



Università degli Studi di Sassari



**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
Scienze dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari**

Indirizzo Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente
Mediterraneo

Ciclo XXIII

**Il deperimento della componente arborea e
arbustiva nell'Isola di Caprera: caratterizzazione
della sindrome e studi eziologici**

Dott.ssa Annalisa Zanda

Direttore della Scuola:	Prof. Giuseppe Pulina
Referente di Indirizzo:	Prof. Antonio Franceschini
Docente Guida:	Prof. Antonio Franceschini
Tutor:	Dott. Benedetto T. Linaldeddu

Anno accademico 2010-2011

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1 MALATTIE EMERGENTI NEGLI ECOSISTEMI FORESTALI	” 03
1.2 LE <i>BOTRYOSPHAERIACEAE</i>	” 06
1.2.1 Tassonomia	” 06
1.2.2 Ecologia	” 08
1.2.3 Mezzi di lotta	” 11
1.3 L'ISOLA DI CAPRERA	” 14
2. SCOPO DELLA TESI	” 16
3. MATERIALI E METODI	” 18
3.1 SITI D'INDAGINE, RILIEVI FITOSANITARI E PRELIEVO DEI CAMPIONI	” 18
3.1.1 Indagini nei popolamenti di corbezzolo	” 19
3.1.2 Indagini nei popolamenti di ginepro fenicio	” 19
3.1.3 Indagini nei popolamenti di leccio	” 19
3.2 ISOLAMENTO DEI PATOGENI	” 21
3.3 IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI PATOGENI	” 22
3.3.1 Identificazione su base morfologica	” 22
3.3.2 Identificazione su base genetica	” 23
3.3.3 Saggi di crescita	” 25
3.4 SAGGI DI PATOGENICITÀ	” 26
3.5 ELABORAZIONE DEI DATI	” 28

4. RISULTATI	pag. 29
4.1 INDAGINE NEI POPOLAMENTI DI CORBEZZOLO	” 29
4.1.1 Sintomatologia	” 29
4.1.2 Identificazione e caratterizzazione del patogeno	” 31
4.1.3 Saggi di patogenicità	” 33
4.2 INDAGINE NEI POPOLAMENTI DI GINEPRO FENICIO	” 34
4.2.1 Sintomatologia	” 34
4.2.2 Identificazione e caratterizzazione dei patogeni	” 35
4.2.3 Saggi di patogenicità	” 43
4.3 INDAGINE NEI POPOLAMENTI DI LECCIO	” 45
4.3.1 Sintomatologia	” 45
4.3.2 Identificazione e caratterizzazione dei patogeni	” 49
4.3.3 Saggi di patogenicità	” 56
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	” 59
6. BIBLIOGRAFIA	” 67
7. RIASSUNTO	” 79
ABSTRACT	

Il deperimento della componente arborea e arbustiva nell'Isola di Caprera: caratterizzazione della sindrome e studi eziologici

1. INTRODUZIONE

Gli ecosistemi boschivi in ambiente mediterraneo rivestono una notevole importanza sia sotto il profilo ecologico che paesaggistico. Oggigiorno, oltre alle naturali funzioni di protezione idrogeologica del territorio e di mitigazione degli effetti causati dai cambiamenti climatici, essi hanno assunto una crescente valenza anche sotto il profilo ricreativo e di educazione ambientale.

In Sardegna le principali formazioni boschive sono costituite da popolamenti puri o misti di querce (leccio, roverella e quercia da sughero) e da specie tipiche della macchia mediterranea, tra le quali il corbezzolo, l'erica, la fillirea, il ginepro e il lentisco. Le condizioni fitosanitarie di questi ecosistemi nel corso degli ultimi decenni sono progressivamente peggiorate a causa della recrudescenza di attacchi parassitari e, soprattutto, della crescente diffusione di fenomeni noti col termine di "deperimento del bosco". A ciò hanno probabilmente contribuito le modificazioni climatiche verificatesi in ambiente mediterraneo che hanno comportato un incremento sia delle temperature medie annuali, sia della frequenza di eventi estremi, come l'eccesso di piovosità nei mesi invernali e la prolungata aridità nel periodo primaverile-estivo.

Tali condizioni, da un lato inducono nelle piante, in particolare in quelle forestali, stati di stress idrico che ne limitano la tolleranza alle avversità, dall'altro lato influenzano la bio-ecologia di molti parassiti accrescendone la

dannosità (Desprez-Loustau *et al.*, 2006). Un ampio spettro di organismi fitopatogeni può trarre vantaggio indiretto dalle modificazioni climatiche che debilitano le piante ospiti; fra questi, in ambito forestale, troviamo specie appartenenti: ai generi *Armillaria* e *Phytophthora*, agenti di marciumi radicali, e ai generi *Biscogniauxia*, *Diplodia*, *Discula* e *Phoma*, agenti di cancri e disseccamenti (Franceschini *et al.*, 2004; Slippers e Wingfield, 2007; La Porta *et al.*, 2008; Linaldeddu *et al.*, 2011).

In aggiunta, le elevate temperature operano una selezione delle entità patogene più termofile capaci, nelle condizioni alterate, di esplicare tutta la loro virulenza e di riprodursi ad un tasso più elevato, disperdendo nell'ambiente un carico di inoculo maggiore (Franceschini *et al.*, 2008). Tali patogeni, definiti "emergenti", rappresentano una minaccia per la biodiversità ed il funzionamento degli ecosistemi, in quanto influenzano l'abbondanza numerica e la composizione genetica delle popolazioni delle piante ospiti (Anderson *et al.*, 2004).

Di conseguenza, sempre più spesso si assiste alla comparsa di eventi morbosi epidemici anche su specie vegetali endemiche, e quindi maggiormente resistenti alle avversità, come quelli che di recente sono stati osservati nei popolamenti forestali dell'Isola di Caprera, e che costituiscono l'argomento delle indagini svolte per questa tesi di Dottorato di Ricerca.

Di seguito, prima di esporre più in dettaglio gli obiettivi delle ricerche effettuate, le metodiche utilizzate e i risultati ottenuti, si riferisce in breve sulle attuali problematiche fitosanitarie negli ecosistemi forestali mediterranei, sulle *Botryosphaeriaceae* e su alcuni aspetti fitogeografici dell'Isola di Caprera.

1.1 MALATTIE EMERGENTI NEGLI ECOSISTEMI FORESTALI

Un ecosistema può essere definito come un'unità ambientale complessa risultante dall'adattamento di una collettività di specie diverse (biocenosi) ad un determinato ambiente (biotopo). Negli ecosistemi naturali in equilibrio cioè quelli in cui la catena alimentare si chiude e le relazioni ecologiche fra gli organismi viventi sono armoniche, le malattie delle piante non rappresentano un evento nefasto, ma contribuiscono attivamente alla successione vegetale eliminando le piante meno vigorose (Manion, 1991). In questo contesto si inquadrano le malattie endemiche, causate dai vari parassiti che nel tempo si sono co-evoluti con i loro ospiti nei diversi ecosistemi forestali.

La "rottura" della condizione di equilibrio di un ecosistema può dipendere da cause differenti, antropiche e/o naturali e innescare fenomeni degenerativi che possono evolvere in vere e proprie epidemie.

Particolarmente pericolose per gli ecosistemi naturali e semi-naturali possono essere le conseguenze dell'introduzione in un determinato ambiente di patogeni esotici che, non trovando limitatori naturali, possono svilupparsi, riprodursi e diffondersi in forma epidemica e allo stesso tempo infettare nuovi ospiti potenziali (Desprez-Loustau *et al.*, 2007). L'introduzione di tali patogeni in ambiti agrari o forestali è progressivamente aumentata nel corso degli ultimi anni, soprattutto in seguito all'incremento del commercio globale di piante (Brasier, 2008). Un esempio in tal senso è rappresentato dal fungo *Diplodia scrobiculata*, presente come endofita di equilibrio nell'areale d'origine del *Pinus radiata* in California (USA), e divenuto aggressivo sullo stesso ospite e altre conifere in Europa e Sud Africa (Burgess *et al.*, 2004; Linaldeddu *et al.*, 2006; Bihon *et al.*, 2010).

Nonostante l'importanza economica dei danni causati dai patogeni esotici, le informazioni sul loro numero, natura e vie di introduzione restano ancora scarse e frammentarie. In tabella 1 è riportato un elenco di patogeni esotici invasivi recentemente censiti in alcune regioni del pianeta.

Inoltre, i patogeni possono migrare per vie naturali e/o acclimatarsi in un nuovo ambiente in seguito ai mutamenti del clima. Un esempio attuale è fornito

dal fungo xylariaceo *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze, agente del “cancro carbonioso”, che sta progressivamente espandendo il suo areale di diffusione dall’area mediterranea verso il centro Europa, infettando varie specie quercine e altre latifoglie (Desprez-Loustau *et al.*, 2006; Jurc e Ogris, 2006).

Altri patogeni, quali *Chalara fraxinea* T. Kowalski, agente di disseccamenti e morie su *Fraxinus* spp., e *Phytophthora alni* Brasier & S.A. Kirk, agente di morie su *Alnus* spp., entrambi segnalati inizialmente in diversi paesi dell’Europa centrale, stanno ora rapidamente diffondendosi verso l’area Mediterranea inclusa l’Italia (Ogris *et al.*, 2010; Solla *et al.*, 2010).

Tabella 1. Elenco di specie aliene (invasive) censite nelle banche dati online (adattato da Desprez-Loustau *et al.*, 2007).

Regione	Lista	Funghi	Totale*	Fonte
Austria	Neobiota (invasive)	83	1704	Essl e Rabitsch (2002)
Inghilterra	Non-native species	198	2722	Hill <i>et al.</i> , (2005)
India	Invasive species	5	104	http://www.ncbi.org.in/invasive/search/index.html
Lettonia	Alien species	7	781	http://lv.invasive.info/
Lituania	Invasive species	98	669	http://www.ku.lt/lisd/
Nord-baltico	Alien species	98	5503	http://sns.dk/nobanis/
Polonia	Alien species	81	611	http://www.iop.krakow.pl/ias/
Svizzera	Alien species (invasive)	(6)	800	Wittenberg, (2005)
Usa	Invasive species	38	680	http://www.invasive.org
Mondo	Global invasive species	9	319	http://www.issg.org/database/welcome/

*) Include vari organismi (funghi, piante, insetti, ecc.)

Le modificazioni climatiche possono inoltre alterare profondamente gli equilibri ecologici in molti ecosistemi e potenzialmente favorire la diffusione epidemica delle specie fungine patogene che possiedono una maggiore capacità adattativa. In tale contesto si inseriscono numerose specie di

Botryosphaeriaceae che grazie alla loro capacità di trascorrere periodi di latenza nelle piante ospiti possono avvantaggiarsi prima di altri microrganismi delle modificazioni fisiologiche indotte dagli stress ambientali alle piante ospiti (Desprez-Loustau *et al.*, 2006; Slippers e Wingfield 2007). Un recente esempio a riguardo è rappresentato dall'attacco epidemico di *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. su carpino nero, verificatosi in Slovenia e in Italia, in seguito alla prolungata siccità registrata in tutta Europa nel corso del 2003 (Piškur *et al.*, 2011). Pertanto, al fine di contrastare l'ulteriore diffusione di questi patogeni negli ecosistemi agro-forestali è di fondamentale importanza ampliare le conoscenze sulla loro bio-ecologia, patogenicità e diversità intraspecifica.

1.2 LE *BOTRYOSPHAERIACEAE*

Le *Botryosphaeriaceae* Theiss. e P. Syd. sono una famiglia di funghi ascomiceti appartenenti all'ordine *Botryosphaeriales* Schoch, Crous & Shoemaker. Secondo una recente stima, le *Botryosphaeriaceae* includono oltre 1500 specie (Damm *et al.*, 2007). Tuttavia, nel corso degli ultimi anni molte specie appartenenti a questa famiglia, in particolare quelle già riportate in rapporto metagenetico con *Botryosphaeria* Ces. & De Not., sono state oggetto di una profonda revisione tassonomica e sistematica che ha portato alla descrizione di nuove specie e generi, grazie soprattutto all'impiego di tecniche di biologia molecolare (Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008). Poiché la sistematica di questi microrganismi è tutt'ora in evoluzione, si precisa per motivi di chiarezza che in questa tesi vengono considerate *Botryosphaeriaceae* le specie afferenti ai generi *Diplodia* Fr., *Dothiorella* Sacc., *Fusicoccum* Corda, *Lasiodiplodia* Ellis & Everh. e *Neofusicoccum* Crous, Slippers & A.J.L. Phillips.

1.2.1 Tassonomia

Le *Botryosphaeriaceae* includono funghi caratterizzati da ascomi mono o pluriloculari e aschi dotati di doppia parete. In passato numerosi generi di anamorfi (oltre 20), inseriti nei funghi *Coelomyces*, sono stati associati alla forma teleomorfa *Botryosphaeria* e, tra questi, i più comuni appartengono agli attuali generi *Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, *Lasiodiplodia* e *Neofusicoccum* (Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008).

Denman e collaboratori (2000), in un'opera di revisione del genere *Botryosphaeria* e degli stadi anamorfici correlati, hanno proposto di ridurre a due generi (*Fusicoccum* e *Diplodia*) gli anamorfi in rapporto metagenetico con *Botryosphaeria*. Questi due generi si differenziano principalmente sulla base delle caratteristiche morfologiche dei conidi: le specie inserite nel genere *Fusicoccum* presentano conidi ialini, fusiformi con una larghezza mediamente minore di 10 µm, mentre le specie appartenenti al genere *Diplodia*, sono caratterizzate da conidi più larghi (media >10 µm), con parete spessa (0,5-2 µm). Tuttavia, questa visione così restrittiva si è rivelata col tempo non

esauriente dal punto di vista sia morfologico che genetico per spiegare la diversità delle specie afferenti a questo raggruppamento. Pertanto, nel corso degli ultimi anni sono stati nuovamente legittimati alcuni generi quali *Lasiodiplodia* e *Dothiorella* e, allo stesso tempo, ne sono stati descritti dei nuovi. In particolare, alcune specie un tempo afferenti al genere *Fusicoccum*, che presentano come sinamorfo lo stadio *Dichomera* sono state inserite nel nuovo genere *Neofusicoccum* (Crous *et al.*, 2006).

L'identificazione di questi microrganismi su base morfologica è basata principalmente sull'analisi dei caratteri dei propaguli agamici, in particolare sulla tessitura, colore, presenza o assenza di striature, numero di setti e rapporto lunghezza/larghezza dei conidi. Infatti, le forme sessuate, quali aschi e ascospore, pur possedendo caratteri relativamente stabili nelle varie specie, sono caratterizzate da valori biometrici spesso troppo simili per cui il loro esame non sempre è utile ai fini dell'identificazione. Inoltre, in natura e/o in coltura esse si differenziano solo raramente, al contrario delle strutture delle forme imperfette.

L'identificazione di questi funghi su base morfologica risulta spesso complicata e non consente di stimare la reale diversità tra le specie (Taylor *et al.*, 2000; Slippers e Wingfield, 2007). Tuttavia, i recenti progressi compiuti nell'ambito della biologia molecolare hanno permesso negli ultimi anni di fare notevoli passi avanti per quanto riguarda la caratterizzazione e l'identificazione delle specie appartenenti a questa famiglia. In particolare, l'analisi delle sequenze delle regioni geniche ITS dell'rDNA e del gene del fattore di allungamento della traduzione EF1- α si sono dimostrate uno strumento informativo valido per l'identificazione di questi microrganismi a livello di specie (Phillips *et al.*, 2005; Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008).

1.2.2 Ecologia

Le specie afferenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae* occupano le più disparate nicchie ecologiche in tutte le regioni temperate, tropicali e subtropicali del mondo. Esse sono in grado di infettare una vasta gamma di piante ospiti: mono e dicotiledoni, angiosperme e gimnosperme. Le loro infezioni possono causare sintomi quali disseccamenti, cancri e marciumi, dando luogo a vere e proprie epidemie (Slippers e Wingfield, 2007). In alcuni casi sono considerati deboli patogeni o funghi opportunisti che causano malattie negli ospiti che vegetano in condizioni di stress, ma sempre più spesso evidenze sperimentali suggeriscono che alcune specie afferenti a questa famiglia sono dei patogeni primari. Altre specie sono riportate in letteratura come endofiti asintomatici e/o epifiti saprotrofi.

Le *Botryosphaeriaceae* hanno una disseminazione principalmente aerea. Solo pochi studi riportano gli insetti come vettori di propaguli di *Botryosphaeriaceae* (Feci *et al.*, 2002). Gli ascomi, ma soprattutto i picnidi della forma imperfetta, possono essere prodotti su moltissime piante arboree, coltivate e spontanee. I conidi possono essere rilasciati durante tutto l'anno. In un recente studio condotto in un bosco di quercia da sughero deperiente è stato osservato che i picchi di infezione si riscontrano alla fine della primavera e all'inizio dell'autunno (Linaldeddu *et al.*, 2010a).

L'elevato e sempre crescente numero di piante ospiti segnalato per le specie di *Botryosphaeriaceae*, complica gli studi epidemiologici su questi patogeni, in quanto l'inoculo presente in un determinato ecosistema può avere origini molteplici. È stato inoltre dimostrato che le diverse specie hanno bisogno di condizioni climatiche differenti per formare le strutture riproduttive; quindi, un'ampia gamma di condizioni ambientali possono favorire le infezioni di *Botryosphaeriaceae* (Copes e Hendrix, 2004).

Sebbene l'importanza ecologica delle *Botryosphaeriaceae* sia nota da tempo, solo negli ultimi venti anni è stata dedicata una crescente attenzione allo studio delle malattie causate da questi microrganismi. Ciò ha portato ad un

incremento esponenziale delle informazioni sulla loro bio-ecologia, ma anche al proliferare di nuove specie.

Tra i micologi dell'800 era opinione comune che molte specie fungine, tra le quali anche alcune *Botryosphaeriaceae*, fossero ospite specifiche o, comunque, in grado di infettare un numero limitato di ospiti; di conseguenza, numerose specie sono state descritte sulla base della loro specificità d'ospite. Tra queste figurano *Botryosphaeria quercuum* (Schwein.) Sacc su *Quercus* sp., *B. ribis* Grossenb. & Duggar su *Ribes* sp. (Slippers e Wingfield, 2007).

Studi più recenti hanno dimostrato un basso grado di specializzazione di molte specie di *Botryosphaeriaceae* e alcune di esse, come *N. parvum* e *D. seriata*, risultano essere addirittura altamente polifaghe (Slippers *et al.*, 2004a, Linaldeddu *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2007; Slippers e Wingfield, 2007; de Wet *et al.*, 2008). Allo stesso tempo, alcune specie sono maggiormente associate a certi generi di ospiti o a specifiche famiglie vegetali presenti in un determinato ambiente, come ad esempio *Diplodia pinea* e *D. scrobiculata* su *Pinus* spp. e occasionalmente su altre conifere, *Diplodia cupressi* su *Cupressaceae* (Alves *et al.*, 2006; de Wet *et al.*, 2008).

Le specie polifaghe sono spesso quelle che causano i danni economicamente più rilevanti anche in virtù della loro ampia distribuzione geografica. Fra queste *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia pinea*, *Lasiodiplodia theobromae* “*sensu lato*” e *Neofusicoccum parvum* si segnalano per la loro virulenza (van Niekerk *et al.*, 2004; de Wet *et al.*, 2008; Urbez-Torres e Gubler, 2011). Le specie polifaghe possiedono inoltre un'elevata adattabilità ecologica, in quanto la loro sopravvivenza in un determinato ambiente non è influenzata dalla presenza di un ospite specifico.

Oltre alla capacità di infettare un numero elevato di piante ospiti, per numerose *Botryosphaeriaceae* è stata accertata anche la capacità di colonizzare in modo asintomatico come endofiti le piante forestali.

A tal riguardo, è ormai appurato che la maggior parte, se non la totalità, delle piante convivono con una moltitudine di microrganismi che assolvono differenti funzioni negli ecosistemi forestali (Stone *et al.*, 1996; Arnold *et al.*,

2003; Sieber, 2007). Tra questi microrganismi si annoverano gli endofiti (dal greco “*endon*” dentro e “*phyton*” pianta). Essi costituiscono comunità specifiche per ospiti ed ambiente (Collado *et al.*, 1999).

Il comportamento endofitico delle *Botryosphaeriaceae* è stato scoperto solo di recente ma richiama una crescente attenzione. *Diplodia pinea* (sin.: *Sphaeropsis sapinea*), importante patogeno delle conifere, è stato isolato da piante asintomatiche appartenenti al genere *Pinus* (Petrini e Fisher, 1988). Qualche anno più tardi diverse specie appartenenti ai generi *Fusicoccum*, *Neofusicoccum*, e *Lasiodiplodia* sono state isolate da piante di mango apparentemente sane (Johnson *et al.*, 1992; Slippers e Wingfield, 2007). Da allora numerose altre specie sono state isolate e descritte come patogeni ad *habitus* endofitico. Alcune di esse rappresentano gli organismi dominanti tra le comunità di funghi endofiti che si trovano su diverse specie forestali quali eucalipto, querce e pino (Smith *et al.*, 1996a,b; Linaldeddu *et al.*, 2011).

Spesso i termini patogenicità ed endofitismo coesistono e si confondono con l'espressione “patogeni con una fase latente”.

Il passaggio da una fase di latenza a una di virulenza è di frequente associato al verificarsi di condizioni di stress per le piante (Schoeneweiss, 1981; Swart e Wingfield, 1991; Blodgett *et al.*, 1997; Desprez-Loustau *et al.*, 2006). Le condizioni di stress ambientale che possono favorire le infezioni da *Botryosphaeriaceae* sono molteplici e includono: stress idrico (Paoletti *et al.*, 2001), danni meccanici causati da fenomeni atmosferici (grandine, gelate, vento) (Zwolinski *et al.*, 1990), danni da insetti (Feci *et al.*, 2003), e inquinamento da ozono (Paoletti *et al.*, 2007).

Per lungo tempo le *Botryosphaeriaceae* sono state considerate patogeni da ferita (von Arx e Müller, 1954; Smith *et al.*, 1994). Recentemente è stato dimostrato che alcune specie sono in grado di dare inizio al processo infettivo su piante sane penetrando attivamente nei tessuti o sfruttando le aperture naturali delle piante quali lenticelle e stomi (Paoletti *et al.*, 2007; Linaldeddu *et al.*, 2010a). Tutte le parti della pianta, compresa la corteccia e lo xilema di fusti,

branche e rami, possono essere infettati e colonizzati da questi microrganismi (Johnson *et al.*, 1992; Linaldeddu *et al.*, 2010a; Amponsah *et al.*, 2011).

Le infezioni possono interessare anche il materiale di propagazione inclusi i semi. A tal riguardo indagini condotte su semi di *Pinus* spp. hanno evidenziato la presenza di infezioni latenti di *Lasiodiplodia theobromae* e *D. pinea* (Cilliers *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996a). Il trasporto di semi e materiale infetto ha probabilmente contribuito alla diffusione di questi patogeni da un emisfero all'altro come nel caso di *D. pinea* e *D. scrobiculata* (Bihon *et al.*, 2010).

Molto comuni sono anche le infezioni di *Botryosphaeriaceae* sui frutti; queste infezioni provocano marciumi sia prima che dopo la raccolta, causando consistenti perdite economiche (Lazzizzera *et al.*, 2008; Amponsah *et al.*, 2011).

Sebbene a tutt'oggi siano ancora limitate le informazioni sui fattori di patogenicità e di virulenza che regolano le interazioni tra questi patogeni e i loro ospiti, è plausibile ipotizzare un possibile coinvolgimento nella patogenesi di sostanze fitotossiche. A tale riguardo, studi recenti svolti su *Diplodia corticola* hanno consentito di accertare la capacità di questo microrganismo di produrre in coltura liquida diversi metaboliti secondari, alcuni dei quali dotati di attività fitotossica. Tra questi sono stati caratterizzati: un nuovo tetraidropiranpiran-2-one, denominato diplopirone, di cui è stata determinata la configurazione assoluta (Evidente *et al.*, 2003; Giorgio *et al.*, 2005), e due diterpeni pimarani fitotossici, la sferopsidina A e C (Maddau *et al.*, 2006). Queste ultime fitotossine sono prodotte anche da *Diplodia cupressi* e *D. mutila*, due *Botryosphaeriaceae* agenti di disseccamenti su cipresso (Evidente *et al.*, 1997); di esse è stata accertata altresì un'attività antifungina nei confronti di importanti funghi patogeni, quali *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* e *Verticillium dahliae* (Sparapano *et al.*, 2004).

1.2.3 Mezzi di lotta

Come è ben noto una strategia di lotta razionale ed efficace prevede una approfondita conoscenza della malattia e del suo agente patogeno, quindi delle

modalità di moltiplicazione e diffusione, del processo infettivo e dell'influenza che le condizioni ambientali esercitano su entrambi.

Le ancora limitate conoscenze sulla bio-ecologia di molte *Botryosphaeraceae* rende molto difficile l'adozione di un corretto piano fitoiatrico. L'elaborazione di una strategia di difesa adeguata è resa ancora più difficoltosa dal fatto che queste fitopatie si sviluppano lentamente e i sintomi si manifestano in modo improvviso. È possibile che quando compaiono i primi sintomi su una pianta un numero molto più ampio di individui sia già infetto ma ancora asintomatico. A tal riguardo, anche gli attuali sistemi di quarantena non sono efficienti nell'individuare i patogeni latenti che vivono endofiticamente in materiale asintomatico per un periodo prolungato di tempo.

Le *Botryosphaeriaceae* forniscono un eccellente esempio di questa lacuna diagnostica. Allo stesso tempo, pur se molte specie di *Botryosphaeriaceae* causano ingenti danni a piante di interesse sia agrario che forestale, nessuna è attualmente inserita nelle liste A1 e A2 dell'*European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO), organismo responsabile della cooperazione internazionale nel settore della difesa fitosanitaria nella regione Europea e Mediterranea, che sin dagli anni '70 del secolo scorso, fornisce un elenco dei patogeni da quarantena (<http://www.eppo.org>).

Dal punto di vista fitoiatrico, vari composti chimici in commercio si sono rilevati efficaci contro alcune specie di *Botryosphaeriaceae*. Un recente, studio sul controllo chimico delle infezioni di *Diplodia corticola* su quercia da sughero condotto in Spagna, ha messo in evidenza come composti quali il benomil, carbendazim, tiofanato metile e ciprodinil + fludioxonil sono fungicidi efficaci nel contrastare e limitare le infezioni di *D. corticola* sul fusto delle piante subito dopo la decortica (Luque *et al.*, 2008). Tuttavia, molti dei principi attivi impiegati dai ricercatori spagnoli nel corso delle loro indagini, attualmente non possono più essere impiegati in Europa. In letteratura solo poche indagini riferiscono sul controllo chimico delle *Botryosphaeriaceae* e riguardano principalmente il controllo di infezioni su piante ornamentali (Wills e Lambe 1985; Denman *et al.*,

2004), fruttiferi (Li *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 2002) e specie arboree forestali (Stanosz e Smith, 1996).

Di recente, promettenti risultati per il controllo delle specie di *Botryosphaeriaceae* associate al deperimento delle querce sono stati ottenuti utilizzando funghi endofiti antagonisti (Campanile *et al.*, 2007; Linaldeddu *et al.*, 2007a; Maddau *et al.*, 2009). Tuttavia, considerati i tempi relativamente lunghi necessari all'autorizzazione e registrazione di un bio-formulato, per contrastare nel breve periodo la crescente diffusione di fenomeni di deperimento negli ecosistemi forestali, devono essere senz'altro privilegiati gli interventi preventivi volti ad abbattere il potenziale d'inoculo dei patogeni in bosco mediante il taglio e la bruciatura di piante o parti di esse deperenti o disseccate.

1.3 L'ISOLA DI CAPRERA

L'Isola di Caprera fa parte dell'arcipelago della Maddalena, un'area marina e terrestre protetta di interesse nazionale e comunitario, situata nella costa Nord-orientale della Sardegna. L'Isola si estende per circa 15,7 km² su un substrato litologico di matrice granitica (leucograniti e monzograniti) con forme del paesaggio piane o ondulate in versanti a gradiente moderato (pendenza 5-8%); la cima più alta è rappresentata dal Monte Teialone (212 m s.l.m.).

Il clima è prettamente bi-stagionale, con un periodo caldo-arido che si alterna a uno freddo-umido. Netta è la correlazione fra caldo e aridità nella stagione estiva, e tra freddo e piovosità nella stagione invernale. La temperatura media annuale è di 17,2°C (Arrigoni, 1968).

Per quanto riguarda le precipitazioni, dai dati pluviometrici dell'ultimo ventennio si evidenzia una piovosità media annua di 681 mm, distribuita principalmente nei mesi invernali (269 mm) e nei mesi autunnali (235 mm), con un numero di giorni piovosi pari a 66.

Tutto il territorio dell'Isola di Caprera è demaniale; vi risiedono solo pochi abitanti nella piccola frazione di Stagnali dove attualmente hanno la sede anche il Centro di Educazione Ambientale del Parco Nazionale dell'Arcipelago di La Maddalena e la Stazione del Corpo Forestale dello Stato al quale è affidato, insieme al Corpo Forestale e di Vigilanza Ambientale della Sardegna, il presidio dell'Isola.

La storia "forestale" dell'Isola di Caprera è abbastanza recente. Il 1 Aprile 1913 l'amministrazione militare, allora "Regia Marina", ordinava al Comando Militare Marittimo di La Maddalena la consegna al Ministero Agricoltura, Industria e Commercio dei terreni demaniali esistenti nell'Isola per essere sottoposti a rimboschimento.

Da allora è iniziata un'importante attività di sistemazione idraulico forestale di quei versanti che ancora oggi, nonostante i danni provocati dagli incendi (i più gravi si verificarono nel 1982 e nel 1993, in entrambi i casi su circa 100 ettari) e dalla fauna selvatica (conigli, cinghiali), ospitano lembi di pineta e di lecceta testimoni di quasi un secolo di interventi del Corpo Forestale.

Nel 1980 l'Isola viene sottoposta a particolare regime di tutela attraverso l'istituzione della "Riserva Naturale Orientata".

Nel 1994 entra a far parte dell'istituendo Parco Nazionale dell'Arcipelago di La Maddalena. Attualmente la gestione forestale dell'Isola è affidata all'Ente Foreste della Sardegna.

L'Isola di Caprera si caratterizza per i suoi molteplici *habitat*, tipici degli ambienti termofili litoranei, delle garighe e delle macchie mediterranee, oltre che dei litorali sabbiosi.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Le recenti ricerche condotte sui fenomeni di “deperimento” e morie di piante che interessano gli ecosistemi naturali, semi-naturali e gli impianti forestali nelle aree temperate del pianeta, sottolineano che alcuni patogeni appartenenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae* stanno assumendo sempre più frequentemente un ruolo preminente sia per l'incidenza elevata con cui ricorrono, sia per la gravità dei danni causati (Sanchez *et al.*, 2003; Linaldeddu *et al.*, 2009a, b, 2010b; Slippers *et al.*, 2009; Begoude *et al.*, 2010; Linch *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2010; Rodas *et al.*, 2010; Dreaden *et al.*, 2011; Golzas e Burgess, 2011; Piskur *et al.*, 2011).

In Sardegna i fenomeni di “deperimento” si sono manifestati finora in tutta la loro gravità principalmente nei boschi di quercia da sughero. Le indagini effettuate negli ultimi 20 anni, in varie formazioni boschive dell'Isola, hanno consentito di chiarire vari aspetti legati alla complessa eziologia di questi fenomeni, e di caratterizzare sotto il profilo fisiologico e patogenetico i principali patogeni fungini che vi sono implicati (Franceschini *et al.*, 1999; Evidente *et al.*, 2003, 2005; Linaldeddu *et al.*, 2009c, 2010a, 2011; Maddau *et al.*, 2011). In particolare, nell'eziologia di cancri e disseccamenti su fusto e branche sono coinvolte 4 specie di *Botryosphaeriaceae*: *Diplodia corticola*, *Diplodia seriata*, *Fusicoccum aesculi* e *Neofusicoccum parvum* (Franceschini *et al.*, 1999; Linaldeddu *et al.*, 2006b, 2007b, 2009b), specie note per essere polifaghe e altamente virulente. Per tutte queste specie è stata accertata la patogenicità su quercia da sughero. Un'altra specie *Dothiorella iberica* A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves ricorre frequentemente come endofita nelle piante di quercia da sughero deperienti (Linaldeddu *et al.*, 2011), tuttavia i saggi di patogenicità hanno escluso la sua virulenza su questo ospite.

Solo di recente è stata riscontrata la presenza di fenomeni di deperimento anche in vari popolamenti di corbezzolo, ginepro fenicio e leccio, della Sardegna, in particolare in un'ampia area boschiva situata nell'Isola di Caprera nel Parco Nazionale dell'Arcipelago di La Maddalena. Qui la loro ampia diffusione e gravità sta compromettendo irreversibilmente la biodiversità della

componente vegetazionale. I risultati di indagini preliminari hanno evidenziato che nell'eziologia della malattia sono coinvolte più specie di *Botryosphaeriaceae* e di *Phytophthora*. Le prime colpiscono le parti aeree delle piante, le seconde gli apparati radicali, delineando quadri eziologici del tutto insoliti e finora mai indagati in ambito mediterraneo.

Pertanto, e vista la grande valenza ecologica delle formazioni boschive coinvolte, assume rilevanza sotto il profilo sia scientifico che applicativo approfondire le conoscenze su questi deperimenti, con l'obiettivo di:

- i) chiarire il quadro sintomatologico e valutare il grado di diffusione degli stessi nei popolamenti di leccio, corbezzolo e ginepro feniceo dell'Isola di Caprera;
- ii) caratterizzare sotto il profilo morfologico, genetico e patogenetico le specie di *Botryosphaericeae* coinvolte nella eziologia dei quadri sintomatologici associati ai fenomeni di deperimento.

La conseguente definizione del/i patosistema/i consentirà di delineare le strategie di intervento più efficaci per arrestare il degrado dell'area colpita e promuovere il suo recupero.

3. MATERIALI E METODI

3.1 SITI D'INDAGINE, RILIEVI FITOSANITARI E PRELIEVO DEI CAMPIONI

I siti interessati da fenomeni di deperimento e moria di piante di corbezzolo, di ginepro fenicio e di leccio sono stati individuati in seguito a un monitoraggio fitosanitario preliminare di tutte le zone boschive dell'isola di Caprera.

La componente arborea e arbustiva dei siti individuati è costituita principalmente da piante disetanee di leccio, con elementi sparsi di quercia da sughero e pino domestico, e da un folto sottobosco di specie caratteristiche della macchia mediterranea quali cisto, corbezzolo, erica, ginepro fenicio, mirto e olivastro. In tali siti è stata allestita una rete di aree di saggio dove svolgere le indagini per chiarire la sintomatologia e l'eziologia delle manifestazioni patologiche (Fig. 1). Le coordinate geografiche di tutte le aree di saggio sono state rilevate con l'ausilio di un GPS portatile (eTrex, Garmin).

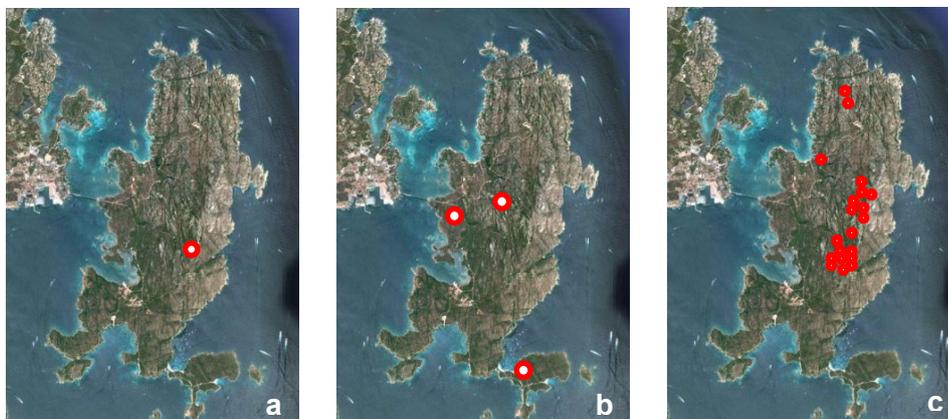


Figura 1. Mappa dell'Isola di Caprera e ubicazione delle aree di saggio in popolamenti di: corbezzolo (a), ginepro (b) e leccio (c).

3.1.1 Indagini nei popolamenti di corbezzolo

In una zona ubicata nel centro dell'Isola di Caprera è stata allestita un'area di saggio di 10 m di diametro dove sono state esaminate e campionate tutte le piante di corbezzolo presenti. In particolare, da ogni pianta sono stati prelevati una porzione di branca comprendente un "cancro" e campioni di rami con sintomi di disseccamento e necrosi.

3.1.2 Indagini nei popolamenti di ginepro fenicio

Sono stati individuati 3 siti con piante di ginepro fenicio sintomatiche. In ognuno di essi è stata allestita un'area di saggio di circa 1 ettaro. In considerazione del fatto che tutte le piante all'interno delle aree di saggio mostravano gli stessi sintomi, sono state scelte *at random* 12 piante. Queste sono state monitorate stagionalmente prelevando, a partire dal 2009 e fino al 2011, campioni di germogli, rami, branche e porzioni di fusto con cancri e necrosi corticali.

3.1.3 Indagini nei popolamenti di leccio

Nei popolamenti di leccio sono state allestite, *at random*, 20 aree di saggio circolari di 10 m di diametro.

In ciascuna area è stato rilevato il numero di piante presenti e valutato il loro stato sanitario, ponendo particolare attenzione alla presenza e natura dei sintomi nella chioma (ingiallimenti, microfillia e rarefazione), nelle branche e nel fusto (disseccamenti, essudati, cancri necrosi e rami epicormici), e nel colletto e nelle grosse radici (cancri, essudati e necrosi).

Inoltre, da 2 - 8 piante per area di saggio sono stati prelevati dal margine di cancri sul fusto o sulle branche campioni di legno e di corteccia per isolare gli agenti patogeni responsabili. Nell'area di saggio n. 12 è stato prelevato un campione di tessuto legnoso anche dal margine di una necrosi riscontrata su una radice di grosse dimensioni.

I sintomi rilevati in campo sulle piante di corbezzolo, ginepro fenicio e leccio monitorate sono stati riportati in una scheda di campagna e successivamente trasferiti su un file di calcolo per essere elaborati.

Tutti i campioni prelevati nel corso delle indagini sono stati posti in buste di plastica siglate con i riferimenti del prelievo e trasferiti in giornata in laboratorio per essere conservati in frigorifero a 5°C fino al loro impiego per gli isolamenti.

3.2 ISOLAMENTO DEI PATOGENI

Tutti i campioni prelevati sono stati utilizzati per gli isolamenti entro 48 ore dalla loro raccolta. Dopo un attento esame allo stereomicroscopio volto ad accertare l'eventuale presenza e natura di strutture riproduttive fungine, i campioni sono stati disinfettati in superficie con etanolo al 70% per 30 sec., risciacquati in acqua sterile e successivamente posti ad asciugare in ambiente asettico. Da ogni campione sono stati prelevati frammenti di circa 3-4 mm² di tessuto corticale e legnoso e posti in piastre Petri contenenti un substrato a base di patata-destrosio-agar (PDA, Oxoid) alla concentrazione di 39 g/L. Tutte le piastre sono state quindi trasferite in termostato e mantenute per 5 giorni a 25°C, al buio.

Le colonie sviluppatesi sono state trapiantate in coltura pura su tre differenti substrati: PDA, estratto di malto agar (MEA, Oxoid) alla concentrazione di 20 g/L e su farina d'avena agar (OA, Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 72,5 g/L. Le piastre sono state conservate in termostato a 25°C fino alla differenziazione dei caratteri morfologici idonei per l'identificazione. Al fine di favorire la differenziazione delle strutture riproduttive, gli isolati sono stati inoltre trasferiti in piastre Petri contenenti PDA con rametti sterili di leccio e/o ginepro fenicio e aghi di pino e mantenuti a temperatura ambiente con un fotoperiodo naturale.

3.3 IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI PATOGENI

3.3.1 Identificazione su base morfologica

Dagli isolamenti effettuati sono state costantemente isolate colonie fungine appartenenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae*. Tutte le colonie sono state identificate sulla base dei principali caratteri morfo-colturali quali la crescita e la colorazione della colonia, la struttura del micelio, la produzione di pigmenti diffusibili a differenti temperature, la forma e la dimensioni dei conidi, in accordo con le recenti descrizioni morfologiche riportate per le specie afferenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae* (de Wet *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2004; Slippers *et al.*, 2004a,b; Damm *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2007, 2008) e reperibili nel sito web dedicato: http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site.

Per quanto riguarda le indagini sui caratteri morfo-colturali (pigmentazione, tessitura, voluminosità e tipo di crescita del micelio), dal margine di colonie di 4 giorni di età sono stati prelevati dischetti di micelio ($\varnothing = 5$ mm), posizionati in piastre Petri (90 mm) contenenti PDA e quindi trasferiti in termostato a 25°C al buio; i rilievi sono stati effettuati dopo 7 giorni.

Per le indagini micro-morfologiche da ogni colonia sono stati prelevati i picnidi formati in coltura pura su i 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 Optika Vision™ Pro versione 2.7 collegata al microscopio. Le osservazioni sono state effettuate su 50 conidi per isolato e i dati riportati come valore minimo-(medio)-massimo. Inoltre, per tutte le specie è stato calcolato il rapporto tra la lunghezza e la larghezza dei conidi.

Per ognuna delle specie identificate su base morfologica sono stati selezionati uno o più isolati rappresentativi per essere impiegati in 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 Protezione delle Piante dell'Università di Sassari.

3.3.2 Identificazione su base genetica

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

Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata seguendo il metodo CTAB riportato da Doyle e Doyle (1987), leggermente modificato. Da colonie pure di 4-7 giorni di età cresciute su PDA sono state prelevate, attraverso l'impiego di una ansa sterile, porzioni di micelio e trasferite all'interno di tubini eppendorf contenenti biglie d'acciaio sterili. Il micelio dei campioni è stato quindi tritato mediante un Vibromulino mod. MM300 (Retsch), per 2,5 minuti ad una frequenza di 30 Hz per 2 volte; la prima senza tampone e la seconda con l'aggiunta di 500 μ l di tampone (Doyle e Doyle, 1987). Successivamente i campioni sono stati incubati a 55°C per 30 minuti in un bagno a secco. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente è stato aggiunto un volume (500 μ l) di cloroformio/alcool isoamilico (24:1, v/v) e quindi centrifugati per 10 min. a 8000 rpm a 20°C. Il surnatante è stato quindi trasferito in nuovi tubini eppendorf e addizionato con un ugual volume di alcool isopropilico (pre-raffreddato a -20°C), il tutto mescolato manualmente e quindi trasferito in ghiaccio per 10 minuti. Successivamente i campioni sono stati ulteriormente centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C e l'alcool isopropilico eliminato. Il pellet è stato risospeso in 500 μ l di etanolo all'80%, e il tutto ulteriormente centrifugato a 13000 rpm per 5 minuti a 4°C e in seguito eliminato l'etanolo. Il pellet di DNA è stato posto ad asciugare per circa

1 ora e infine risospeso in 40 µl di TE buffer a pH 8 e conservato in frigo a 4°C per le successive analisi.

Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Tramite 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* EF1-688F (Alves *et al.*, 2008) e EF1-986R (Carbone e Kohn, 1999). La reazione è stata realizzata in un volume totale di 50 µl contenente: 18,7 µl di H₂O; 10 µl di Buffer 5x; 5 µl di dNTPs; 5 µl di BSA; 5 µl di ciascun *primer*; 0,3 µl di GoTaq polymerase (Promega); 1 µl di DNA.

La reazione d'amplificazione è stata eseguita con un termociclatore (Hybaid PCR Express). Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti:

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

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

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

Purificazione degli amplificati e sequenziamento

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 e una aliquota spedita presso i laboratori

della BMR Genomics s.r.l. (www.bmr-genomics.it), spin-off dell'Università di Padova per essere sequenziata.

Analisi e deposito delle sequenze

Le sequenze nucleotidiche sono state lette ed analizzate attraverso il programma FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc.; <http://www.geospiza.com/finchtv>) e i nucleotidi dedotti sono stati infine confrontati con i dati disponibili nel database online GenBank utilizzando il programma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Infine, gli allineamenti delle sequenze sono stati eseguiti utilizzando il software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Le sequenze nucleotidiche delle regioni ITS e EF1- α di alcuni degli isolati rappresentativi delle specie ottenute in questo studio, sono state depositate in GenBank utilizzando il sistema BankIt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.3.3 Saggi di crescita miceliare

L'effetto della temperatura sullo sviluppo ifale degli isolati delle diverse specie è stato valutato attraverso l'accrescimento diametrico. A tal fine, un dischetto ($\varnothing = 5$ mm) è stato prelevato dal margine di colture di 4-5 giorni di età e posizionato in piastre Petri ($\varnothing = 90$ mm) contenenti 20 ml di PDA. Le piastre sono state incubate per 60 ore 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. Dopo il periodo di incubazione, è stato misurato il diametro (lungo due assi perpendicolari) delle colonie di ciascuna specie. L'accrescimento diametrico è stato quindi calcolato, ottenendo la media delle due misure, previa sottrazione del diametro dell'inoculo.

3.4 SAGGI DI PATOGENICITÀ

Per tutte le specie fungine isolate è stata saggiata la patogenicità e completati i postulati di Koch. A tal fine sono stati impiegati gli isolati rappresentativi utilizzati anche nella identificazione su base genetica.

Corbezzolo

La patogenicità dell'isolato (BL5) è stata saggiata tramite l'inoculazione di otto semenzali di corbezzolo di 2 anni di età. Le piantine sono state inoculate posizionando una porzione di micelio (3 a 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 del fusto di ogni piantina. Tre semenzali utilizzati come testimoni sono stati 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. Le piante dopo l'inoculazione sono state mantenute in ambiente protetto per 30 giorni ad una temperatura compresa tra 18 e 26°C e un fotoperiodo naturale.

Ginepro fenicio

La patogenicità degli isolati DA1, BL24 e BI29 rappresentativi delle 3 specie fungine isolate dai tessuti sintomatici di ginepro fenicio è stata saggiata su 15 semenzali (5 per ciascun isolato fungino) di ginepro fenicio di 3 anni di età, allevati in fitocella e tenuti in ambiente protetto per 60 giorni ad una temperatura compresa tra 20 e 28°C e un fotoperiodo naturale.

Le inoculazioni sono state fatte per ferita. Sulla parte basale del fusto di ciascun semenzale è stata praticata con un bisturi sterile una ferita di circa 4 mm². Nella ferita è stata quindi inoculata una porzione di micelio di circa 3-5 mm², prelevata dal margine di colonie di 5 giorni di età su PDA. Per evitare la rapida disidratazione del micelio, il punto d'inoculo è stato avvolto per una settimana con cotone sterile inumidito e protetto con carta stagnola.

Cinque piante sono state usate come testimoni. Esse sono state trattate come le precedenti, ma inoculate solo con un frammento di PDA sterile.

Leccio

La patogenicità degli isolati BL11, BL20, BL21 e BL22 rappresentativi delle 4 specie fungine isolate dai tessuti sintomatici di leccio è stata saggiata su semenzali di leccio sia di 6 mesi che di 3 anni di età, allevati in fitocella e tenuti in ambiente protetto per 30 giorni ad una temperatura compresa tra 20 e 28°C.

Le inoculazioni sono state fatte per ferita. Sulla parte basale del fusto di ciascun semenzale è stata praticata con un bisturi sterile una ferita di circa 3 mm². Nella ferita è stata quindi inoculata una porzione di micelio di circa 3 mm², prelevata dal margine di colonie di 5 giorni di età su PDA. Per evitare la rapida disidratazione del micelio, il punto d'inoculo è stato avvolto per una settimana con cotone sterile inumidito e protetto con carta stagnola. Le piante testimone sono state trattate come le precedenti, ma inoculate solo con un frammento di PDA sterile.

In totale sono stati inoculati 50 semenzali (25 di 6 mesi e 25 di 3 anni), 5 per ciascun isolato fungino e 5 per i testimoni.

Rilevi fitosanitari

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

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

3.5 ELABORAZIONE DEI DATI

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

4. RISULTATI

4.1 INDAGINE NEI POPOLAMENTI DI CORBEZZOLO

4.1.1 Sintomatologia

Nella parte centro occidentale dell'Isola di Caprera, in una area boschiva popolata da piante di leccio, pino domestico e specie della macchia mediterranea, è stata riscontrata la presenza diffusa di piante adulte di corbezzolo ormai morte o in via di disseccamento accanto ad altre con sintomi evidenti di deperimento (Fig. 2).

Nello specifico le piante sintomatiche mostravano un progressivo disseccamento dei germogli, dei rami e delle branche e la presenza di rami epicormici.

Nel periodo primaverile i nuovi germogli disseccavano rapidamente e nei rami più giovani era possibile osservare la presenza di estese aree necrotiche della lunghezza di alcuni centimetri (Fig. 2b). Le aree necrotiche spesso interessavano l'intera circonferenza dei rami.

Le foglie sui rami sintomatici viravano rapidamente al rosso opaco ed infine al marrone scuro. Esse spesso rimanevano attaccate ai rami a lungo anche dopo il loro disseccamento. Le piante infette reagivano emettendo nuovi germogli con foglie microfilliche alla base dei germogli disseccati.

Sul fusto e sulle branche delle piante sintomatiche erano presenti numerosi "cancri" di forma depressa a causa del collasso dei tessuti corticali e di dimensione variabile (Fig. 2c). In sezione trasversale tutti i cancri esaminati mostravano vistosi settori necrotici estesi fino al midollo (Fig. 2d).



Figura 2. Principali quadri sintomatologici riscontrati su piante di corbezzolo nell'Isola di Capraia dovuti alle infezioni di *Diplodia scrobiculata*: disseccamenti della chioma e presenza di vistosi cancri sulle branche (a); disseccamento dei germogli e necrosi corticali dei rami (b); particolare di un cancro (c); sezione trasversale di una branca con in evidenza un settore necrotico a forma di "V" in corrispondenza del cancro (d).

4.1.2 Identificazione e caratterizzazione del patogeno

Gli isolamenti eseguiti dai tessuti legnosi e corticali dei campioni di corbezzolo sintomatici hanno dato origine a diverse colonie di una sola specie fungina identificata sulla base delle caratteristiche morfologiche (forma, dimensione e pigmentazione dei conidi e struttura e pigmentazione del micelio) come *Diplodia scrobiculata* J. de Wet, Slippers & M.J. Wingf.

Su PDA a 25 °C, gli isolati di *D. scrobiculata* sviluppavano colonie bianche con micelio radente che dopo 4-6 giorni virava al grigio scuro (Fig. 3a). Su PDA le colonie mostravano un accrescimento lento e arrestavano il loro sviluppo prima di completare la colonizzazione del substrato in piastre Petri da 90 mm.

Tutti gli isolati producevano dopo 2-3 settimane di incubazione su PDA e aghi sterili di *Pinus radiata* numerosi picnidi solitari di colore scuro.

I picnidi contenevano conidi di colore marrone scuro con un numero di setti variabile da zero a tre. I conidi erano di forma clavata con base troncata e misuravano 31,1-(36,8)-41,9 × 11,3-(12.6)-16,3 µm, con un rapporto lunghezza / larghezza di 2,96 ± 0,34 (media ± deviazione standard) (n = 50) (Fig. 3b).

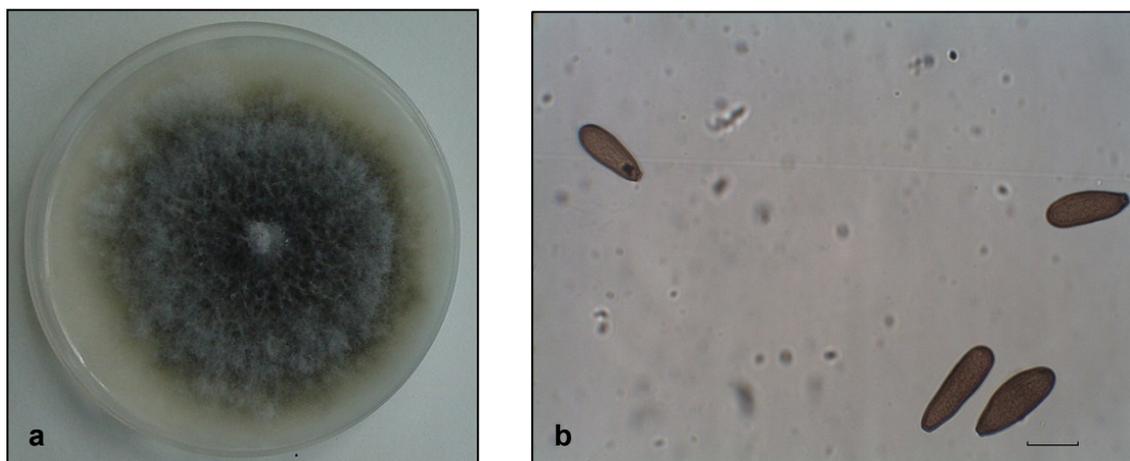


Figura 3. *Diplodia scrobiculata*: aspetto della colonia su PDA dopo 7 giorni a 25°C (a); conidi osservati a 400 ingrandimenti (b). La barra di riferimento è di 20 µm.

L'identificazione degli isolati di *D. scrobiculata* è stata confermata dall'analisi delle sequenze della regione ITS. L'amplificazione tramite PCR della regione del rDNA (comprendente le regioni: ITS-1, 5.8S, ITS-2), ha prodotto un frammento di circa 550 bp. Le ricerche in GenBank tramite il software BLAST hanno mostrato il 100% similarità tra le sequenze ottenute in questo studio e le sequenze di riferimento di *D. scrobiculata* depositate in GenBank (numero di accesso: AY160200, EU220438, EU220444 e EU392283). La sequenza di un isolato rappresentativo di *D. scrobiculata* (BL5) ottenuto in questo studio, è stata depositata in GenBank (numero di accesso: GU722102).

Per quanto riguarda le esigenze termiche, *D. scrobiculata* può essere considerato un fungo mesofilo. Infatti, la crescita miceliare è risultata ottimale alla temperatura di circa 25°C, mentre è stata molto lenta a 10 e 35°C (Fig. 4). A 5 e 40°C non è stata osservata nessuna crescita del micelio dopo 60 ore di incubazione. Tuttavia, il micelio rimane vitale a queste temperature, infatti dopo trasferimento delle colonie a 25°C la crescita riprendeva normalmente.

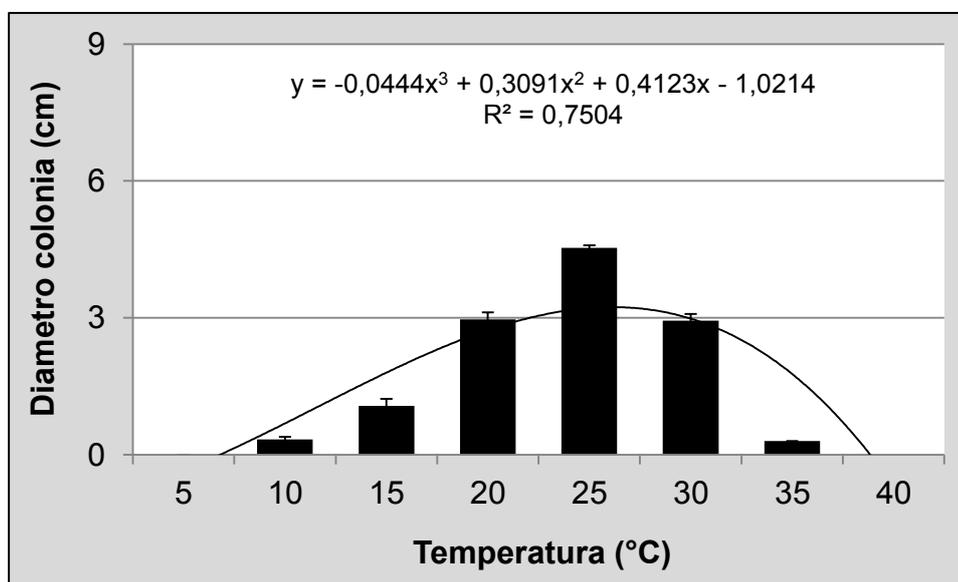


Figura 4. Effetto della temperatura sulla crescita miceliare di *Diplodia scrobiculata*.

4.1.3 Saggi di patogenicità

Quattro settimane dopo l'inoculazione, tutte le piante inoculate con *D. scrobiculata* mostravano sintomi di disseccamento (Fig. 5a).

In prossimità del punto di infezione era visibile un'estesa necrosi che interessava i tessuti sia corticali che legnosi (Fig. 5b). Le necrosi che occasionalmente interessavano tutta la circonferenza del fusto misuravano $1,7 \pm 0,6$ cm (media \pm errore standard). Le piante testimone non mostravano alcun sintomo di malattia e la lesione del punto di inoculazione era ormai rimarginata.

L'agente patogeno è stato reisolato con successo dai tessuti sintomatici, soddisfacendo i postulati di Koch. Nessun altro microrganismo è stato reisolato dai tessuti sintomatici.



Figura 5. Piante di corbezzolo con sintomi causati da *Diplodia scrobiculata* 30 giorni dopo l'inoculazione: disseccamenti della chioma (a); particolare del fusto con necrosi sottocorticale (b).

4.2 INDAGINE NEI POPOLAMENTI DI GINEPRO FENICIO

4.2.1 Sintomatologia

Nel corso dell'autunno del 2009 in una vasta area boschiva nel centro dell'Isola di Caprera è stata riscontrata la presenza diffusa di piante di ginepro fenicio con sintomi di deperimento grave. Nello specifico le piante 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 (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. 6b,c). Sempre nello stesso anno in altre aree boschive dell'isola è stata riscontrata la presenza di nuove piante sintomatiche suggerendo che la malattia è ancora 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. 6d).

A livello sotto corticale erano spesso presenti aree necrotiche di forma allungata che interessavano i tessuti legnosi. Queste ultime apparivano più evidenti dopo la rimozione della corteccia esterna con uno scalpello (Fig. 6f).

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 (Fig. ab).



Figura 6. Principali quadri sintomatologici riscontrati su piante di ginepro fenicio nell'Isola di Caprera: disseccamento del cimale (a), disseccamenti su rami e branche (b); pianta completamente disseccata (c); particolare delle necrosi a livello corticale su branche sintomatiche (d); cancro corticale su branca (e); necrosi del legno su branca (f).

4.2.2 Identificazione e caratterizzazione dei patogeni

Gli isolati fungini ottenuti in coltura pura a partire dai tessuti sintomatici delle piante di ginepro fenicio sono stati identificati in base alle caratteristiche morfologiche (forma, dimensione e pigmentazione dei conidi e struttura e pigmentazione del micelio). Essi appartenevano a tre differenti specie di *Botryosphaeriaceae*: *Diplodia africana* Damm & Crous, *Neofusicoccum australe* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips e

Neofusicoccum luteum (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips.

Le tre specie fungine sono state isolate con una frequenza diversa nelle tre aree di saggio. *D. africana* è risultata la specie isolata più di frequente. Ben 22 delle 36 piante esaminate erano infettate da questo patogeno. Tuttavia, sono emerse delle differenze nella sua distribuzione tra i differenti siti di indagine (Tab. 2).

N. australe è stato isolato anch'esso dalle piante presenti nelle tre aree di saggio. In particolare, nell'area n. 3 è stato isolato con frequenze superiori a quelle di *D. africana*.

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

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

Tabella 2. Numero di piante di ginepro fenicio monitorate nelle 3 aree di saggio (ADS) e relativi patogeni associati.

ADS	Numero di piante esaminate	Numero di piante positive		
		<i>Diplodia africana</i>	<i>Neofusicoccum australe</i>	<i>Neofusicoccum luteum</i>
1	12	12	2	-
2	12	7	6	-
3	12	3	9	3
Totale	36	22	17	3

Diplodia africana

Su PDA a 25°C, tutti gli isolati ottenuti nel corso delle indagini, sviluppavano un micelio moderatamente aereo, inizialmente bianco e dopo 5-6 giorni virante al grigio scuro dal centro verso il margine esterno delle colonie (Fig. 7a). Dopo 30 giorni, tutti gli isolati differenziavano numerosi picnidi al centro delle culture. Non è mai stata osservata la produzione di pseudotecii.

I picnidi, spesso solitari, producevano conidi ialini, asettati, con pareti spesse, di forma da oblunga a cilindrica, misuranti 25,1-(30,1)-33,9 × 10,1-(11,7)-17,1 µm, con un rapporto lunghezza / larghezza di 2,58 ± 0,26 (media ± deviazione standard, n = 50) (Fig. 7b). I conidi prodotti in coltura pura erano identici a quelli osservati nei picnidi dei rami sintomatici prelevati in bosco.

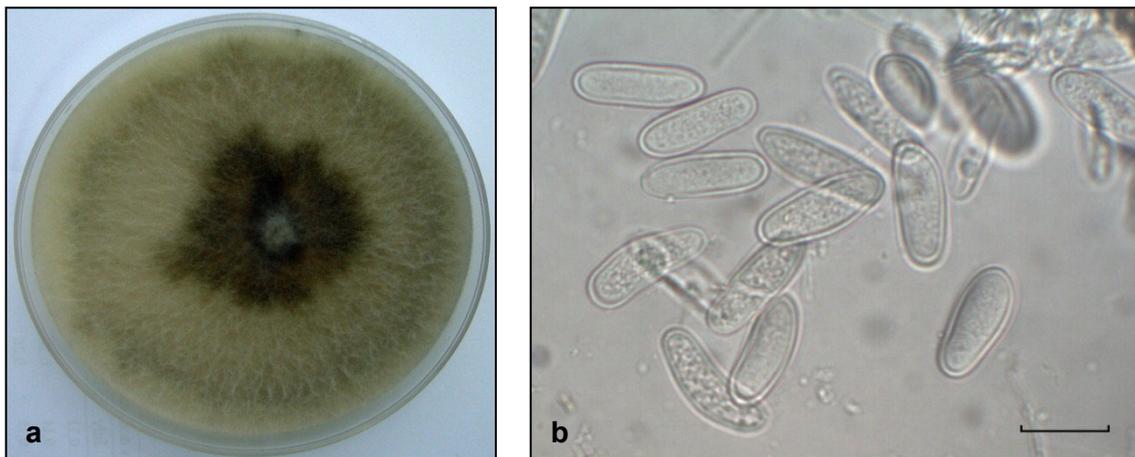


Figura 7. *Diplodia africana*: aspetto della colonia su PDA dopo 7 giorni a 25°C (a); conidi osservati a 400 ingrandimenti (b). La barra di riferimento è di 20 µm.

Per quanto riguarda le esigenze termiche, *D. africana* può essere considerato un fungo mesofilo. Infatti, la crescita miceliare è risultata ottimale alla temperatura di circa 25°C, mentre è stata molto lenta a 10°C (Fig. 8). Ciò in contrasto con quanto riportato da Damm *et al.* (2007) che per questo fungo riportano nella descrizione della specie una temperatura ottimale di crescita di 20°C.

A 5 e 35°C non è stata osservata nessuna crescita del micelio dopo 60 ore di incubazione. Tuttavia, il micelio rimane vitale a queste temperature, infatti dopo trasferimento delle colonie a 25°C la crescita riprendeva rapidamente.

L'identificazione degli isolati di *D. africana* è stata confermata dall'analisi delle sequenze della regione ITS e EF1- α .

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

Le sequenze di un isolato rappresentativo (DA1) ottenuto in questo studio sono state depositate in GenBank (numero di accesso: ITS: JF302648; EF1- α : JN157807).

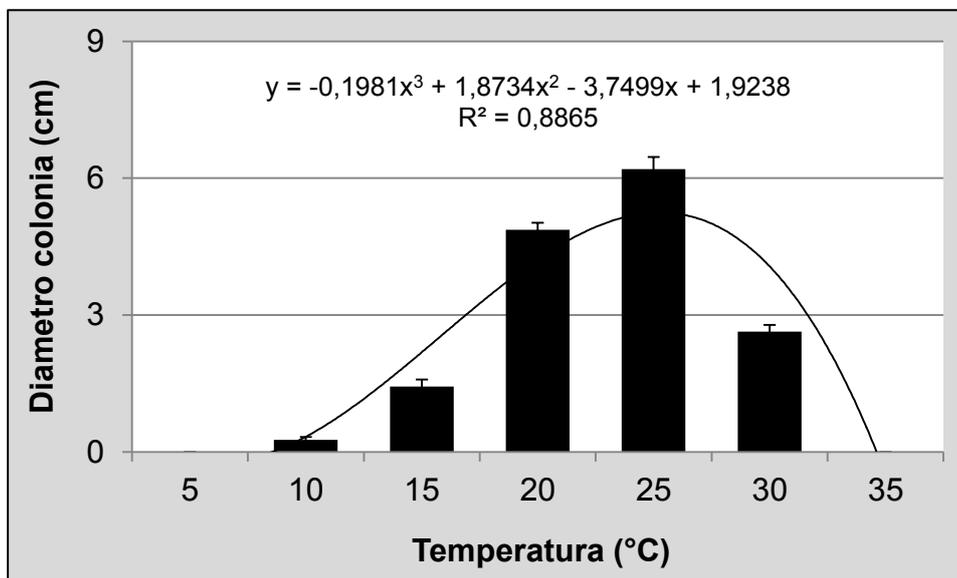


Figura 8. Effetto della temperatura sulla crescita miceliare di *Diplodia africana*.

Neofusicoccum australe

Diciassette colonie sono state identificate come *N. australe*. Su PDA a 25 °C, gli isolati mostravano un micelio aereo, spesso cotonoso di colore inizialmente bianco e successivamente variabile dal verde oliva al grigio scuro. Sul retro delle piastre era visibile una pigmentazione gialla che virava al grigio-scuro dopo 5-6 giorni (Fig. 9a). I conidi ialini, assettati, fusiformi, con la base troncata misuravano 14,3-(18,1)-22,7 × 5,1-(6,7)-9,4 µm, con un rapporto lunghezza/larghezza di 2,72 ± 0,38 (media ± deviazione standard; n = 50) (Fig. 9b). La dimensione media dei conidi di *N. australe* ottenuta in questo studio è inferiore al valore di 24,7 × 5,1 µm riportato per *N. australe* da Slippers *et al.*, (2004b), ma simile alle dimensioni riportate per *N. australe* da Lazzizzera *et al.*, (2008) e da Linaldeddu *et al.*, (2010c).

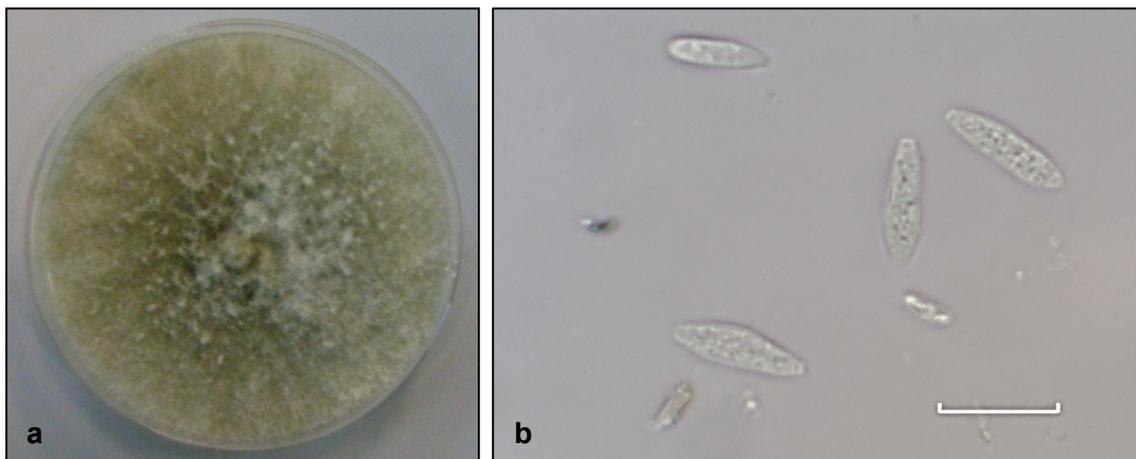


Figura 9. *Neofusicoccum australe*: aspetto della colonia su PDA dopo 7 giorni a 25°C (a); conidi osservati a 400 ingrandimenti (b). La barra di riferimento è di 20 µm.

L'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi delle sequenze della regione ITS dell'rDNA. La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze di vari isolati di *N. australe* tra cui quella della ex-coltura tipo di *N. australe* (AY339262). Mentre le sequenze ottenute in questo studio differivano di un 1 bp (nella regione ITS2) dalle sequenze di altri isolati di *N. australe* tra cui gli isolati ottenuti da olive (EF638770-EF638778) e vite

(HQ011406) in Italia. A tal riguardo, uno studio recentemente pubblicato (Sakalidis *et al.*, 2011), basato sull'analisi delle sequenze della regione ITS di numerosi isolati di *N. australe* ha evidenziato l'esistenza di 13 aplotipi per questa specie. I dati ottenuti in questa ricerca concordano con le osservazioni dei ricercatori australiani e collocano gli isolati di *N. australe* da ginepro nell'aplotipo H1 proposto da tali autori.

Per quanto riguarda le esigenze termiche, *N. australe* può essere considerato un fungo mesofilo. Il suo micelio si sviluppa a temperature comprese tra 5 e 35°C. La crescita ottimale è prossima ai 25°C, mentre è molto lenta a 5°C (Fig. 10).

A 40°C non è stata osservata nessuna crescita del micelio dopo 60 ore di incubazione. Tuttavia, il micelio rimane vitale a questa temperatura, infatti dopo trasferimento delle colonie a 25°C la crescita riprendeva rapidamente.

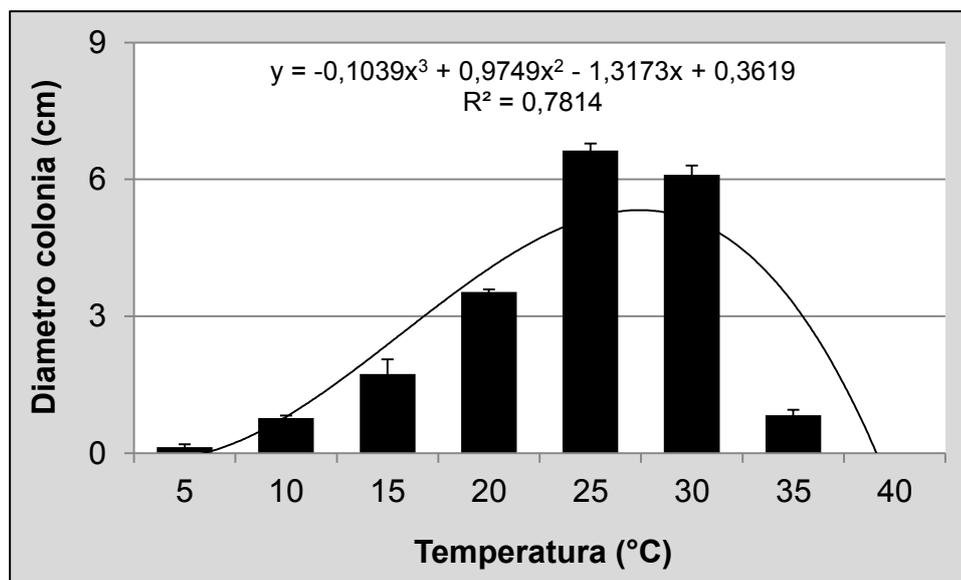


Figura 10. Effetto della temperatura sulla crescita miceliare di *Neofusicoccum australe*.

Neofusicoccum luteum

Tre colonie sono state identificate come *N. luteum*. Su PDA a 25 °C, gli isolati mostravano un micelio di colore bianco radente a rapida crescita che diveniva aereo in prossimità del margine delle piastre. Sul retro delle piastre le colonie mostravano una pigmentazione gialla intensa che virava al verde oliva dopo 5-6 giorni (Fig. 11a).

Tutte le colonie producevano picnidi stromatici direttamente su PDA. Alcuni picnidi differenziano microconidi mentre altri, anche nello stesso stroma, differenziavano macroconidi (Fig. 11b, c). Questi ultimi erano ialini, assettati, da fusiformi a ellissoidali e misuravano 16,7-(19,5)-26 × 5,8-(7,1)-9,2 µm, con un rapporto lunghezza/larghezza di 2,74 ± 0,22 (media ± deviazione standard; n = 50).

L'identificazione è stata confermata dall'analisi delle sequenze della regione ITS dell'rDNA. La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze di vari isolati di *N. luteum* tra cui la sequenza della ex-coltura tipo di *N. luteum* (AY259091). Inoltre, la sequenza ITS degli isolati ottenuti in questo studio differiva in 4 bp dalla sequenza degli isolati di *N. australe*.

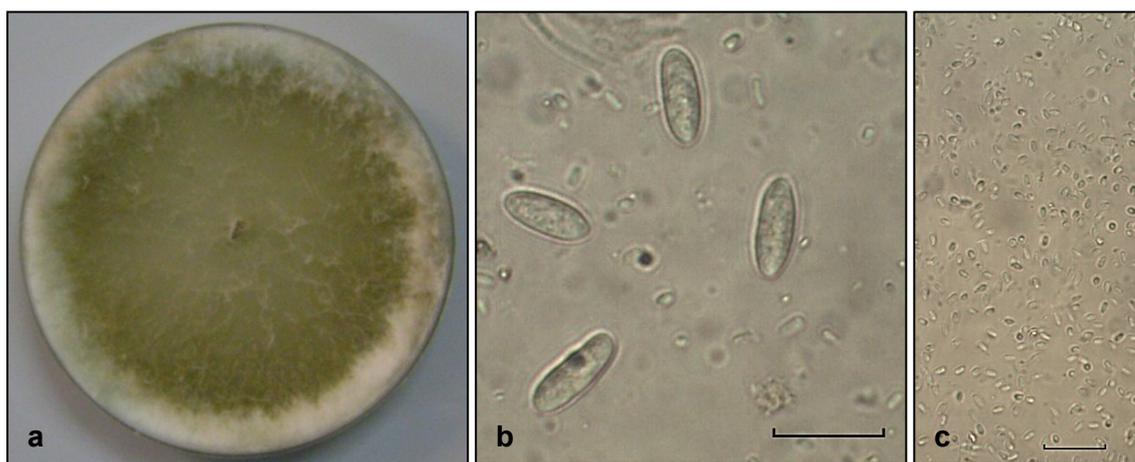


Figura 11. *Neofusicoccum luteum*: aspetto della colonia su PDA dopo 7 giorni a 25°C (a); macroconidi (b) e microconidi (c) osservati a 400 ingrandimenti. La barra di riferimento è di 20 µm.

Per quanto riguarda le esigenze termiche, *N. luteum* può essere considerato un fungo mesofilo. Il suo micelio si sviluppa a temperature comprese tra 5 e 35°C. La crescita ottimale è prossima ai 25°C, mentre è molto lenta a 5°C (Fig. 12).

A 40°C non è stata osservata nessuna crescita del micelio dopo 60 ore di incubazione. Tuttavia, il micelio rimane vitale a questa temperatura, infatti dopo trasferimento delle colonie a 25°C la crescita riprendeva rapidamente.

Le principali differenze morfologiche riscontrate in questo studio tra gli isolati di *N. australe* e *N. luteum* riguardano la forma dei conidi (non la dimensione), la struttura del micelio, radente in *N. luteum* e cotonosa in *N. australe* e il tasso di crescita miceliare su PDA a 25 °C. Su questo substrato le colonie di *N. luteum* colonizzavano le piastre Petri da 90 mm più rapidamente rispetto a quelle di *N. australe*.

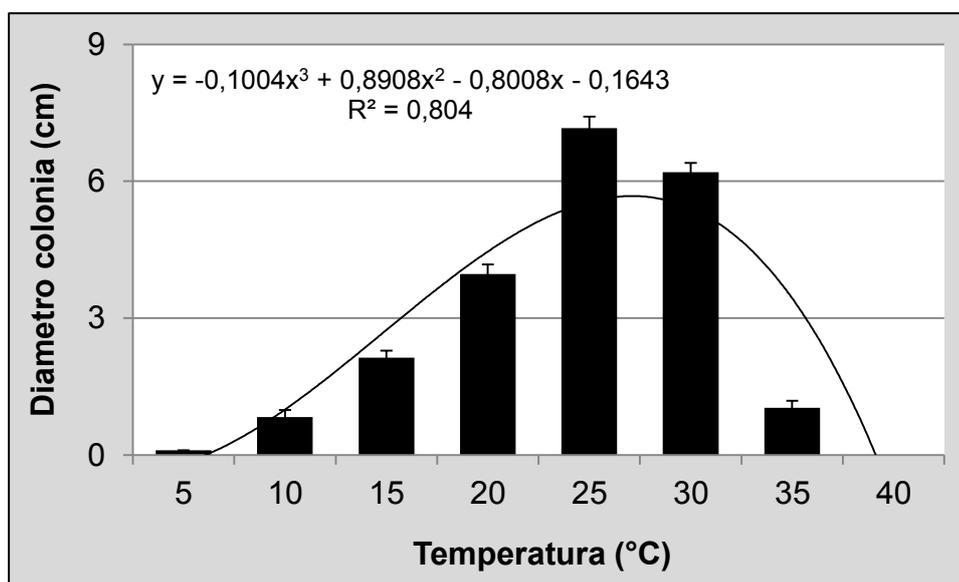


Figura 12. Effetto della temperatura sulla crescita miceliare di *Neofusicoccum luteum*.

4.2.3 Saggi di patogenicità

Due mesi dopo l'inoculazione, tutte le piantine infettate con *D. africana*, *N. australe* e *N. luteum* mostravano in prossimità del punto di inoculo evidenti cancri e lesioni necrotiche nei tessuti corticali e legnosi. Le lesioni necrotiche in alcuni casi tendevano a circondare l'intero fusto causando dapprima una perdita di turgore nelle foglie situate nella parte distale del punto di infezione e, successivamente, il completo disseccamento della pianta (Fig. 13). Le cinque piantine testimoni, inoculate solo con un frammento di PDA sterile, sono rimaste asintomatiche.

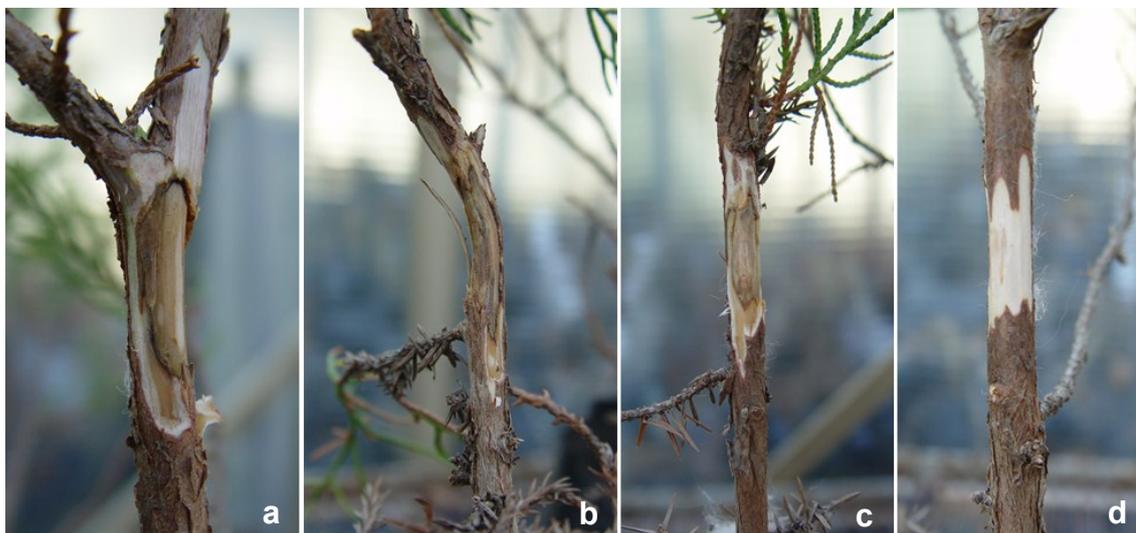


Figura 13. Piante di ginepro fenicio con in evidenza le lesioni necrotiche causate da: *Diplodia africana* (a), *Neofusicoccum australe* (b) e *Neofusicoccum luteum* (c), 60 giorni dopo l'inoculazione. Testimone asintomatico (d).

Tra le tre specie saggiate sono emerse differenze statisticamente significative in relazione alla lunghezza delle lesioni necrotiche causate sui semenzali di ginepro fenicio. In particolare, l'isolato di *N. australe* ha causato le necrosi più estese. Mentre non sono emerse differenze significative tra l'isolato di *D. africana* e quello di *N. luteum* (Fig. 14).

Solo *D. africana* ha differenziato picnidi subcorticali in prossimità del punto di infezione.

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

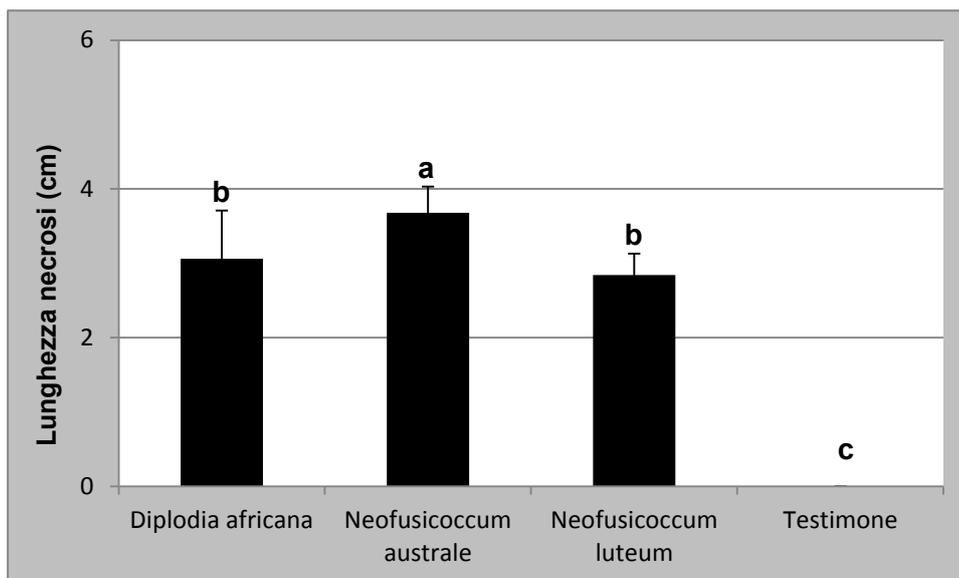


Figura 14. Lunghezza media delle lesioni necrotiche causate da *Diplodia africana*, *Neofusicoccum australe* e *Neofusicoccum luteum* sul fusto dei semenzali di ginepro fenicio. Le barre rappresentano la deviazione standard. Istogrammi contrassegnati da lettere differenti differiscono in modo statisticamente significativo al test di confronto multiplo LSD per ($P=0,05$).

4.3 INDAGINE NEI POPOLAMENTI DI LECCIO

4.3.1 Sintomatologia

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

In particolare, le piante di leccio, sia giovani che adulte, mostravano sintomi di un graduale declino vegetativo con disseccamenti più o meno ampi della chioma e un anormale sviluppo di rami epicormici nel fusto e nelle branche (Fig. 15). Altresì è stata riscontrata la presenza, più frequentemente nel periodo estivo, di piante con sintomi di morte improvvisa (Fig. 15c). Su queste ultime le foglie rimanevano attaccate ai rami per lungo tempo anche dopo il loro disseccamento. Numerose piante ormai disseccate mostravano la presenza di numerosi polloni (Fig. 15f). Tuttavia, i giovani polloni spesso disseccavano rapidamente, suggerendo la presenza di infezioni parassitarie anche a livello dell'apparato radicale.

Le piante deperenti mostravano a livello del colletto e/o lungo il fusto e le branche, aree necrotiche depresse più o meno ampie e cancri spesso umidi per l'emissione di essudati brunastri (Fig. 16a, b). In seguito alla rimozione dei tessuti corticali, tramite uno scalpello, erano visibili in corrispondenza dei cancri necrosi del legno di dimensioni maggiori rispetto a quella del cancro sovrastante (Fig. 16c, d). Osservate in sezione trasversale le necrosi in corrispondenza dei cancri si estendevano sino al midollo con una caratteristica forma a "V" (Fig. 16e, f).

A livello del colletto e delle grosse radici alcune piante presentavano essudati nerastri (Fig. 16g). In corrispondenza di questi le radici più grosse presentavano ampie necrosi dei tessuti legnosi del tutto simili a quelle osservate nel fusto e nelle branche (Fig. 16h).

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

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



Figura 15. Principali quadri sintomatologici riscontrati a livello della chioma su piante di leccio nell'Isola di Caprera: rarefazione e trasparenza della chioma (a); disseccamento progressivo di grosse branche (b); morte repentina di piante mature (c); rami epicormici su fusto (d) e branche (e); giovani polloni alla base di piante disseccate (f).



Figura 16. Principali quadri sintomatologici riscontrati su fusto e grosse radici di piante di leccio nell'Isola di Caprera: piante deperienti con vistosi cancri (a); particolare di un cancro depresso sul fusto (b); lesioni necrotiche nel legno a livello del fusto (c) e del colletto (d); sezione trasversali con in evidenza la forma a "V" delle necrosi nel legno a livello del colletto (e) e del fusto (f); essudati nerastri nel colletto (g); necrosi sottocorticali nelle grosse radici (h).

I risultati dei rilevamenti effettuati nelle 20 aree di saggio, sottolineano la gravità della situazione fitosanitaria dei querceti dell'Isola di Caprera, sia per l'elevato numero di piante di leccio con sintomi di deperimento presenti in tutte le aree di saggio, sia per l'intensità dei sintomi che le stesse manifestano. In totale sono state monitorate 369 piante di leccio: solo 18 (4,8%) erano asintomatiche, 277 (75,1%) mostravano cancri a livello del colletto, del fusto e/o branche, e ben 56 (15,2%) erano disseccate (Tab. 3).

Tabella 3. Numero di piante di leccio monitorate nelle 20 aree di saggio (ADS) allestite nell'area boschiva dell'Isola di Caprera e relativo stato fitosanitario con particolare riferimento al numero di piante con cancri nel colletto (C), fusto (F) e branche (B).

ADS	Numero di piante	Piante asintomatiche	Piante con cancri				Piante disseccate
			C	F	B	Tot.	
1	26	-	11	18	5	23	-
2	20	1	10	16	13	17	1
3	16	-	5	9	11	15	1
4	19	-	8	12	2	14	9
5	19	-	5	15	13	16	8
6	11	-	5	3	3	9	1
7	22	-	1	7	2	9	9
8	25	-	15	20	14	22	2
9	17	2	7	15	11	15	1
10	14	1	8	8	6	10	0
11	27	7	11	12	3	15	0
12	10	-	1	7	7	10	2
13	23	-	7	13	1	15	3
14	32	-	4	9	-	11	2
15	6	-	1	2	2	2	2
16	10	-	5	10	9	10	2
17	17	-	3	17	2	17	9
18	21	1	5	20	10	20	1
19	13	5	1	5	7	7	1
20	21	1	3	19	7	20	2
Totale	369	18	116	237	128	277	56

Con riferimento alla posizione dei cancri nella pianta, essi erano localizzati principalmente nel fusto. Tuttavia, numerose piante presentavano uno o più cancri a livello delle branche, del fusto e del colletto.

4.3.2 Identificazione e caratterizzazione dei patogeni

Dagli isolamenti effettuati dai tessuti legnosi e corticali dei cancri prelevati dalle piante di leccio sono state ottenute complessivamente 63 isolati fungini appartenenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae*. Essi sulla base dei caratteri morfologici sono stati suddivisi in 4 gruppi appartenenti rispettivamente alle specie: *Diplodia corticola* A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque, *Diplodia seriata* De Not., *Fusicoccum aesculi* Corda e *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips (Tab. 4).

Tabella 4. Numero di cancri esaminati in ognuna delle 20 aree di saggio (ADS) e relativi patogeni associati.

ADS	Numero di cancri esaminati	Numero di cancri positivi			
		<i>Diplodia corticola</i>	<i>Diplodia seriata</i>	<i>Fusicoccum aesculi</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>
1	5	3	-	-	-
2	5	4	-	1	-
3	7	6	-	-	1
4	5	4	-	-	-
5	6	4	1	-	-
6	5	3	-	-	-
7	5	2	-	-	-
8	8	6	-	-	-
9	5	3	-	-	1
10	5	1	-	-	-
11	5	1	-	-	-
12	6*	2*	-	-	-
13	5	1	-	-	-
14	5	2	-	-	1
15	2	1	-	-	-
16	5	1	-	-	-
17	5	5	-	-	-
18	5	3	-	-	-
19	5	3	-	-	-
20	5	3	-	-	-
Totale	103	58	1	1	3

(*) Un campione è stato prelevato da radici.

D. corticola è stata la specie isolata più di frequente, ben 57 dei 102 cancri esaminati sono risultati positivi. I campioni positivi provenivano da tutte e 20 le aree di saggio, evidenziando l'ampia diffusione delle infezioni di questo patogeno nelle aree boschive dell'Isola. Inoltre, anche dal campione di radici prelevato nell'area di saggio n. 12 sono state isolate colonie di *D. corticola*.

Da 3 cancri sono state isolate colonie di *N. parvum*, mentre da un cancro nell'area n. 2 e da un cancro nell'area n. 4 sono state isolate colonie rispettivamente di *F. aesculi* e *D. seriata*.

Diplodia corticola

Tutti gli isolati di *D. corticola* hanno prodotto su PDA colonie con micelio aereo e cotonoso a rapida crescita di colore variabile dal bianco al grigio-scuro (Fig. 17a). Dopo circa 20 giorni d'incubazione, tutti gli isolati di *D. corticola* hanno differenziato sulla superficie di rami di leccio sterili posizionati in piastre Petri contenenti PDA, numerosi picnidi, per lo più stromatici. Solo occasionalmente sono stati osservati picnidi singoli, uniloculari a forma di fiasco contenenti al loro interno numerosi conidi unicellulari, cilindrici e ialini. A maturità alcuni conidi divenivano scuri e differenziavano da 1 a 3 setti (Fig. 17b). I conidi misuravano $27,1-(29,7)-32,8 \times 11,9-(13,4)-15,9 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di $2,22 \pm 0,11$ (media \pm deviazione standard; $n = 50$).

L'identificazione degli isolati di *D. corticola* è stata confermata dall'analisi delle sequenze della regione ITS e EF1- α . L'amplificazione della regione del rDNA (comprendente le regioni: ITS-1, 5.8S, ITS-2), ha prodotto un frammento di circa 530 bp, mentre quella della regione EF1- α un frammento di circa 320 bp. Le sequenze di entrambe le regioni geniche si sono dimostrate informative per l'identificazione del patogeno. La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze degli isolati di *D. corticola* depositate in GenBank tra cui quelle dell'ex-coltura tipo (CBS112549).

In relazione alle esigenze termiche, le migliori condizioni di sviluppo sono state osservate tra 20 e 30°C, con *optimum* intorno a 25°C (Fig. 18). A 5°C

l'accrescimento è piuttosto lento. Il limite termico superiore è compreso tra 35 e 40°C. A quest'ultima temperatura il fungo rimane vitale e riprende a svilupparsi non appena trasferito in termostato a 25°C. Pertanto, sulla base delle esigenze termiche osservate, *D. corticola* può essere incluso tra i funghi mesofili termotolleranti.

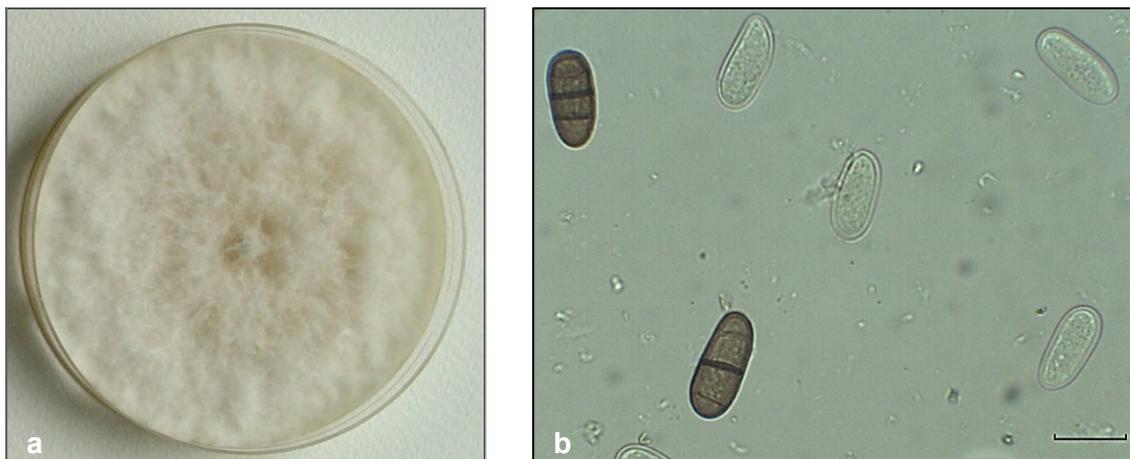


Figura 17. *Diplodia corticola*: aspetto della colonia su PDA dopo 7 giorni a 25°C (a); conidi osservati a 400 ingrandimenti (b). La barra di riferimento è di 20 µm.

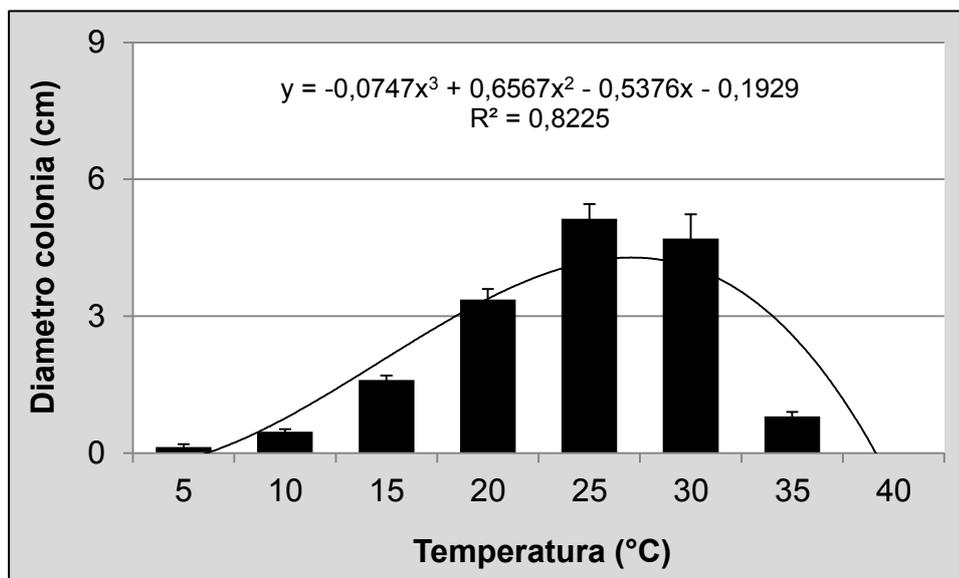


Figura 18. Effetto della temperatura sulla crescita miceliare di *Diplodia corticola*.

Diplodia seriata

Su PDA a 25 °C, l'isolato di *D. seriata* (BL22) sviluppava un micelio aereo compatto, inizialmente bianco e dopo 4-5 giorni virante in modo uniforme al grigio scuro (Fig. 19a). Le colonie di questa specie differenziavano numerosi picnidi contenenti conidi pigmentati con parete finemente ornamentata, assestati (solo a maturità differenziavano un setto), con la base troncata misuranti 20,1-(23,2)-26,3 × 10,1-(11,7)-13,8 µm, con un rapporto lunghezza/larghezza di 1,98 ± 0,16 (media ± deviazione standard; n = 50) (Fig. 19b). La dimensione dei conidi e il loro rapporto tra lunghezza e larghezza è in accordo con i valori riportati da Phillips *et al.* (2007) per questa specie.

L'identificazione è stata confermata dall'analisi delle sequenze ITS dell'rDNA. La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze degli isolati di *D. seriata* depositate in GenBank.

In relazione alle esigenze termiche, le migliori condizioni di sviluppo sono state osservate tra 20 e 30°C, con *optimum* intorno a 25°C (Fig. 20). A 5°C l'accrescimento è piuttosto lento. Il limite termico superiore è compreso tra 35 e 40°C. A quest'ultima temperatura il fungo rimane vitale e riprende a svilupparsi non appena trasferito in termostato a 25°C.

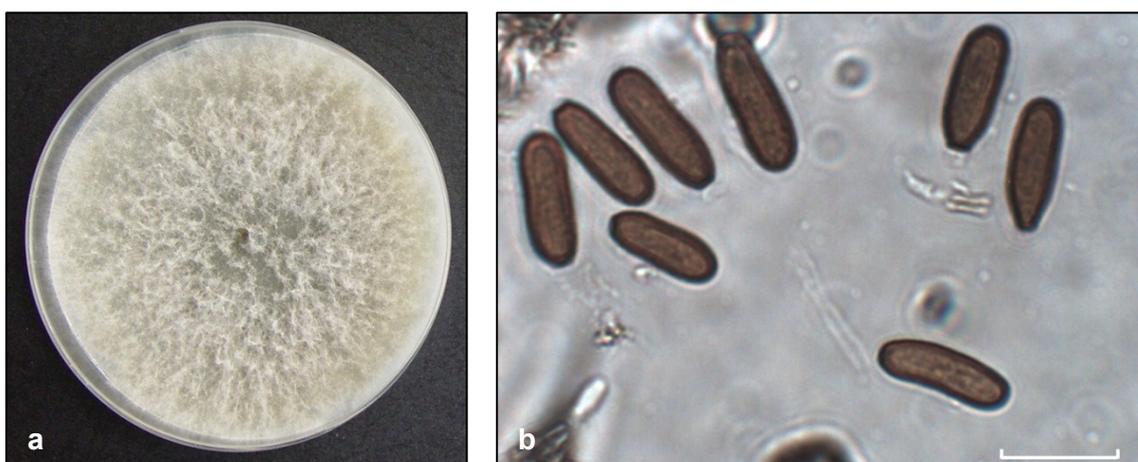


Figura 19. *Diplodia seriata*: aspetto della colonia su PDA dopo 7 giorni a 25°C (a); conidi osservati a 400 ingrandimenti (b). La barra di riferimento è di 20 µm.

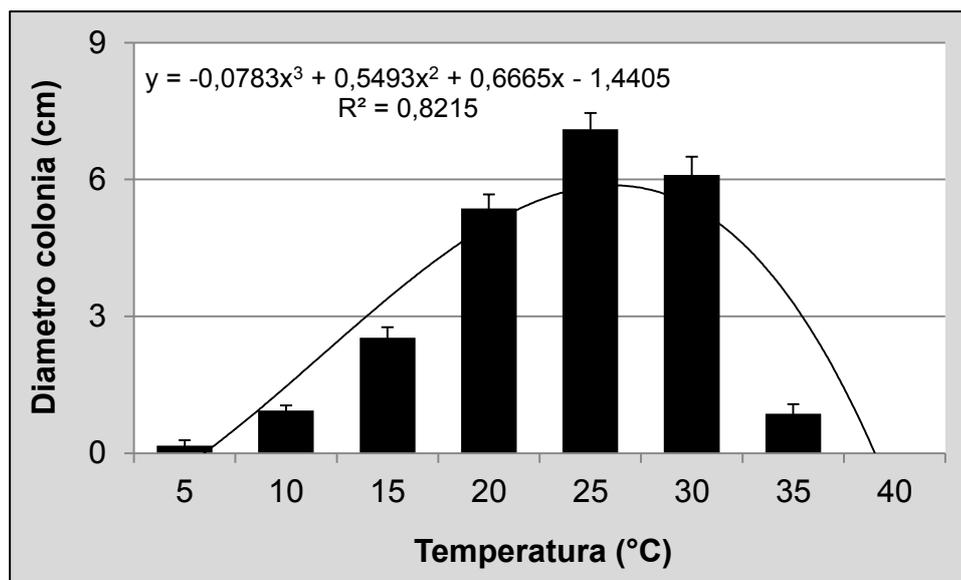


Figura 20. Effetto della temperatura sulla crescita miceliare di *Diplodia seriata*.

Fusicoccum aesculi

Su PDA a 25°C, l'isolato di *F. aesculi* (BL20) mostrava un micelio aereo compatto e cotonoso, inizialmente bianco e successivamente virante al grigio scuro (Fig. 21a). Dopo due settimane su OA le colonie differenziavano numerosi picnidi solitari contenenti conidi ialini, assettati e fusiformi che misuravano 17,7-(22,3)-26,1 × 4,1-(4,8)-5,9 μm, con un rapporto lunghezza/larghezza di 4,68 ± 0,46 (media ± deviazione standard; n = 50) (Fig. 21b).

La dimensione media dei conidi di *F. aesculi* ottenuta in questo studio è leggermente inferiore a quella riportata da Slippers *et al.*, (2004a) per questa specie.

L'identificazione dell'isolato BL20 è stata confermata dall'analisi delle sequenze ITS. La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze degli isolati di *F. aesculi* depositate in GenBank.

Per quanto riguarda le esigenze termiche, l'isolato BL20 cresceva in modo ottimale a 30°C (Fig. 22). A 5 e 40°C non è stata osservata nessuna crescita del micelio dopo 60 ore di incubazione. Tuttavia, il micelio rimane vitale a

questa temperatura; infatti dopo trasferimento delle colonie a 25°C la crescita riprendeva rapidamente.

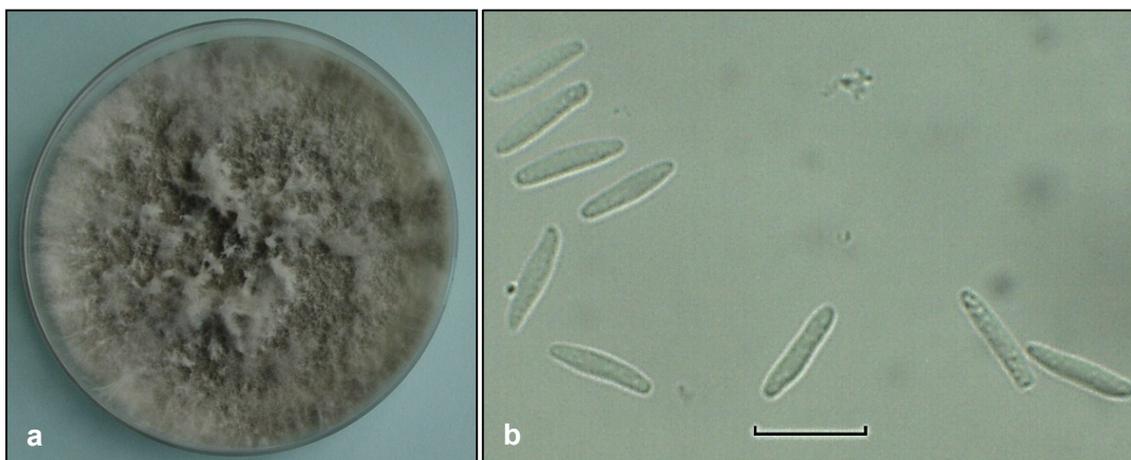


Figura 21. *Fusicoccum aesculi*: aspetto della colonia su PDA dopo 7 giorni a 25°C (a); conidi osservati a 400 ingrandimenti (b). La barra di riferimento è di 20 µm.

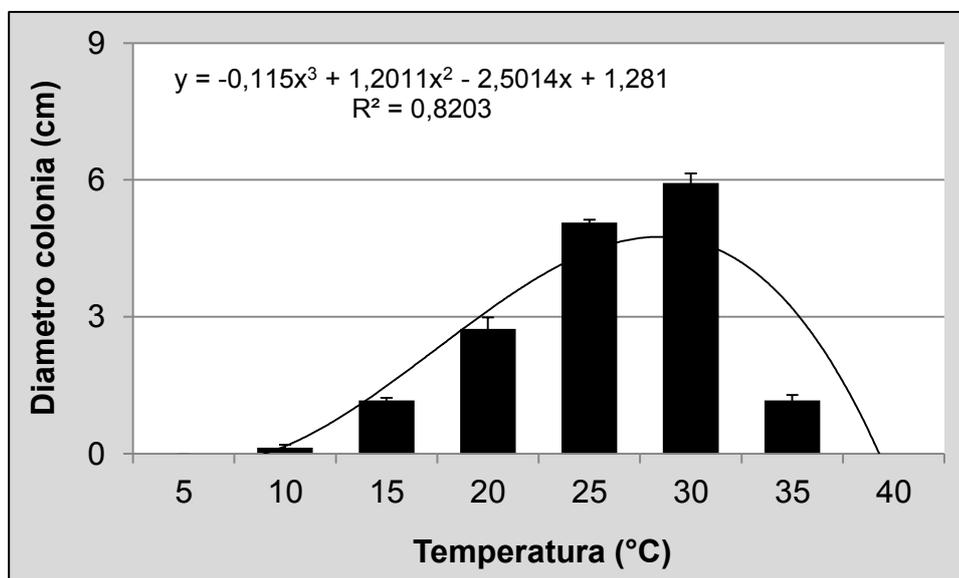


Figura 22. Effetto della temperatura sulla crescita miceliare di *Fusicoccum aesculi*.

Neofusicoccum parvum

Su PDA a 25 °C, gli isolati mostravano un micelio compatto, inizialmente bianco e successivamente virante al grigio scuro (Fig. 23a). Le colonie di questa specie differenziavano numerosi picnidi contenenti conidi ialini, assettati (solo a maturità differenziavano un setto), misuranti 13,8-(16,6)-20,4 × 3,5-(5,5)-7,3 µm, con un rapporto lunghezza/larghezza di 3,03 ± 0,41 (media ± deviazione standard; n = 50) (Fig. 23b). La dimensione dei conidi e il loro rapporto tra lunghezza e larghezza è in accordo con i valori riportati da Slippers *et al.*, (2004) per questa specie.

L'identificazione è stata confermata dall'analisi delle sequenze ITS di un isolato rappresentativo (BL21). La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con le sequenze degli isolati di *N. parvum* depositate in GenBank.

In relazione alle esigenze termiche, le migliori condizioni di sviluppo sono state osservate tra 20 e 30°C, con *optimum* intorno a 25°C (Fig. 24). A 5 e 40°C non è stato osservato alcun sviluppo miceliare do 60 ore di incubazione. A queste ultime due temperature il micelio rimane vitale e riprende a svilupparsi non appena trasferito in termostato a 25°C.

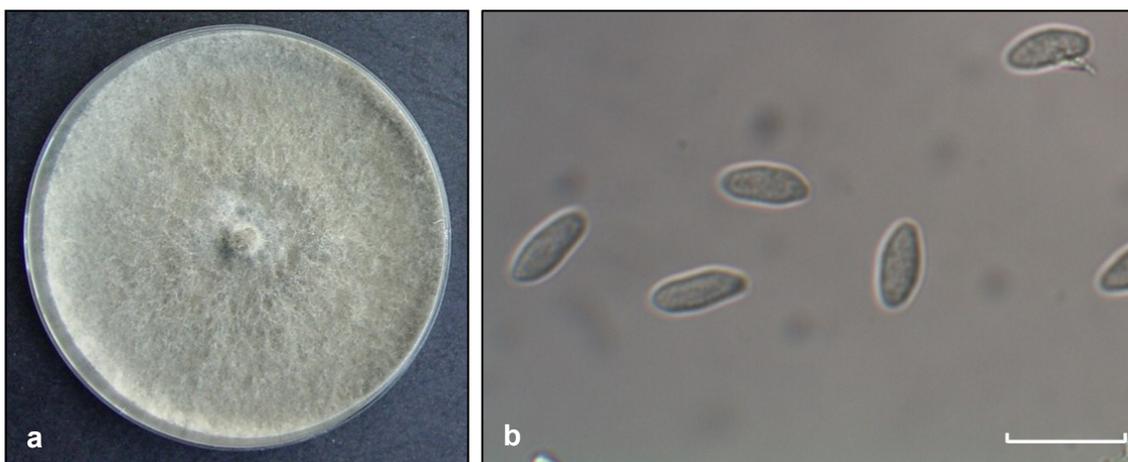


Figura 23. *Neofusicoccum parvum*: aspetto della colonia su PDA dopo 7 giorni a 25°C (a); conidi osservati a 400 ingrandimenti (b). La barra di riferimento è di 20 µm.

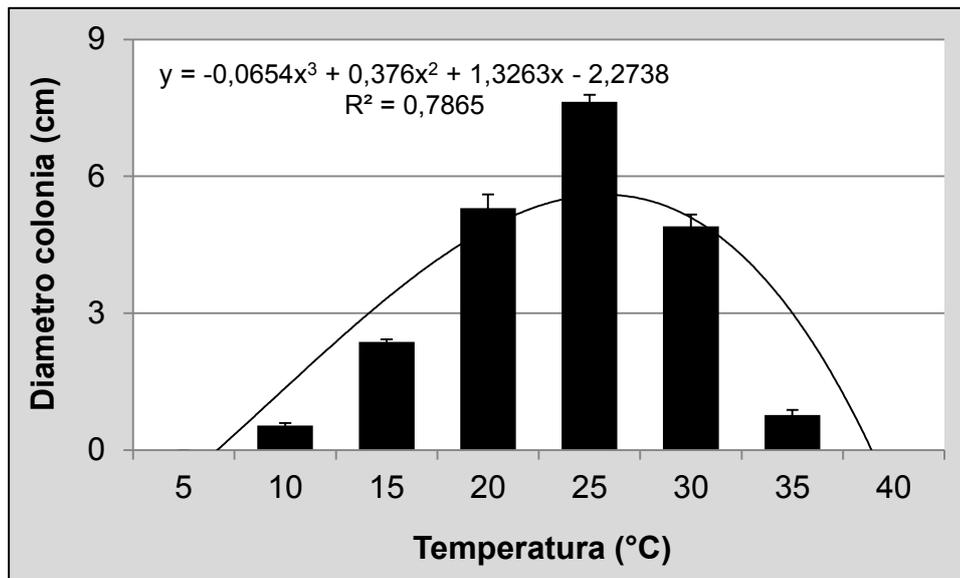


Figura 24. Effetto della temperatura sulla crescita miceliare di *Neofusicoccum parvum*.

4.3.3 Saggi di patogenicità

Tutti i semenzali di leccio sia di 6 mesi che di 3 anni inoculati con *D. corticola*, *D. seriata*, *F.aesculi* e *N. parvum* mostravano sintomi 30 giorni dopo l'inoculazione. Tutte e 4 le specie fungine hanno causato lesioni necrotiche sul fusto in prossimità del punto di infezione. Tuttavia, sono emerse differenze statisticamente significative tra le specie in relazione all'ampiezza delle lesioni causate (Fig. 25).

L'isolato di *D. corticola* è risultato in entrambi i saggi il più virulento causando la comparsa di una vasta area necrotica su tutta la circonferenza del fusto, la formazione di necrosi fogliari e, nella maggior parte dei casi, il disseccamento della porzione distale del fusto (Fig. 26). L'osservazione delle sezioni radiali e longitudinali del fusto, in corrispondenza dell'area necrotica, ha consentito di osservare come il processo degenerativo interessasse per un lungo tratto sia i tessuti corticali che quelli conduttori. Le piante disseccate hanno reagito emettendo nuovi getti sotto il punto d'inoculo. Nei semenzali di 3

anni al margine dell'area necrotica *D. corticola* ha differenziato numerosi picnidi scuri erompenti nel ritidoma.

N. parvum ha causato sintomi molto simili a quelli di *D. corticola*. Tuttavia la lunghezza delle lesioni è risultata statisticamente inferiore nei semenzali sia di 6 mesi che di 3 anni. Le lesioni che evolvevano in veri e propri "cancri" di forma depressa oltre alla corteccia interessavano anche i tessuti xilematici (Fig. 26). Non sono stati mai osservati picnidi nei semenzali inoculati con questo patogeno. *F. aesculi* e *D. seriata* hanno causato piccole lesioni necrotiche confinate al punto di inoculazione e nessun sintomo a livello fogliare, evidenziando una debole attitudine parassitaria (Fig. 26). I semenzali utilizzati come testimoni sono rimasti asintomatici e in prossimità della ferita la pianta ha reagito formando un callo cicatriziale (Fig. 26e).

Le 4 le specie di *Botryosphaeriaceae* saggiate sono state reisolate con successo dai tessuti sintomatici (legno e corteccia) di tutte le piante inoculate, completando così i postulati di Koch. Dalle piante testimone non è stato isolato alcun microrganismo fungino.

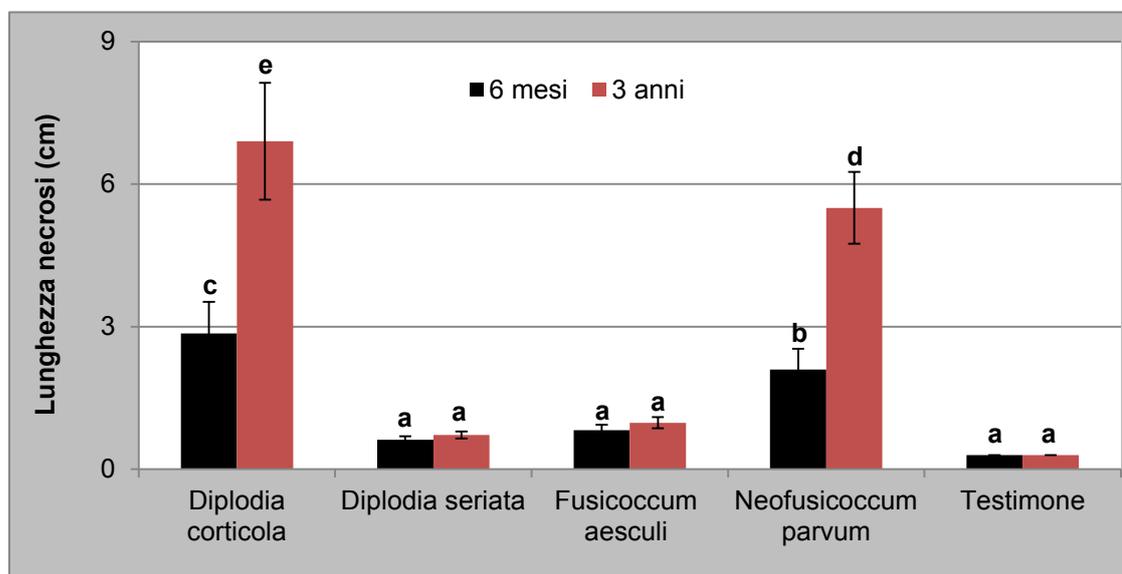


Figura 25. Lunghezza media delle lesioni necrotiche causate da *Diplodia corticola*, *Diplodia seriata*, *Fusicoccum aesculi* e *Neofusicoccum parvum* sul fusto dei semenzali di 6 mesi e 3 anni di leccio. Le barre rappresentano la deviazione standard. Istogrammi contrassegnati da lettere differenti differiscono in modo statisticamente significativo al test di confronto multiplo LSD per ($P=0,05$).

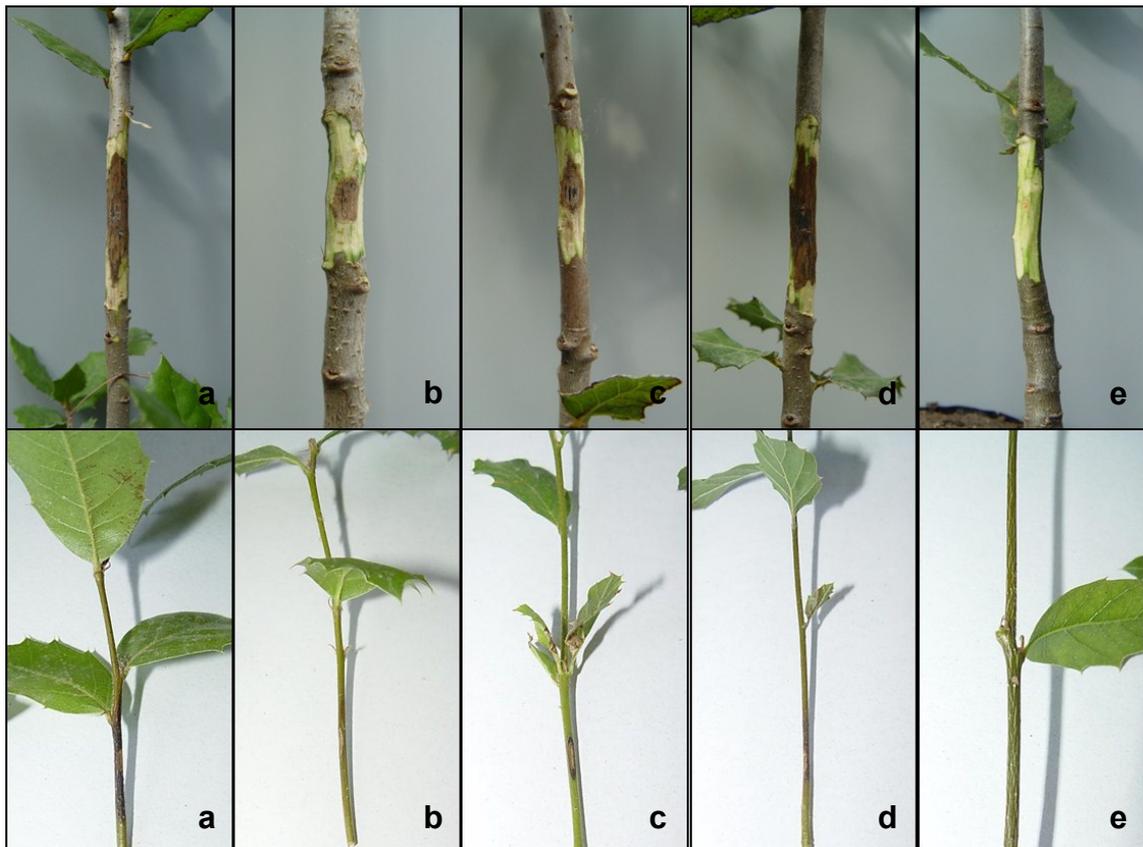


Figura 26. Lesioni necrotiche causate da *Diplodia corticola* (a), *Diplodia seriata* (b), *Fusicoccum aesculi* (c) e *Neofusicoccum parvum* (d) sul fusto dei semenzali di leccio di 3 anni (in alto) e 6 mesi (in basso), 30 giorni dopo l'inoculazione. Testimone asintomatico (e).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le ricerche condotte in questo lavoro di tesi hanno consentito di ampliare le conoscenze sui quadri sintomatologici associati ai fenomeni di deperimento nei popolamenti di corbezzolo, ginepro fenicio e leccio dell'Isola di Caprera e di identificare e caratterizzare i patogeni fungini coinvolti, completando gli obiettivi prefissati.

L'attività di monitoraggio ha consentito di individuare l'esistenza di gravi criticità legate ad attacchi di patogeni afferenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae*. Nello specifico, nei popolamenti di corbezzolo è stata rilevata un'elevata incidenza di piante con cancri e disseccamenti di rami e branche causati da *D. scrobiculata*. I quadri sintomatologici osservati sono del tutto nuovi sul corbezzolo in Sardegna. Finora i principali problemi fitopatologici di questa specie della macchia mediterranea erano rappresentati dalle infezioni di *Septoria unedonis* Roberge ex Desm. e *Elsinoë mattirolanum* G. Arnaud & Bitanc agenti di maculature necrotiche a livello fogliare. Questo rinvenimento assume pertanto particolare rilevanza scientifica perché rappresenta la prima segnalazione in assoluto di *D. scrobiculata* come un patogeno del legno del corbezzolo. Finora, infatti, *D. scrobiculata* è stata riscontrata principalmente come un debole patogeno e/o endofita asintomatico su conifere sia nell'emisfero australe che in quello boreale inclusa l'Italia (de Wet *et al.*, 2003; Burgess *et al.*, 2004; Linaldeddu *et al.*, 2006a; Bihon *et al.*, 2010). Dal punto di vista ecologico è interessante riportare che nelle aree di studio il corbezzolo cresce consociato con il pino domestico, e che proprio il pino potrebbe rappresentare la fonte primaria dell'inoculo del patogeno, visto che è stata accertata la presenza dei picnidi di *D. scrobiculata* negli strobili caduti a terra (Linaldeddu com. pers.).

Questa nuova associazione ospite-patogeno costituisce un esempio classico di "host jumps" termine che sta ad indicare un salto di ospite da parte di un patogeno (Slippers *et al.*, 2005). Casi di "host jumps" nella letteratura fitopatologica stanno divenendo sempre più frequenti. Ciò in seguito alla crescente diffusione di microrganismi fungini attraverso il materiale di

propagazione vegetale e/o attraverso le attività antropiche (Anderson *et al.*, 2004; Brasier, 2008). I rischi connessi ai possibili “salti di ospite” da parte dei patogeni fungini oltre ad suggerire la necessità di adottare tutte le misure di quarantena più idonee per impedire lo spostamento e l'introduzione accidentale di funghi patogeni in nuove aree geografiche, devono far riflettere sui possibili esiti nefasti di alcune scelte selvicolturali basate sulle consociazione tra specie native ed esotiche nei piani di rimboschimenti e/o imboschimenti. Scelte spesso dettate da criteri che tengono conto principalmente delle potenzialità produttive e della valenza economica delle piante e meno dei loro aspetti fitosanitari.

Le indagini svolte hanno inoltre consentito di chiarire gli aspetti eziologici dei gravi disseccamenti e morie che stanno interessando il ginepro fenicio in tutta l'Isola di Caprera.

Una malattia simile, a quella qui descritta su ginepro fenicio è stata segnalata negli Stati Uniti su *Juniperus* spp. negli anni '80 e l'agente eziologico identificato come *Diplodia mutila* (Tisserat *et al.*, 1988; Flynn e Gleason, 1993; Stanosz e Moorman, 1997).

Sempre negli anni '80 è stata rinvenuta una sindrome molto simile anche su cipresso (*Cupressus sempervirens* L.) in Israele (Solel *et al.*, 1987). Successivamente, questa stessa malattia è stata segnalata sempre su cipresso in altri paesi tra cui il Marocco (Frisullo e Graniti, 1990), l'Italia (Evidente *et al.*, 1996), il Sudafrica (Linde *et al.*, 1997), la Grecia (Xenopoulos e Tsopelas, 2000), e la Tunisia (Intini *et al.*, 2005). In tutti questi casi, gli isolamenti effettuati dai campioni di cipresso sintomatici restituivano sempre uno stesso microrganismo fungino che, secondo Solel *et al.* (1987), era morfologicamente vicino alla specie *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx f. (sin. *Sphaeropsis sapinea* (Fr.: Fr) Dyko & B. Sutton). Pertanto, Solel e coll. considerarono questo fungo del cipresso come una sottospecie del patogeno polifago *D. pinea*, e lo chiamarono *D. pinea* f. sp. *cupressi*. Quest'ultimo si differenziava da *D. pinea* principalmente per le dimensioni dei conidi che erano più piccoli, privi di ornamenti nelle pareti esterne e diversamente pigmentati.

Inoltre, a differenza di *D. pinea*, patogeno aggressivo su tutte le specie del genere *Pinus*, *D. pinea* f. sp. *cupressi* nei saggi di inoculazione artificiale su pini non causava nessun sintomo di malattia (Solel *et al.*, 1987; Linde *et al.*, 1997; Xenopoulos e Tsopelas, 2000).

Successivi studi condotti da Swart *et al.* (1993) confermarono l'esistenza di profonde differenze tra *D. pinea* e *D. pinea* f. sp. *cupressi* non solo sotto l'aspetto morfologico, ma anche in relazione ai rispettivi profili isoenzimatici. La differenza di queste due specie fu ulteriormente accertata da Zhou e Stanosz (2001a) anche sulla base di riscontri a livello molecolare.

Peraltro, Stanosz *et al.* (1998) notarono una stretta affinità morfologica tra la specie riportata come *D. mutila* su *Juniperus* spp. negli U.S.A. da Tisserat *et al.* (1988) e *D. pinea* f. sp. *cupressi*. A tale proposito c'è da rilevare che:

- le indagini effettuate da Tisserat *et al.* (1988) mettevano chiaramente in evidenza l'esistenza di differenze tra gli isolati di *D. mutila* da ginepro e da *Malus pumila* Mill;

- le analisi filogenetiche effettuate da Zhou e Stanosz (2001a, b) e da Zhou *et al.* (2001) confermavano, da un lato la stretta relazione esistente tra *D. mutila* da ginepro e *D. pinea* f. sp. *cupressi* e, dall'altro lato, che entrambe queste specie differivano marcatamente dagli isolati di *D. mutila* da *M. pumila*.

Infine, più di recente, Alves *et al.* (2006) sulla base di evidenze di tipo sia morfologico che genetico, dimostrarono che i patogeni agenti di cancri su ginepro negli USA e su cipresso in Europa e in Africa appartengono in realtà alla stessa specie, morfologicamente e filogeneticamente ben separata sia da *D. mutila* che da *D. pinea*, proponendo quindi per essa il nuovo binomio *Diplodia cupressi*.

Il patogeno isolato da ginepro fenicio in Sardegna e identificato come *D. africana* differisce da *D. cupressi* per quanto riguarda la dimensione dei conidi, la morfologia delle colonie e il tasso di crescita radiale. Inoltre, i dati delle sequenze ITS ed EF1- α chiaramente separano *D. africana* da *D. cupressi* e da qualsiasi altra specie di *Diplodia*.

D. africana è un patogeno di recente descrizione e finora era stato segnalato solo in Sud Africa su fruttiferi (Damm *et al.*, 2007). Pertanto il suo rinvenimento in Sardegna rappresenta la prima segnalazione di questo patogeno nell'emisfero settentrionale, ma anche la prima segnalazione in assoluto come patogeno del ginepro fenicio.

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

A supporto di questa ipotesi è il recente rinvenimento di *D. africana* patogena su una pianta isolata di *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *oxycedrus*, con evidenti sintomi di disseccamento dei rami, che vegeta tra le rovine dell'anfiteatro romano di Cagliari (Linaldeddu, com. pers.).

Il quadro eziologico dei sintomi osservati su ginepro fenicio si complica ulteriormente se si considera che altre due *Botryosphaeriaceae*: *N. australe* e in misura minore *N. lutea* sono associate a questa malattia. Entrambe queste due specie fungine vengono qui segnalate per la prima volta come patogeni del ginepro fenicio.

N. australe è un patogeno polifago originariamente descritto nell'emisfero australe su piante native dell'Australia (Slippers *et al.*, 2004b; Burgess *et al.*, 2006). Di recente è stato segnalato come un patogeno di varie specie vegetali di interesse sia agrario che forestale in diverse nazioni (Armengol *et al.*, 2008; Amponsah *et al.*, 2009; Espinoza *et al.*, 2009; Lazzizzera *et al.*, 2008; Linaldeddu

et al., 2010c). In un recente studio effettuato da alcuni ricercatori australiani (Sakalidis *et al.*, 2011), gli autori hanno dimostrato attraverso l'analisi di tutte le sequenze ITS di *N. australe* depositate in GenBank la presenza per questa specie di più aplotipi di cui uno dominante denominato (H1) e di altri 12 rari o moderatamente rari. Gli isolati di *N. australe* ottenuti in questo studio appartengono all'aplotipo (H1) proposto dai ricercatori australiani, aplotipo finora mai segnalato in Italia. Il ritrovamento di questo patogeno su un ospite nativo della Sardegna come il ginepro fenicio apre nuovi ed interessanti argomenti di discussione sull'origine geografica di *N. australe*; infatti precedentemente questo patogeno è stato segnalato su specie native quasi esclusivamente nell'ovest dell'Australia mentre la gran parte delle altre segnalazioni hanno riguardato piante coltivate (Sakalidis *et al.*, 2011).

N. luteum nel corso di questo studio è stato isolato solo da tre piante perciò è difficile allo stato attuale delle conoscenze capire quali sia il suo reale ruolo nell'eziologia dei disseccamenti che stanno interessando il ginepro fenicio. Di certo, anche alla luce di questo rinvenimento e considerata l'elevata virulenza mostrata da tutte e tre le specie fungine su ginepro fenicio, appare quanto mai opportuno estendere le indagini effettuate per questa tesi a tutti i ginepreti della Sardegna al fine di verificare il loro stato fitosanitario e, in particolare, l'eventuale diffusione di infezioni di queste o di altre *Botryosphaeriaceae*. Ciò anche con l'intento di ampliare le conoscenze sulla bio-ecologia di questi patogeni "emergenti" in ambiente mediterraneo e, di conseguenza, delineare le strategie più adeguate per salvaguardare la grande valenza ecologica degli ecosistemi a ginepro della Sardegna.

Infine, le ricerche hanno consentito di chiarire gli aspetti sintomatologici ed eziologici sui fenomeni di deperimento recentemente riscontrati nei boschi di leccio dell'Isola di Caprera. Infatti, finora ad ora il deperimento delle querce è stato riportato in letteratura con differenti quadri sintomatologici che, tuttavia sono riconducibili a due forme principali di deperimento: una cronica caratterizzata da ingiallimento e rarefazione della chioma, proliferazione di rami epicormici, disseccamento progressivo di branche a partire da quelle distali e

una acuta caratterizzata dalla morte improvvisa delle piante anche adulte e da un mancato ricaccio dei polloni (Manion, 1991). Ai fenomeni di deperimento cronico in genere sono associati patogeni del fusto e delle branche ad *habitus* endofitico quali *Biscogniauxia mediterranea*, *Discula quercina* e *Phoma cava* (Anselmi *et al.*, 2004; Moricca e Ragazzi, 2008; Linaldeddu *et al.*, 2011). Mentre nelle forme di deperimento acuto in genere sono coinvolti patogeni ad *habitus* terricolo in grado di distruggere l'apparato radicale delle piante quali *Phytophthora cinnamomi* e *P. quercina* (Brasier, 1992, 1996; Jung *et al.*, 1996).

I quadri sintomatologici riscontrati nei boschi di leccio dell'Isola di Caprera includono entrambe queste due forme di deperimento. Tuttavia, essi presentano delle peculiarità finora non riportate in letteratura. Peculiarità dovute al fatto che gli attacchi di *D. corticola* nel bosco di Caprera hanno assunto in breve tempo una dimensione epidemica mai riscontrata finora nelle formazioni quercine sarde. Essi si sono manifestati con un'intensità tale da compromettere la sopravvivenza della maggior parte delle piante di leccio che vegetano nell'Isola. Ciò anche perché, molto spesso, alle infezioni di *D. corticola* sono connesse quelle di *P. cinnamomi* a livello dell'apparato radicale (Linaldeddu com. pers.).

D. corticola, è una specie caratterizzata da un'ampia adattabilità ecologica (Linaldeddu *et al.*, 2010a). Essa è capace di sopravvivere in latenza come endofita nei tessuti corticali dell'ospite (Linaldeddu *et al.*, 2011), ma anche di esprimere livelli elevati di virulenza causando cancri, necrosi corticali e disseccamenti su fusti, branche e rami (Luque e Girbal, 1989; Linaldeddu *et al.*, 2009aa). In Sardegna le sue infezioni finora avevano interessato principalmente la quercia da sughero. Nelle piante più giovani esse assumono spesso carattere sistemico provocando la morte delle piante in breve tempo; mentre in quelle adulte causano un declino lento accompagnato da una perdita progressiva di vitalità e produttività (Franceschini *et al.*, 1999). Dal punto di vista economico risultano particolarmente dannose le infezioni che si verificano nel fusto delle piante in produzione, subito dopo la decortica, in quanto pregiudicano la rigenerazione del sughero nelle zone colonizzate dal patogeno

(Luque *et al.*, 2008). I motivi che hanno causato questo attacco epidemico su leccio nell'Isola di Caprera restano ancora sconosciuti, perciò si rendono necessari ulteriori studi al fine di approfondire le conoscenze sul grado di variabilità intraspecifica di questo patogeno e sull'effetto dei parametri ambientali sulla sua capacità patogenetica e riproduttiva. A tal riguardo, tutti i cancri esaminati presentavano picnidi di *D. corticola* erompenti dal ritidoma.

Questi studi si rendono necessari anche in virtù del fatto che negli ultimi anni le segnalazioni di attacchi di *D. corticola* sono progressivamente aumentate e hanno interessato varie specie quercine in California, Florida, Grecia e Tunisia (Linaldeddu *et al.*, 2009a; Linch *et al.*, 2010; Tsopelas *et al.*, 2010; Dreaden *et al.*, 2011), ma anche piante di interesse agrario quale la vite in California, Italia e Texas (Carlucci e Frisullo, 2009; Urbez-Torres *et al.*, 2009, 2010).

Dai cancri esaminati è emersa la presenza di altre 3 *Botryosphaeriaceae*, tuttavia vista la limitata incidenza con cui sono state rivenute, il loro ruolo nell'eziologia dei fenomeni di deperimento sembrerebbe solo marginale. È pur vero che l'isolato di *N. parvum* nei saggi di patogenicità ha dimostrato un elevato grado di virulenza confermando quanto precedentemente riportato su quercia da sughero da Linaldeddu *et al.* (2007b). Mentre, l'isolato di *F. aesculi* in entrambi i saggi di patogenicità si è dimostrato poco aggressivo. Questo dato contrasta con quanto precedentemente riportato da Sanchez *et al.* (2003) su leccio, da Turco *et al.* (2006) su quercia rossa e farnia e da Linaldeddu *et al.* (2009b) su quercia da sughero e suggerisce la presenza di una spiccata variabilità intraspecifica in termini di patogenicità in seno alle popolazioni di questo patogeno.

Un discorso a parte merita *D. seriata*, sebbene sia stata segnalata come patogeno su numerosi ospiti in molti Paesi, la sua patogenicità è ancora poco chiara. In varie prove, condotte con isolati diversi, e su differenti ospiti sono emersi dati contrastanti che hanno creato una grande confusione riguardo la virulenza di questa specie. In questo studio ha dimostrato di essere la specie meno aggressiva su leccio.

In conclusione, il lavoro di questa tesi ha consentito di ampliare le conoscenze sulla bio-ecologia di 8 specie appartenenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae* segnalando 6 nuove associazioni ospite-patogeno e una specie nuova per l'Italia, *Diplodia africana*.

I risultati conseguiti sottolineano la necessità di adottare nel breve periodo idonei interventi di bonifica fitosanitaria volti a circoscrivere e/o eradicare i focolai d'infezione delle specie di *Botryosphaeriaceae* rinvenute nelle aree boschive dell'Isola di Caprera, al fine di evitare un'ulteriore diffusione delle infezioni sia ad altre specie della macchia mediterranea potenzialmente suscettibili a questi patogeni sia alle stesse piante ospiti che vegetano nelle varie Isole che caratterizzano l'Arcipelago di La Maddalena.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alves A., Correia A., Luque J., Phillips A. 2004. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia* 96: 598-613.
- Alves A., Correia A., Phillips A.J.L. 2006. Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. *Fungal Diversity* 23: 1-15.
- Alves A., Crous P.W., Correia A., Phillips, A.J.L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28: 1-13.
- Amponsah N.T., Jones E.E., Ridgway H.J., Jaspers M.V. 2009. First report of *Neofusicoccum australe* [*Botryosphaeria australis*], a cause of grapevine dieback in New Zeland. *Australasian Plant Disease Notes* 4: 6-8.
- Amponsah N.T., Jones E.E., Ridgway H.J., Jaspers M.V. 2011. Susceptibility of grapevine tissues to *Neofusicoccum luteum* conidial infection. *Plant Pathology* (Doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02548.x).
- Anderson P., Cunningham A.A., Patel N.G., Morales F.J., Epstein P.R., Daszak P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *TRENDS in Ecology and Evolution* 19: 535-544.
- Anselmi, N.; Cellerino, G.P.; Franceschini, A.; Granata, G.; Luisi, N.; Marras, F.; Mazzaglia, A.; Mutto Accordi, S.; Ragazzi, A. 2004: Geographic distribution of fungal endophytes of *Quercus* sp. in Italy. In: *Endophytism in Forest Trees*. Ed. by Ragazzi, A.; Moricca, S.; Dellavalle, I. Firenze: Accademia Italiana di Scienze Forestali, pp. 73-89.
- Armengol J., Gramaje D., Pérez-Sierra A., Landeras E., Alzugaray R., Luque J., Martos S. 2008. First report of canker disease caused by *Neofusicoccum australe* on *Eucalyptus* and pistachio in Spain. *Plant Disease* 92: 980.
- Arnold A.E., Mejia L.C., Kylo D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N., Herre E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15649-15654.
- Arrigoni P.V. 1968. Fitoclimatologia della Sardegna. *Webbia* 23(1): 1-100.

- Begoude D., Slippers B., Wingfield M.J., Roux J. 2010. The pathogenic potential of endophytic Botryosphaeriaceous fungi on *Terminalia* species in Cameroon. *Forest Pathology*: 41(4): 281-292.
- Bihon W., Slippers B., Burgess T., Wingfield M.J., Wingfield B.D. 2010. *Diplodia scrobiculata* found in the southern hemisphere. *Forest Pathology* (doi: 10.1111/j.1439-0329.2010.00649.x).
- Blodgett, J.T., Kruger, E.L., and Stanosz, G.R. 1997. Effects of moderate water stress on disease development by *Sphaeropsis sapinea* on red pine. *Phytopathology* 87:422-428.
- Bohlen P.J. 2006. Biological invasions: linking the above ground and below ground consequences. *Applied Soil Ecology* 32: 1-5.
- Brasier C.M. 1992. Oak tree mortality in Iberia. *Nature* 360: 539.
- Brasier C.M. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annales des Sciences Forestières* 53: 347-358.
- Brasier C.M. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathology* 57: 792-808.
- Burgess T., Gordon T.R., Wingfield M.J., Wingfield B.D. 2004. Geographic isolation of *Diplodia scrobiculata* and its association with native *Pinus radiata*. *Mycological Research* 108: 1399-1406.
- Burgess T.I., Sakalidis M., Hardy G.E.StJ. 2006. Gene flow of the canker pathogen *Botryosphaeria australis* between *Eucalyptus globulus* plantations and native eucalypt forests in Western Australia. *Austral Ecology* 31: 559-566.
- Campanile G., Ruscelli A. & Luisi N. 2007. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. *European Journal of Plant Pathology* 117, 237-246.
- Carbone I., Kohn L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous *Ascomycetes*. *Mycologia* 91: 553-556.
- Carlucci A., Frisullo S. 2009. First report of *Diplodia corticola* on grapevine in Italy. *Journal of Plant Pathology* 91: 231.
- Cilliers A.J., Swart W.J., Wingfield M.J. 1995. The occurrence of *Lasiodiplodia theobromae* on *Pinus elliotii* seeds in South Africa. *Seed Science and Technology* 23: 851-860.

- Collado J., Platas G., González I., Peláez F. 1999. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytologist* 144: 525-532.
- Copes W.E., Hendrix F.F. Jr. 2004. Effect of temperature on sporulation of *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtusa* and *B. rhodina*. *Plant Disease* 88: 292-296.
- Crous P.W., Slippers B., Wingfield M.J., Rheeder J., Marasas W.F.O., Phillips A.J.L., Alves A., Burgess T., Barber P., Groenewald J.Z. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55: 235-253.
- Damm U., Crous P.W., Fourie P.H. 2007. *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99: 664-680.
- Denman S., Crous P.W., Taylor J.E., Kang J.C., Pascoe I., Wingfield M.J. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria* and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45: 129-140.
- Denman, S.; Crous, P. W.; Sadie, A.; Wingfield, M. J., 2004: Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria protearum* on *Protea magnifica* in the Western Cape Province of South Africa. *Australasian Plant Pathology*. 33, 97-102.
- Desprez-loustau M.L., Marçais B., Nageleisen L.M., Louis-Michel N., Dominique Piou D., Vannini A. 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science* 63: 597-612.
- Desprez-Loustau M.L., Robin C., Buée M., Courtecuisse R., Garbaye J., Suffert F., Sache I., Rizzo D.M. 2007. The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 22(9): 472-480.
- de Wet J., Burgess T., Slippers B., Preisig O., Wingfield B.D., Wingfield M.J. 2003. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycological Research* 107: 557-566.
- de Wet J., Slippers B., Preisig O., Wingfield B.D., Wingfield M.J. 2008. Phylogeny of the *Botryosphaeriaceae* reveals patterns of host association. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 116-126.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.

- Dreaden T. J., Shin K., Smith J. A. 2011. First Report of *Diplodia corticola* Causing Branch Cankers on Live Oak (*Quercus virginiana*) in Florida. Plant Disease 95(8): 1027.
- Espinoza J.G., Briceño E.X., Chávez E.R., Úrbez-Torres J.R., Latorre B.A. 2009. *Neofusicoccum* spp. associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile. Plant Disease 93: 1187-1194.
- Essl F., Rabitsch W. 2002. Neobiota in Österreich, Federal Environmental Agency, Vienne, Austria.
- Evidente A., Sparapano L., Motta A., Giordano F., Fierro O., Frisullo S. 1996. A phytotoxic pimarane diterpene of *Sphaeropsis sapinea* f. sp. *cupressi*, the pathogen of a canker disease of cypress. Phytochemistry 42: 1541-1546.
- Evidente A., Sparapano L., Fierro O., Bruno G., Giordano F., Motta A., 1997. Sphaeropsidins B and C, phytotoxic pimarane diterpenes from *Sphaeropsis sapinea* f. sp. *cupressi* and *Diplodia mutila*. Phytochemistry 45: 705-713.
- Evidente A., Maddau L., Spanu E., Franceschini A., Lazzaroni S., Motta A. 2003. Diplopyrone, a new phytotoxic tetrahydropyranpyran-2-one produced by *Diplodia mutila*, a fungus pathogen of cork oak. Journal of Natural Products 66: 313-315.
- Evidente A., Andolfi A., Maddau L., Franceschini A., Marras F. 2005. Biscopyran, a phytotoxic hexasubstituted pyranopyran produced by *Biscognauxia mediterranea*, a fungus pathogen of cork oak. Journal of Natural Products 68: 568-571.
- Feci E., Battisti A., Capretti P., Tegli S. 2002. An association between the fungus *Sphaeropsis sapinea* and the cone bug *Gastrodes grossipes* in cones of *Pinus nigra* in Italy. Forest Pathology 32: 241-247.
- Feci E., Smith D., Stanosz G.R. 2003. Association of *Sphaeropsis sapinea* with insect-damaged red pine shoots and cones. Forest Pathology 33: 7-13.
- Flynn P.H., Gleason M.L. 1993. Isolation of *Botryosphaeria stevensii*, cause of *Botryosphaeria* canker, from rocky mountain juniper in Iowa. Plant Disease 77: 210.
- Franceschini A., Corda P., Maddau L., Marras F. 1999. Observations sur *Diplodia mutila*, pathogène du chêneliège en Sardaigne. IOBC/wprs Bulletin 22(3): 5-12.
- Franceschini A., Linaldeddu B.T., Pisanu P., Pisanu S. 2004. Effects of water stress on endophytic incidence of *Biscognauxia mediterranea* in cork oak trees. Journal of Plant Pathology 86: 319-320.

- Franceschini A., Longo S. Moricca S. 2008. Avversità biotiche e mutamenti climatici in ambienti forestali. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Vol.II: 605-610.
- Frisullo S., Graniti A. 1990. New records of *Botryosphaeria* and *Diplodia* cankers of cypress. In: *Proc. 8th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union* (ed. A. Bouzouraa). Actes Editions, Rabat, Morocco: 431-432.
- Giorgio E., Maddau L., Spanu E., Evidente A., Rosini C. 2005. Assignment of the absolute configuration of (+)-diplopyrone, the main phytotoxin produced by *Diplodia mutila*, the pathogen of the cork oak decline, by a nonempirical analysis of its chiroptical properties. *Journal of Organic Chemistry* 70(1): 7-13.
- Golzar H., Burgess T.I. 2011. *Neofusicoccum parvum*, a causal agent associated with cankers and decline of Norfolk Island pine in Australia. *Australasian Plant Pathology* 40: 484-489.
- Hill M., Baker R., Broad G., Chandler P.J., Copp G.H., Ellis J., Jones D., Hoyland C., Laing I., Longshaw M., Moore N., Parrott D., Pearman D., Preston C., Smith R.M., Waters R. 2005. Audit of non-native species in England. *English Nature Research Reports*, Number 662
- Intini M., Panconesi A., Ben Jamâa M.L., Stanosz G., Smith D. 2005. First report of *Diplodia* canker of cypress caused by *Diplodia pinea* f. sp. *cupressi* on Mediterranean cypress in Tunisia. *Plant Disease* 89: 1246.
- Johnson G.I., Mead A.J., Cooke A.W., Dean J.R. 1992. Mango stem and rot pathogens – Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology* 120: 225-234.
- Jung T., Blaschke H., Neumann P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology* 26: 253-272.
- Jurc D., Ogris N. 2006. First reported outbreak of charcoal disease caused by *Biscogniauxia mediterranea* on Turkey oak in Slovenia. *Plant Pathology* 55: 299.
- La Porta N., Capretti P., Thomsen I.M., Kasanen R., Hietala A.M., Von Weissenberg K. 2008. Forest pathogens with higher damage potential due to climate change in Europe. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30: 177-195.

- Lazzizzera C., Frisullo S., Alves A., Phillips A.J.L. 2008. Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drupe rot of olives in southern Italy. *Plant Pathology* 57: 948-956.
- Li H.Y., Cao R.B., Mu Y.T. 1995: In-vitro inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach-trees in Zhejiang province, China. *Crop Protection* 14, 187-191.
- Linaldeddu B.T., Maddau L., Franceschini A. 2006a. First report of shoot blight caused by *Diplodia scrobiculata* on *Pinus radiata* trees in Italy. *Journal of Plant Pathology* 88(3, Supplement): S66.
- Linaldeddu B.T., Luque J., Franceschini A. 2006b. Occurrence of *Botryosphaeria obtusa* in declining cork oak trees in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 88 (3, Suppl.): 66.
- Linaldeddu B.T., Maddau L., Franceschini A. 2007a. Attività antagonistica di isolati endofitici di *Trichoderma* spp. verso *Botryosphaeriaceae* associate al deperimento della quercia da sughero. *Micologia Italiana* 36(2): 22-29.
- Linaldeddu B.T., Franceschini A., Luque J., Phillips A.J.L. 2007b. First report of canker disease caused by *Botryosphaeria parva* on cork oak trees in Italy. *Plant Disease* 91(3): 324.
- Linaldeddu B.T., Hasnaoui F., Franceschini A. 2009a. First report of *Botryosphaeria corticola* affecting *Quercus afares* and *Q. canariensis* in Tunisia. *Journal of Plant Pathology* 91(1): 234.
- Linaldeddu B.T., Scanu B., Schiaffino A., Zanda A., Franceschini A. 2009b. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing canker and branch dieback on *Quercus suber* in Italy. *Journal of Plant Pathology* 91(4): S104
- Linaldeddu B.T., Sirca C., Spano D., Franceschini A. 2009c. Physiological responses of cork oak and holm oak to infection by pathogens involved in oak decline. *Forest Pathology* 39(4): 232-238.
- Linaldeddu B.T., Maddau L., Franceschini A. 2010a. Nuove acquisizioni su aspetti epidemiologici del patosistema *Quercus suber/Botryosphaeria corticola* in Sardegna. *Micologia Italiana* 39(2): 49-57.
- Linaldeddu B.T., Scanu B., Franceschini A. 2010b. First report of *Diplodia scrobiculata* causing canker and branch dieback on strawberry tree (*Arbutus unedo*) in Italy. *Plant Disease* 94(7): 919.

- Linaldeddu B.T., Scanu B., Schiaffino A., Serra S. 2010c. First report of *Neofusicoccum australe* associated with grapevine cordon dieback in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 49(3): 417-420.
- Linaldeddu B.T., Sirca C., Spano D., Franceschini A. 2011. Variation of endophytic cork oak-associated fungal communities in relation to plant health and water stress. *Forest Pathology* 41: 193-201.
- Linde C., Kemp G.H.J., Wingfield M.J. 1997. First report of *Sphaeropsis* canker of cypress in South Africa. *European Journal of Forest Pathology* 27: 173-177.
- Luque J, Girbal J, 1989. Dieback of cork oak (*Quercus suber*) in Catalonia (NE Spain) caused by *Botryosphaeria stevensii*. *European Journal of Forest Pathology* 19: 7-13.
- Luque J., Pera J. & Parlade' J. 2008. Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria corticola* on cork oak in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology* 38, 147-155.
- Lynch S.C., Eskalen A., Zambino P., Scott T. 2010. First report of Bot Canker caused by *Diplodia corticola* on coast live oak (*Quercus agrifolia*) in California. *Plant Disease* 94(12): 1510.
- Ma Z.G., Morgan D.P., Felts D., Michailides T.J. 2002. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio to tebuconazole. *Crop Protection* 21, 829-835.
- Maddau L., Spanu E., Franceschini A., Marras F., Andolfi A., Fiore M., Evidente A. 2006. Phytotoxic metabolites produced by fungi involved in cork oak decline. Proceedings of the 12th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 11-15 June 2006 Rhodes island, Hellas: 353-355.
- Maddau L., Cabras A., Franceschini A., Linaldeddu B.T., Crobu S., Roggio T., Pagnozzi D. 2009. Occurrence and characterization of peptaibols from *Trichoderma citrinoviride*, an endophytic fungus of cork oak, using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microbiology* 155: 3371-3381.
- Maddau L., Perrone C., Andolfi A., Spanu E., Linaldeddu B.T., Evidente A. 2011. Phytotoxins produced by the oak pathogen *Discula quercina*. *Forest Pathology* 41: 85-89.
- Manion P.D. 1991. Tree disease concepts. 2nd edition. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey, 402 pp.

- Moricca S., Ragazzi A. 2008. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology* 98: 380-386.
- Ogris N., Hauptman T., Jurc D., Floreancig V., Marsich F., Montecchio L. 2010. First report of *Chalara fraxinea* on common ash in Italy. *Plant Disease* 94(1): 133.
- Paoletti E., Danti R., Strati S. 2001. Pre- and post-inoculation water stress affects *Sphaeropsis sapinea* canker length in *Pinus halepensis* seedlings, *Forest Pathology* 31: 209-218.
- Paoletti E., Anselmi N., Franceschini A. 2007. Pre-exposure to ozone predisposes oak leaves to attacks by *Diplodia corticola* and *Biscogniauxia mediterranea*. *The Scientific World Journal* 7 (S1): 222-230.
- 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.
- Petrini O., Fisher P.J. 1988. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Transactions of the British Mycological Society* 91: 233-238.
- Phillips A.J.L., Alves A., Correia A., Luque J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97: 513-529.
- Phillips A.J.L., Crous P.W., Alves A. 2007. *Diplodia seriata*, the anamorph of "*Botryosphaeria*" *obtusa*. *Fungal Diversity* 25: 141-155.
- Phillips A.J.L., Alves A., Pennycook S.R., Johnston P.R., Ramaley A., Akulov A., Crous P.W. 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*. *Persoonia* 21: 29-55.
- Piskur B., Pavlic D., Slippers B., Ogris N., Maresi G., Wingfield M.J., Jurc D. 2011. Diversity and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* on declining *Ostrya carpinifolia* in Slovenia and Italy following extreme weather conditions. *European Journal of Forest Research* 130 (2): 235-249.
- Rodas C.A., Slippers B., Gryzenhout M., Wingfield M.J. 2010. *Botryosphaeriaceae* associated with Eucalyptus canker diseases in Colombia. *Forest Pathology*. 39: 110-123.

- Sakalidis M.L., Hardy G.E.StJ., Burgess T.I. 2011. Class III endophytes, clandestine movement amongst hosts and habitats and their potential for disease; a focus on *Neofusicoccum australe*. *Australasian Plant Pathology* 40: 510–521.
- Sanchez M.E., Venegas J., Romero M.A., Phillips A.J.L., Trapero A. 2003. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Disease* 87: 1515-1521.
- Schoeneweiss D.F. 1981. The role of environmental stress in diseases of woody plants. *Plant disease* 65: 308-314.
- Sieber T.N. 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews* 21: 75-89.
- Slippers B., Crous P.W., Denman S., Coutinho T.A., Wingfield B.D., Wingfield M.J. 2004a. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96: 83-101.
- Slippers B., Fourie G., Crous P.W., Coutinho T.A., Wingfield B.D., Wingfield M.J. 2004b. Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. *Mycologia* 96: 1030-1041.
- Slippers B., Stenlid J., Wingfield M.J. 2005. Emerging pathogens: fungal host jumps following anthropogenic introduction. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20 (8): 420-421.
- Slippers B., Wingfield M.J. 2007. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 2: 90-106.
- Slippers B., Burgess T., Pavlic D., Ahumada R., Maleme H., Mohali S., Rodas C., Wingfield M.J. 2009. A diverse assemblage of Botryosphaeriaceae infect *Eucalyptus* in native and non-native environments. *Southern Forests* 71: 101-110.
- Smith H., Kemp G.H.J., Wingfield M.J. 1994. Canker and dieback of *Eucalyptus* in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Pathology* 43: 1031-1034.
- Smith H., Wingfield M.J., Crous P.W., Coutinho T.A. 1996a. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. *South African Journal of Botany* 62: 86-88.

- Smith H., Wingfield M.J., Petrini O. 1996b. *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus nitens* in South Africa. *Forest Ecology and Management* 89: 189-195.
- Solel Z., Madar Z., Kimchi M., Golan Y. 1987. *Diplodia* canker of cypress. *Canadian Journal of Plant Pathology* 9: 115-118.
- Solla A., Perez-Sierra A., Corcobado T., Haquec M.M., Diezc J.J., Jung T. 2010. *Phytophthora alni* on *Alnus glutinosa* reported for the first time in Spain. *Plant Pathology* 59: 798.
- Sparapano L., Bruno G., Fierro O., Evidente A., 2004. Studies on structure - activity relationship of sphaeropsidins A-F, phytotoxins produced by *Sphaeropsis sapinea* f.sp.*cupressi*. *Phytochemistry* 65: 189-198.
- Stanosz G.R.; Smith D.R. 1996: Evaluation of fungicides for control of *Sphaeropsis* shoot blight of red pine nursery seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 26, 492-497.
- Stanosz G.R., Moorman G.W. 1997. Branch dieback of savin juniper in Pennsylvania caused by *Diplodia mutila*. *Plant Disease* 81: 111.
- Stanosz G.R., Swart W.J., Smith D.R. 1998. Similarity between fungi identified as *Diplodia pinea* f. sp. *cupressi* in Israel and *Botryosphaeria stevensii* or *Diplodia mutila* on *Juniperus* in the United States. *European Journal of Forest Pathology* 28: 33-42.
- Stone, J. K., Sherwood, M. A. & Carroll, G. C. 1996. Canopy microfungi: function and diversity. *Northwest Sciences* 70: 37-45.
- Swart W.J., Wingfield M.J. 1991. Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. *Plant Disease* 75: 761-766.
- Swart W.J., Wingfield M.J., Grant W.S. 1993. Comparison of *Sphaeropsis sapinea* and *Sphaeropsis sapinea* f. sp. *cupressi*. *Mycological Research* 97: 1253-1260.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbett D.S., Fisher M.C., 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31: 21-32.
- Tisserat N.A., Rossman A.Y., Nus A. 1988. A canker disease of rocky mountain juniper caused by *Botryosphaeria stevensii*. *Plant Disease* 72: 699-701.
- Tsopelas P., Slippers B., Gonou-Zagouc Z., Wingfield M.J. 2010. First report of *Diplodia corticola* in Greece on kermes oak (*Quercus coccifera*). *Plant Pathology* 59: 805.

- Turco E., Marianelli L., Vizzuso C., Ragazzi A., Gini R., Selleri B., Tucci R. 2006. First report of *Botryosphaeria dothidea* on sycamore, red oak and English oak in northwestern Italy. *Plant Disease* 90(8): 1106.
- Úrbez-Torres J.R., Adams P., Kamas J., Gubler W.D. 2009. Identification, Incidence, and Pathogenicity of Fungal Species Associated with Grapevine Dieback in Texas. *American Journal Enology and Viticulture* 60: 497-507.
- Úrbez-Torres J.R., Peduto F., Rooney-Latham S., Gubler W.D. 2010. First Report of *Diplodia corticola* Causing Grapevine (*Vitis vinifera*) Cankers and Trunk Cankers and Dieback of Canyon Live Oak (*Quercus chrysolepis*) in California. *Plant Disease* 94: 785.
- Urbez-Torres J.R., Gubler W.D. 2011. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathology* 60: 261-270.
- van Niekerk J.M., Crous P.W., Groenewald J.Z.E., Fourie P.H., Halleen F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96: 781-798.
- von Arx J.A., Müller E. 1954. Die Gattungen der amersporen Pyrenomyceten. *Beitraege zur Kryptogamenflora der Schweiz* 11: 1-434.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications* (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, ed.). Academic Press, San Diego, CA, USA: 315-322.
- Wills, W.H.; Lambe, R.C., 1985: Potential for fungicidal control of dieback caused by *Botryosphaeria dothidea* on *Rhododendron*. *Phytopathology* 75, 630
- Wittenberg R. 2005. An Inventory of Alien Species and their Threat to Biodiversity and Economy in Switzerland, CABI Bioscience.
- Xenopoulos S., Tsopelas P. 2000. *Sphaeropsis* canker, a new disease of cypress in Greece. *Forest Pathology* 30: 121-126.
- Zhou S., Stanosz G.R. 2001a. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8S rDNA sequences. *Mycologia* 93: 516-527.
- Zhou S., Stanosz G.R. 2001b. Primers for amplification of mt SSU rDNA, and a phylogenetic study of *Botryosphaeria* and associated anamorphic fungi. *Mycological Research* 105: 1033-1044.

- Zhou S., Smith D.R., Stanosz G.R. 2001. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycological Research* 105: 919-926.
- Zwolinski J.B., Swart W.J., Wingfield M.J. 1990. Economic impact of a post-hail outbreak of dieback induced by *Sphaeropsis sapinea*. *European Journal of Forest Pathology* 20: 405-411.

7. RIASSUNTO

Nel corso degli ultimi decenni si è verificata la progressiva diffusione nelle formazioni boschive dell'Europa di una sindrome denominata "deperimento del bosco". Si tratta di una malattia ad eziologia complessa dovuta all'intervento spesso sinergico di molteplici fattori avversi, tra i quali svolgono un ruolo determinante vari patogeni invasivi che con i loro attacchi causano il progressivo declino vegetativo delle piante verso un esito letale. Da recenti ricerche condotte sull'eziologia di questa sindrome nell'area mediterranea è emerso che patogeni appartenenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae* assumono un ruolo preminente sia per l'incidenza elevata con cui ricorrono, sia per le loro spiccate attitudini parassitarie.

In Sardegna, fenomeni di "deperimento" si sono manifestati finora in tutta la loro gravità principalmente nelle sugherete. Solo di recente sono stati riscontrati dannosi anche in vari ecosistemi a leccio, corbezzolo e ginepro del territorio regionale, in particolare in un'ampia area boschiva situata nell'Isola di Caprera nel Parco Nazionale dell'Arcipelago di La Maddalena. Poiché la loro ampia diffusione e gravità sta compromettendo irreversibilmente la biodiversità della componente vegetazionale del sito, è parso rilevante sotto il profilo sia scientifico che applicativo svolgere ricerche con l'obiettivo di:

- i) chiarire il quadro sintomatologico e valutare il grado di diffusione della malattia nei popolamenti di leccio, corbezzolo e ginepro feniceo;
- ii) caratterizzare sotto il profilo morfologico, bio-molecolare e patogenetico le specie di *Botryosphaericeae* coinvolte nella eziologia della malattia.

Attraverso un monitoraggio fitosanitario delle formazioni boschive dell'isola sono state individuate le zone interessate da deperimenti e morie di piante delle specie citate ed è stata allestita una rete di aree di saggio. In particolare:

- nei popolamenti di leccio sono state allestite *at random* 20 aree di saggio di forma circolare (\varnothing 10 m). In ciascuna di queste è stato rilevato il numero di piante presenti e valutato il loro stato sanitario. Inoltre, da 2-8 piante deperienti/area sono stati prelevati campioni sintomatici di legno e corteccia per isolare eventuali agenti patogeni;

- nei popolamenti di ginepro feniceo sono state allestite 3 aree di saggio di circa 1 ettaro ciascuna. In ognuna di queste sono state individuate *at random* 12 piante sintomatiche, poi monitorate stagionalmente per seguire l'evoluzione della sindrome, dalle quali sono stati prelevati i campioni da analizzare;

- nei popolamenti di corbezzolo è stata allestita una sola area di saggio circolare (\varnothing 10 m) dove sono state esaminate e campionate tutte le piante presenti.

Tutti i campioni sono stati analizzati in laboratorio per l'isolamento dei patogeni fungini coinvolti. Le colonie isolate sono state caratterizzate sotto l'aspetto morfologico e fisiologico, identificate su base genetica e saggiate per verificarne la patogenicità.

In totale sono state monitorate 369 piante di leccio. Di queste, solo 18 erano asintomatiche, 295 mostravano sintomi di deperimento (cancri ed essudati sul colletto e sul fusto, rami epicormici disseccamenti della chioma) e ben 56 erano morte. Dagli isolamenti effettuati sono state ottenute esclusivamente colonie di *Botryosphaeriaceae* appartenenti alle specie *Diplodia corticola*, *D. seriata*, *Fusicoccum aesculi* e *Neofusicoccum parvum*, rivelatesi tutte patogene. In particolare, *D. corticola* è stata la specie isolata più di frequente e quella dimostratasi più virulenta nei saggi di patogenicità.

Le piante di ginepro feniceo colpite, sia giovani che adulte, mostravano disseccamenti progressivi a carico di germogli, rami e branche. Nei casi più gravi, le piante si disseccavano nel corso della stagione vegetativa. Alla base dei rami e delle branche disseccate erano ben visibili cancri e aree necrotiche nella corteccia. Spesso, le lesioni necrotiche interessavano anche il fusto principale. Le foglie sui rami sintomatici viravano inizialmente al giallo e, successivamente, al rosso opaco ed infine al marrone-cenerino. Esse spesso rimanevano attaccate ai rami a lungo anche dopo il loro disseccamento. Dagli organi infetti sono state isolate e successivamente descritte e identificate tre specie fungine: *Diplodia africana*, *Neofusicoccum australe* e *N. luteum*. Nei saggi di patogenicità tutte e tre le specie hanno mostrato di essere aggressive su questo ospite. Nessuna di loro era stata mai segnalata su ginepro feniceo.

Per *D. africana* e *N. australe* questa è anche la prima segnalazione su piante forestali in ambiente mediterraneo.

Le piante di corbezzolo infette manifestavano sul fusto e sulle branche cancri marcatamente depressi e disseccamenti della chioma. Sezioni trasversali del fusto in corrispondenza dei cancri mostravano un settore necrotico a “V” che interessava i tessuti legnosi. Dai campioni prelevati sono state costantemente isolate colonie fungine appartenenti alla specie *Diplodia scrobiculata*, un patogeno conosciuto dannoso su conifere e recentemente segnalato in Italia su *Pinus radiata*. Pertanto, il suo rinvenimento nell’Isola di Caprera su piante di corbezzolo rappresenta senz’altro una novità, ma è anche motivo di seria preoccupazione in considerazione del rischio legato ad una possibile diffusione delle sue infezioni con effetti deleteri nelle pinete presenti nell’Isola.

In conclusione, le ricerche effettuate per questa tesi hanno consentito di accertare il coinvolgimento di 8 specie fungine patogene, tutte appartenenti alla famiglia delle *Botryosphaeriaceae*, nell’eziologia dei fenomeni di deperimento indagati, di ampliare le conoscenze sulla bio-ecologia di tali specie emergenti e di segnalare 6 nuove associazioni ospite-patogeno. Inoltre, hanno messo in evidenza il grave stato sanitario in cui versano le formazioni forestali dell’isola di Caprera e, di conseguenza, la necessità di prevedere urgenti misure d’intervento per arrestare l’ulteriore diffusione dei fenomeni di degrado e salvaguardare dal rischio di semplificazione la biodiversità di un’ampia area boschiva di rilevante valenza ecologica.



Università degli Studi di Sassari



**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
Scienze dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari**

Indirizzo Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente
Mediterraneo

Ciclo XXIII

ABSTRACT

Species of *Botryosphaeriaceae* are well known as endophytes and pathogens of woody plants world-wide. Beginning in 2008, a field survey was conducted to study species of *Botryosphaeriaceae* that occur on declining trees and shrubs of Mediterranean maquis on Caprera Island (Sardinia, Italy). Fungal isolates from symptomatic plants were identified on the basis of morphological features, as well as DNA-based techniques. Eight species were constantly isolated from diseased plants: *Diplodia corticola*, *Diplodia seriata*, *Fusicoccum aesculi* and *Neofusicoccum parvum* (from holm oak), *Diplodia africana*, *Neofusicoccum australe* and *Neofusicoccum luteum* (phoenicean juniper), *Diplodia scrobiculata* (strawberry tree). Pathogenicity of all fungal species was verified by stem inoculation on seedlings of the same hosts from which they were isolated, under controlled laboratory conditions. All fungal species, were shown to be pathogens. The results obtained emphasize that several species of *Botryosphaeriaceae* may represent a serious threat for Mediterranean trees and shrubs. In particular suggest that *D. corticola* is an important contributing factor in the onset of long-term oak decline. Moreover, our findings have contributed to improving the knowledge of *D. africana* and *D. scrobiculata* by expanding their host range that includes now phoenicean juniper and strawberry tree, respectively.

Key words: Emerging tree diseases, *Botryosphaeriaceae*, host jumps, quarantine, Caprera Island.