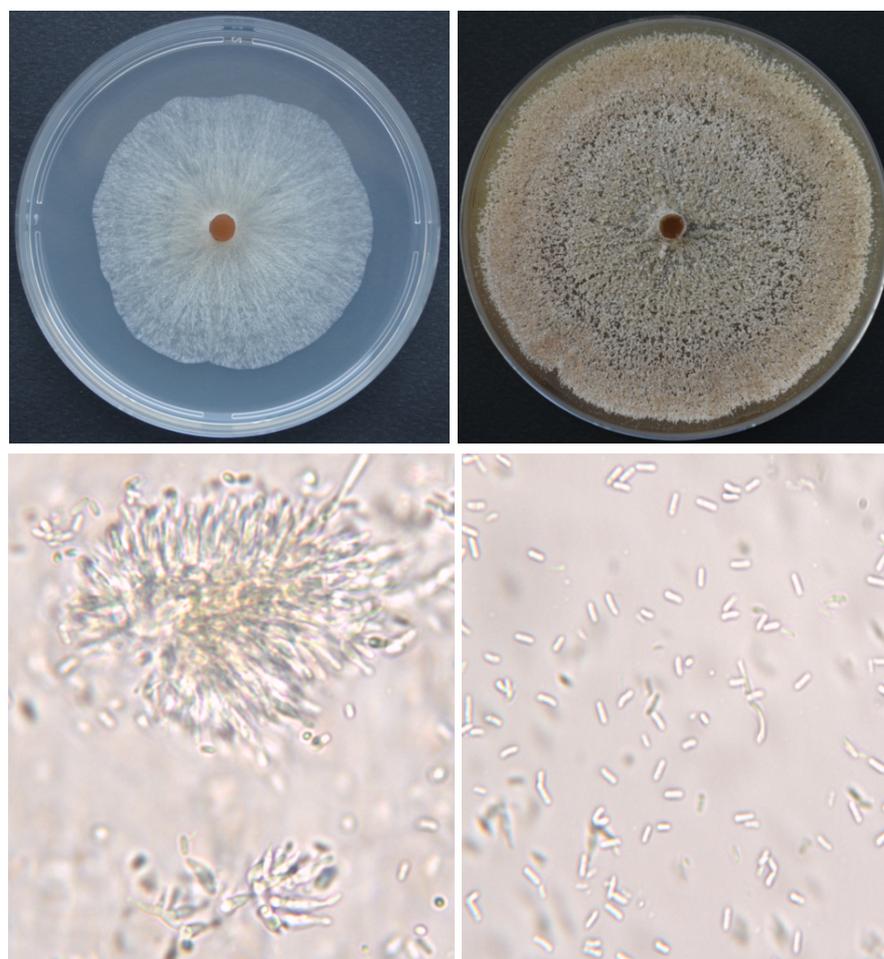


Figura 14. *Cytospora* sp.: aspetto della colonia su PDA dopo 7 giorni (in alto a sinistra) e dopo 30 giorni (in alto a destra); particolare dei conidiofori ramificati (in basso a sinistra) e dei conidi (in basso a destra).

4.3.2. Analisi delle sequenze geniche

L'amplificazione delle regioni elongation factor 1-alpha, ITS, beta-tubulin, large subunit e partial actin ha prodotto dei frammenti rispettivamente di circa 137 bp, 935 bp, 532 bp, 1644 bp, 243 bp. Le ricerche in GenBank tramite il software BLAST hanno mostrato per tutte le cinque regioni geniche una similarità che variava dall'86 al 98% di similarità con le sequenze presenti nel database. Sulla base delle sequenze della regione ITS la specie filogeneticamente più vicina è risultata la *Cytospora unilocularis* (Fig. 16).

Di seguito si riportano gli allineamenti delle sequenze ottenute con quelle depositate nella banca data NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) attraverso l'applicativo BLAST Search (Fig. 15-19).

The screenshot displays the BLAST search results interface. At the top, there are tabs for 'Descriptions', 'Graphic Summary', 'Alignments', and 'Taxonomy'. Below this, a header indicates 'Sequences producing significant alignments' with options for 'Download', 'Manage Columns', and 'Show 100'. A checkbox indicates 'select all 100 sequences selected'. A table lists various sequences with columns for 'Description', 'Max Score', 'Total Score', 'Query Cover', 'E value', 'Per. Ident', and 'Accession'. The top result is 'Cytospora coryli strain CFCC 53162 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds' with a Max Score of 137, Total Score of 137, Query Cover of 47%, E value of 2e-28, and Per. Ident of 86.72%. Below the table, there are navigation options like 'Download', 'GenBank', 'Graphics', 'Next', 'Previous', and 'Descriptions'. The detailed alignment section for the top result shows 'Range 1: 113 to 235' and provides statistics: Score 137 bits(74), Expect 2e-28, Identities 111/128(87%), Gaps 6/128(4%), and Strand Plus/Minus. The alignment itself shows the Query sequence (42-101) and Subject sequence (235-179) with vertical bars indicating matches.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Cytospora coryli strain CFCC 53162 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	137	137	47%	2e-28	86.72%	MN850758.1
Cytospora sp. isolate ColPat634 elongation factor 1-alpha gene, partial cds	126	126	47%	5e-25	85.38%	MK490945.1
Cytospora sp. isolate ColPat633 elongation factor 1-alpha gene, partial cds	126	126	47%	5e-25	85.38%	MK490944.1
Cytospora piceae culture CFCC-52842 translation elongation factor 1-alpha (tef) gene, partial cds	126	126	45%	5e-25	85.95%	MH820403.1
Cytospora piceae culture CFCC-52841 translation elongation factor 1-alpha (tef) gene, partial cds	126	126	45%	5e-25	85.95%	MH820402.1
Cytospora schulzeri strain CFCC 50042 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	122	122	47%	6e-24	84.50%	KU710937.1
Valsa sordida isolate CZC elongation factor 1 alpha (EF1a) gene, partial cds	121	121	40%	2e-23	87.16%	MN025273.1
Cytospora sp. XF-2019a strain CFCC 89970 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	121	121	40%	2e-23	87.16%	MH933494.1
Cytospora melnikii strain CFCC 89984 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	117	117	38%	3e-22	87.38%	MH933515.1
Cytospora joaquinensis isolate 9E-44 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	117	117	41%	3e-22	86.36%	MG971607.1
Cytospora joaquinensis isolate 9E-95 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	117	117	41%	3e-22	86.36%	MG971606.1
Cytospora joaquinensis isolate KARE975 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	117	117	41%	3e-22	86.36%	MG971605.1

Cytospora coryli strain CFCC 53162 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds
 Sequence ID: [MN850758.1](#) Length: 554 Number of Matches: 1

Range 1: 113 to 235 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
137 bits(74)	2e-28	111/128(87%)	6/128(4%)	Plus/Minus

```

Query 42  CATGCCGGGGTAATGGAGTTGGTGCCGGTGGTCAACAGGGCTTTTTTGCGGGCCGGAG 101
Sbjct 235  CATGCCGGGGTTATGCAGGTAAGGTGGCGGTGGTGAGACAGGG--TTTTTGCGGGCC--AAG 179

Query 102 ATAAGTCCCCGATAAGCCACCCCGCACTGAATTTGAAAAACCCAGTCAAGGGGTG-AA 160
Sbjct 178  ATAAG-CCCCGATAAGCACACCCCGCACTGAATTCGAAAAATCCAAG-GCAGGGGTGAAA 121

Query 161  AATGTGAT 168
Sbjct 120  AATGTGAT 113
  
```

Figura 15. Allineamento della sequenza della regione elongation factor 1-alpha ottenuto con il programma BLAST. In alto a destra è possibile osservare i valori di similarità della sequenza con quelle presenti nel database, mentre in basso il confronto con la sequenza più vicina.

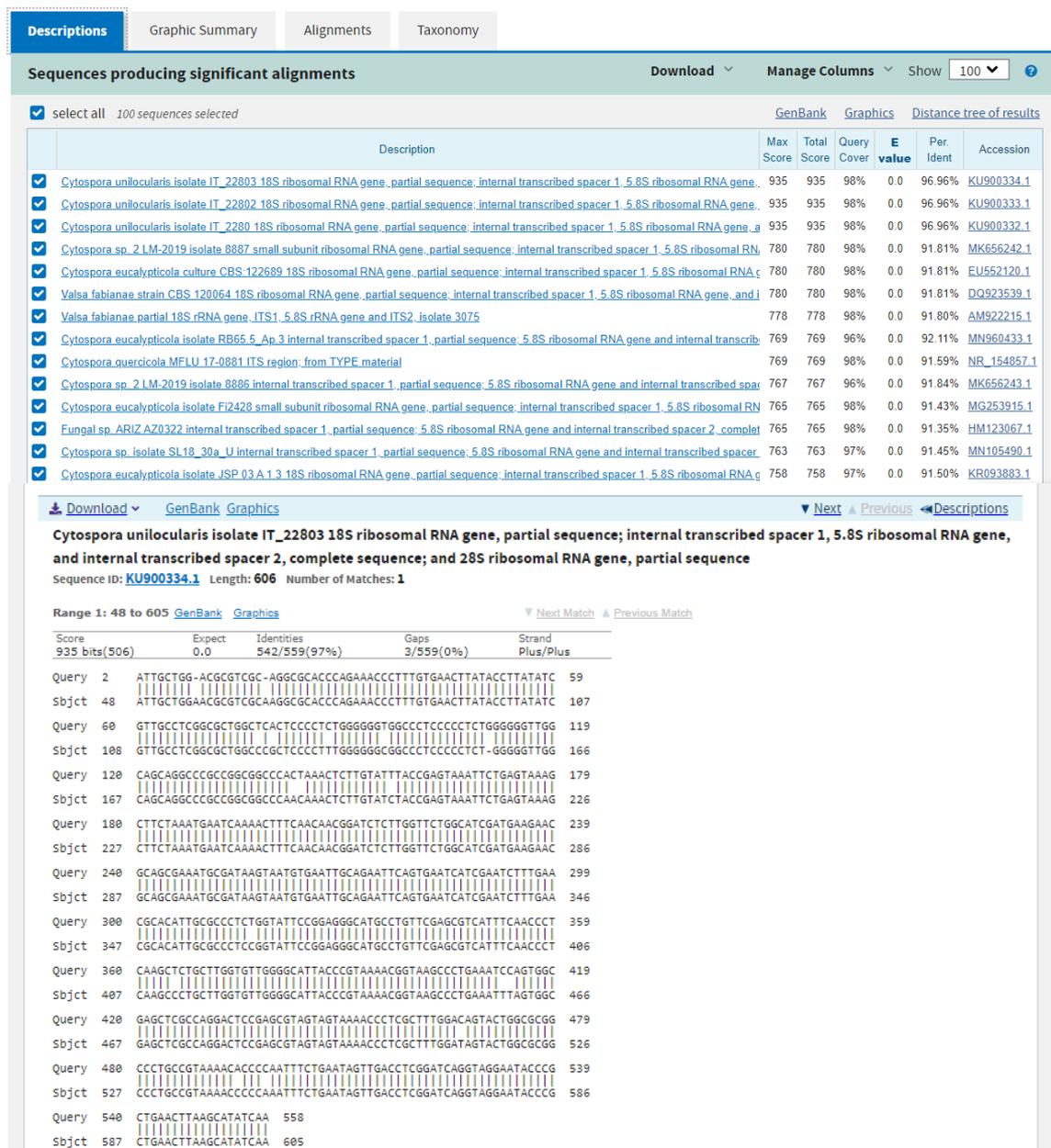


Figura 16. Allineamento della sequenza della regione ITS ottenuto con il programma BLAST. In alto a destra è possibile osservare i valori di similarità della sequenza con quelle presenti nel database, mentre in basso il confronto con la sequenza più vicina.

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Cytospora unilocularis strain MFLUCC 15#0483 beta-tubulin gene, partial cds	532	532	93%	5e-147	88.44%	KX063631.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cytospora unilocularis strain MFLUCC 15#0482 beta-tubulin gene, partial cds	529	529	92%	6e-146	88.39%	KX029120.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cytospora unilocularis strain MFLUCC 15#0481 beta-tubulin gene, partial cds	516	516	90%	5e-142	88.36%	KX444199.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cytospora viticola culture CBS 143162 beta-tubulin (tub2) gene, partial cds	372	372	78%	1e-98	84.73%	MH108038.1
<input checked="" type="checkbox"/> Valsa sordida beta-tubulin gene, partial cds	355	355	80%	1e-93	83.46%	MN128703.1
<input checked="" type="checkbox"/> Valsa sordida strain AL-E-2 beta-tubulin gene, partial cds	355	355	80%	1e-93	83.46%	KT428033.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cytospora chrysosperma isolate XJlg11 beta-tubulin gene, partial cds	355	355	80%	1e-93	83.46%	KF039741.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cytospora sp. XF-2013b strain HMBF154 beta-tubulin gene, partial cds	350	350	80%	5e-92	83.25%	KF498685.1
<input checked="" type="checkbox"/> Valsa malicola strain YHT-1 beta-tubulin gene, partial cds	348	348	80%	2e-91	83.21%	KT934374.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cytospora eucalypticola voucher CMW40048 beta-tubulin gene, partial cds	342	342	81%	8e-90	82.96%	KF923254.1
<input checked="" type="checkbox"/> Valsa sordida strain GL-1 beta-tubulin gene, partial cds	337	337	80%	4e-88	82.67%	KT934376.1
<input checked="" type="checkbox"/> Valsa sordida strain GL-4 beta-tubulin gene, partial cds	337	337	80%	4e-88	82.67%	KT934375.1
<input checked="" type="checkbox"/> Valsa sordida isolate IR100 beta-tubulin (btu) gene, partial cds	333	333	80%	5e-87	82.47%	KY127429.1

Download GenBank Graphics Next Previous Descriptions

Cytospora unilocularis strain MFLUCC 15#0483 beta-tubulin gene, partial cds
 Sequence ID: [KX063631.1](#) Length: 470 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 442 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
532 bits(288)	5e-147	398/450(88%)	11/450(2%)	Plus/Minus
Query 19	TGGCC - AAAACGATGTTGTT CGGGGCGGTTACAGCTGGCCGAAAGGACCGGCGCGGACGG	77		
Sbjct 442	TGGCCGAAAGACGAAAGTTGT - CGGGGCGG - AACAGCTGGCCGAAAGGACCGGCGCGGACGG	385		
Query 78	CGTCCATGGTACC GGGGCTCGAGATCGACGAGGACAGCGCGAGGGACATACTTGTGGCCGG	137		
Sbjct 384	CGTCCATGGTACC GGGGTTTCGAGATCGACGAGGACAGCGCGAGGGACATACTTGTGGCCGG	325		
Query 138	AAGCCTGGACAGGAA - CGCGTCAATAAAGCTCAGAATTC - GATAGCGGCTGACATGGAAA	195		
Sbjct 324	AAGCCTGGACGGGAAACGCGTCAATACAGCTCAAAAATCCGATCTTGATTGGCATTGGGA	265		
Query 196	TGATTGCAACATGTATTGATTGAACATACCTCGTTGAAGTAGAGGTT CATGCCCTCCAG	255		
Sbjct 264	TGGTTGCATCATGTGCTTATTG - ACATACCTCGTTGAAGTAGAGGTT CATGCCCTCCAG	206		
Query 256	CTGGAGCTCATAAGTCCGTTGTAGCTGTGCAATGTCAATACGTGGCCGGGAGGCGAGA	315		
Sbjct 205	CTGGAGCTCAGAAGTGCCTGTGTAACGTGCCATGTCAATACG - GG - - GA - GACGCGGA	150		
Query 316	GACGGGACGGAGGTACGTACACGCCATTGCTGTCAAGGCCGTGCTCGCCAGAAATGGTTT	375		
Sbjct 149	AACGGGACGGAGGTACGTACACGCCATTGCTGTCAAGGCCGTGCTCGCCAGAGATGGTTT	90		
Query 376	GCCTGTAGTCGAGGTCAGTCTCGATGTTTCAAAAACGGTCGTCGCGCGTGTGTTTGTCTGC	435		
Sbjct 89	GCCTGTAGTCGAGGTCAGTCTTGTGTTTCAAAC - CGGTCCTCGCGCGTGTGTTGCTGC	31		
Query 436	GATGGTCAAGCTGGTACGACCCATAAAGCA	465		
Sbjct 30	GGCGGTCAAGCTGGTACGACCCAGAAAGCA	1		

Figura 17. Allineamento della sequenza della regione beta-tubulin ottenuto con il programma BLAST. In alto a destra è possibile osservare i valori di similarità della sequenza con quelle presenti nel database, mentre in basso il confronto con la sequenza più vicina.

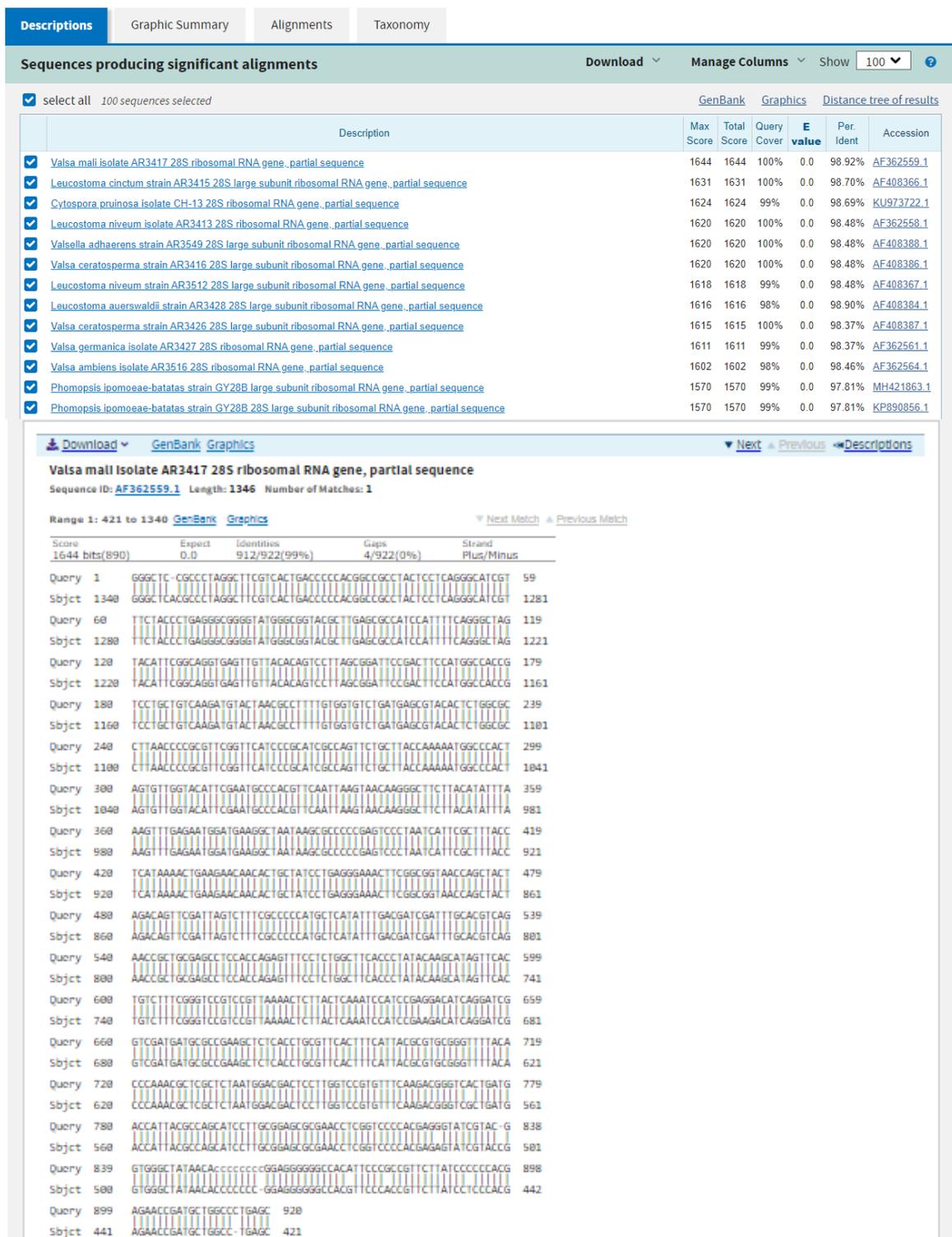


Figura 18. Allineamento della sequenza della regione Large subunit ottenuto con il programma BLAST. In alto a destra è possibile osservare i valori di similarità della sequenza con quelle presenti nel database, mentre in basso il confronto con la sequenza più vicina.

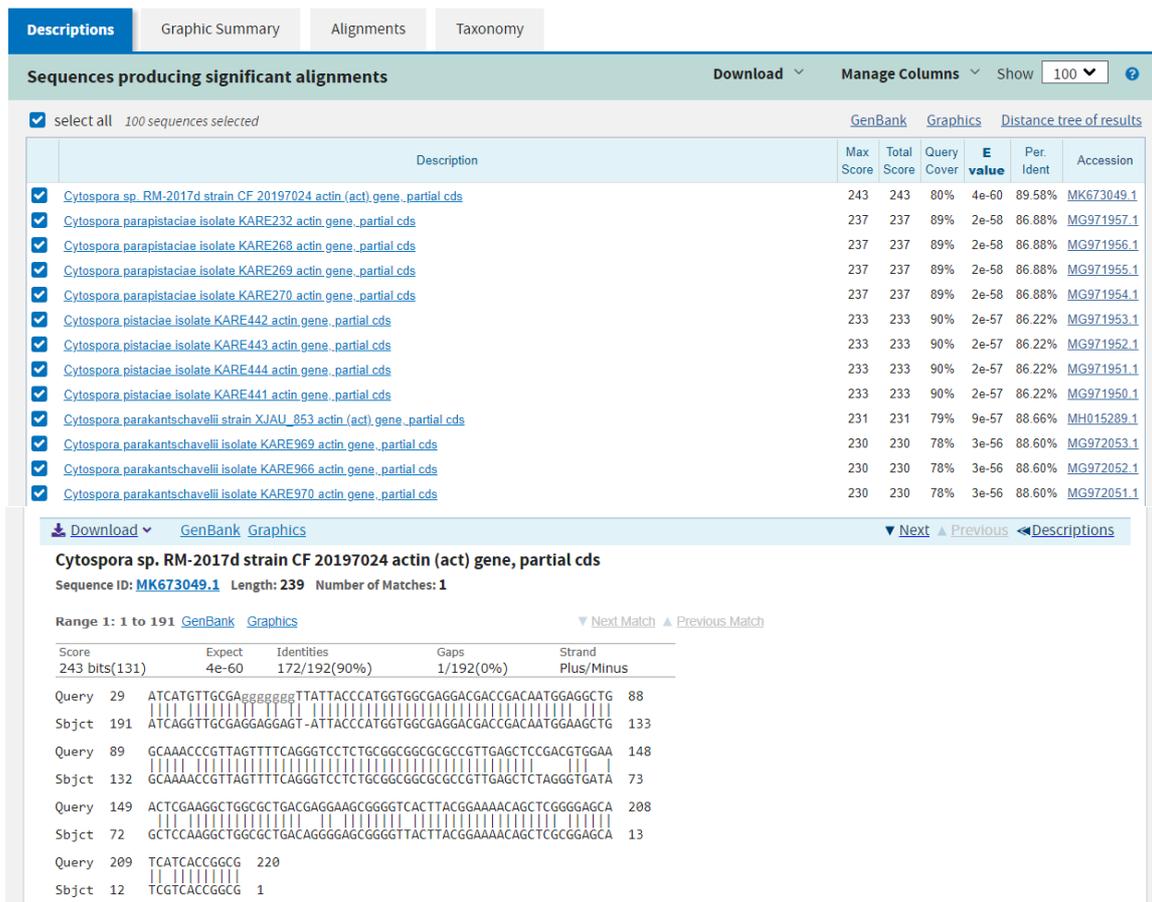


Figura 19. Allineamento della sequenza della regione partial actin ottenuto con il programma BLAST. In alto a destra è possibile osservare i valori di similarità della sequenza con quelle presenti nel database, mentre in basso il confronto con la sequenza più vicina.

4.3.2. Patogenicità

Nella prima prova condotta in laboratorio su semenzali di due anni di età, le piante non hanno manifestato sintomi di malattia sia sui controlli che su quelle inoculate con la specie di *Cytospora* sp. Da una analisi distruttiva della corteccia intorno al punto di inoculazione i tessuti floematici e legnosi sono risultati asintomatici in entrambi i casi. Inoltre, dagli isolamenti effettuati su PDA non è stato possibile re-isolare il fungo inoculato.

Nel secondo esperimento condotto in bosco i rami inoculati con il ceppo fungino di *Cytospora* sp. presentavano dei sintomi riconducibili a una perdita di turgore nelle foglie situate nella parte distale del punto di infezione e in alcuni casi di disseccamento. Al contrario i rami inoculati con un dischetto di PDA non hanno manifestato nessun sintomo di malattia. Dall'analisi distruttiva in laboratorio dei rami sintomatici è stata rilevata la presenza di lesioni necrotiche nei tessuti legnosi intorno al punto di inoculazione con una lunghezza

media pari a 30 mm (Fig. 14). Inoltre in corrispondenza del punto di inoculazione è stato spesso riscontrata la formazione di tessuto cicatriziale. *Cytospora* sp. è stata re-isolata con successo dai tessuti sintomatici (legno e corteccia) di quasi tutti i rami inoculati, completando così i postulati di Koch. I dieci rami testimoni, inoculati solo con un frammento sterile di PDA, sono rimasti asintomatici.



Figura 20. Rami di ginepro fenicio impiegate nei saggi di patogenicità in bosco 3 mesi dopo l'inoculazione. Controllo negativo (a sinistra), presenza del callo cicatriziale in corrispondenza del punto di inoculazione (al centro) e lesione necrotica (a destra).

5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha consentito di ampliare le conoscenze su una problematica fitosanitaria emergente in Sardegna che sta attualmente interessando il ginepro fenicio. In particolare, sia dalla attività di monitoraggio fitosanitario in campo che dalle analisi in laboratorio è stato possibile valutare l'efficacia di interventi di bonifica fitosanitaria effettuati sull'Isola di Budelli. Gli interventi sono stati indirizzati a eliminare tutte le parti delle piante ormai disseccate e che potevano fungere da substrato di crescita e di sporulazione per il fungo patogeno *Diplodia africana*. Le piante di ginepro fenicio hanno tollerato la tipologia degli interventi reagendo spesso attraverso il ricaccio di nuovi germogli in corrispondenza dei tagli che talvolta hanno interessato anche il fusto principale. Il tasso di mortalità riscontrato all'interno dell'area pilota è risultato basso dopo il primo anno (inferiore al 2%) e quasi nullo nel secondo anno, dove solo una pianta è disseccata. Tuttavia, tra il primo e il secondo anno è stato rilevato un aumento significativo di piante sintomatiche, ovvero piante che presentavano disseccamenti dei getti apicali spesso associati alla presenza di cancri resinosi.

L'efficacia degli interventi è stata inoltre dimostrata da una riduzione significativa del quantitativo di inoculo all'interno dell'area pilota, sia nel confronto tra aree trattate e non sull'Isola di Budelli e, in particolar modo, sia nel confronto con aree fortemente infestate come l'Isola di Caprera. Tale riduzione è senz'altro legata alla mancanza di substrati come la corteccia dei rami o bacche disseccate in cui il fungo sporula abbondantemente. La presenza di nuovi fenomeni di disseccamento potrebbe portare a un incremento del quantitativo di inoculo con conseguente aumento delle infezioni. Pertanto, è importante proseguire l'attività di monitoraggio fitosanitario al fine di prevenire l'insorgenza di nuovi focolai infettivi.

Dagli isolamenti su piastra dal materiale presente nei vetrini è emersa una notevole variabilità delle colonie fungine sviluppatesi. Le successive analisi di identificazione, anche a livello biomolecolare, hanno consentito di rilevare la presenza di *Diplodia africana* e di altre specie fungine, alcune delle quali mai segnalate su ginepro. Inaspettatamente dalle indagini in laboratorio è emersa la presenza di una specie fungina sconosciuta alla scienza e che è stata in parte caratterizzata sia attraverso l'analisi dei caratteri morfologici che molecolari. Il fungo è stato rinvenuto frequentemente sia dai vetrini, dimostrando la sua capacità di sporulare su ginepro, sia da lesioni necrotiche e resinose. Sulla base dell'analisi delle sequenze di ben 5 regioni geniche è stato possibile classificare questa specie all'interno del genere *Cytospora*. Ulteriori indagini a livello filogenetico ed epidemiologico sono

attualmente in corso al fine di caratterizzare la specie fungina e il suo eventuale coinvolgimento fenomeni di disseccamento del ginepro.

A tal proposito, i saggi di patogenicità hanno fornito dati contrastanti; nei primi test effettuati in laboratorio il fungo non è stato in grado di colonizzare i tessuti legnosi di giovani semenzali in vaso, mentre nella prova di campo è stata riscontrata una certa aggressività del fungo nei confronti del ginepro, causando dei piccoli cancri a livello corticale e lesioni necrotiche nei tessuti legnosi. Ai cancri erano spesso associati i tipici sintomi di ingiallimento e disseccamento dei rami apicali. I dati ottenuti suggeriscono il possibile ruolo svolto dalle condizioni di stress delle piante nel reagire alle infezioni di questo patogeno.

Le analisi del DNA ambientale potrebbero fornire informazioni interessanti sul quantitativo di DNA presente per ciascuna specie fungina rilevata ed eventuali interazioni, anche sinergiche, tra di esse.

L'attività condotta sull'isola di Budelli ha fornito per il momento risultati senz'altro incoraggianti che suggeriscono di continuare le sperimentazioni per verificare l'efficacia degli interventi fitosanitari contro il disseccamento del ginepro, in particolare attraverso un'attenta e costante attività di monitoraggio fitosanitario dell'area. Inutile sottolineare l'importanza di prevenire ulteriori introduzioni del fungo, soprattutto in questa fase di ripresa vegetativa delle piante, attraverso una gestione dell'area che includa la sensibilizzazione del pubblico sui rischi connessi alla diffusione del patogeno, che ancora persiste nell'area sebbene con quantitativi di inoculo significativamente più bassi rispetto al passato.

4. BIBLIOGRAFIA

- Arrigoni P.V. 1968. Fitoclimatologia della Sardegna, Fondazione F. Parlatore.
- Brasier C.M. 1992. Mortalità delle querce in Iberia. *Nature* 360: 539.
- Camarda, I.; Laureti, L.; Angelini, P.; Capogrossi, R.; Carta, L.; Brunu, A. Il Sistema Carta della Natura della Sardegna; ISPRA: Roma, Italy,
- Carbone I., Kohn L. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- Fan X.L., Bezerra J.D.P., Tian C.M., Crous P.W. 2020. *Cytospora* (*Diaporthales*) in China. *Persoonia* 45, 2020: 1–45
- Glass N.L., Donaldson G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323–1330.
- Liebhold A.M., Brockerhoff E.G., Garrett L.J., Parke J.L., O Britton K. 2012. Live plant imports: the major pathway for forest insect and pathogen invasions of the US. *Frontiers in Ecology and Environment* 10: 135–143.
- Linaldeddu B.T., Scanu B., Maddau L., Franceschini A. 2011. *Diplodia africana* causing dieback on *Juniperus phoenicea*: a new host and first report in the northern hemisphere. *Phytopatholog. Mediterr.* 50, 473–477.
- Liu Y.J., Whelen S., Hall B.D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799–1808.
- Santini A., Ghelardini L., De Pace C., Desprez-Loustau M.L., Capretti P., Chandelier A., Cech T., Chira D., Diamandis S., Gaitniekis T., Hantula J., Holdenrieder O., Jankovsky L., Jung T., Jurc D., Kirisits T., Kunca A., Lygis V., Malecka M., Marcais B., Schmitz S., Schumacher J., Solheim H., Solla A., Szabó I., Tsopelas P., Vannini A., Vettraino A.M., Webber J., Woodward S., Stenlid J., 2013. Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. *New Phytol.* 197, 238–250.
- Sturrock R.N., Frankel S.J., Brown A.V., Hennon P.E., Kliejunas J.T., Lewis K.J., Worrall J.J., Woods A.J. 2011. Climate change and forest diseases. *Plant Pathol.* 60, 133–149.
- Vilgalys R., Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.