



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 XXII

Studio sulle specie di *Phytophthora* presenti in ambienti
forestali della Sardegna

Dott. Bruno Scanu

Direttore della Scuola:
Referente di Indirizzo
Docente Guida

prof. Giuseppe Pulina
prof. Antonio Franceschini
prof. Antonio Franceschini

Anno accademico 2009- 2010

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1 MALATTIE ENDEMICHE ED EPIDEMICHE DELLE PIANTE FORESTALI	” 1
1.2 I PATOGENI ESOTICI E INVASIVI	” 4
1.2.1 I SISTEMI DI PREVENZIONE	” 7
2. STATO DELL'ARTE	” 9
2.1 IL GENERE <i>PHYTOPHTHORA</i>	” 9
2.1.1 CICLO BIOLOGICO	” 10
2.2 SPECIE INVASIVE DI <i>PHYTOPHTHORA</i>	” 14
2.3 SPECIE DI <i>PHYTOPHTHORA</i> IN ITALIA: NATURA E DIFFUSIONE	” 18
3. SCOPO DELLA TESI	” 20
4. MATERIALI E METODI	” 22
4.1 SITI D'INDAGINE	” 22
4.2 VALUTAZIONE DELLO STATO SANITARIO DI POPOLAMENTI DI CASTAGNO E DILECCIO	” 25
4.3 CAMPIONAMENTI	” 26
4.4 SUBSTRATI DI CRESCITA	” 28
4.5 METODI D'ISOLAMENTO DELLE SPECIE DI <i>PHYTOPHTHORA</i>	” 29
4.6 IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI DI <i>PHYTOPHTHORA</i>	” 31
4.6.1 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA	” 31
4.6.2 ACCRESCIMENTO MICELIARE IN FUNZIONE DELLA TEMPERATURA	” 32
4.6.3 COMPORTAMENTO SESSUALE	” 32
4.6.4 CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE	” 33
4.7 SAGGI DI PATOGENICITÀ	” 35
4.8 PRODUZIONE <i>IN VITRO</i> DI METABOLITI SECONDARI FITOTOSSICI	” 38
4.9 CONSERVAZIONE DELLE SPECIE DI <i>PHYTOPHTHORA</i>	” 40
4.10 ELABORAZIONE DEI DATI	” 40
5. RISULTATI	” 41
5.1 INDAGINE NEI CASTAGNETI	” 41
5.1.1 STATO SANITARIO DEI POPOLAMENTI	” 41
5.1.2 ISOLAMENTO, IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE SPECIE DI <i>PHYTOPHTHORA</i>	” 43

5.1.3 ATTIVITÀ PATOGENETICA	" 49
5.1.4 ATTIVITÀ FITOTOSSICA	" 52
5.2 INDAGINE NEI QUERCETI	" 55
5.2.1 STATO SANITARIO DEI POPOLAMENTI	" 55
5.2.2 ISOLAMENTO, IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE SPECIE DI <i>PHYTOPHTHORA</i>	" 57
5.3 SISTEMI RIPARI	" 60
5.3.1 STATO SANITARIO DEI POPOLAMENTI	" 60
5.3.2 ISOLAMENTO, IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE SPECIE DI <i>PHYTOPHTHORA</i>	" 62
5.4 VIVAI FORESTALI	" 67
5.4.1 STATO SANITARIO DEI POPOLAMENTI	" 67
5.4.2 ISOLAMENTO, IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE SPECIE DI <i>PHYTOPHTHORA</i>	" 69
5.4.3 PATOGENICITÀ DELLE SPECIE DI <i>PHYTOPHTHORA</i> ISOLATE	" 75
6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	" 78
7. BIBLIOGRAFIA	" 87
RIASSUNTO	" 96
ABSTRACT	" 99

1. INTRODUZIONE

1.1 Malattie endemiche ed epidemiche delle piante forestali

Lo sviluppo del bosco è assicurato anche da una “salutare” quantità di malattia che consente di eliminare le piante meno vigorose, facilitando nel contempo la successione vegetale (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.

Ovviamente una “rottura” di tale equilibrio dovuta a cause antropiche o naturali può comportare il superamento di quella “soglia di malattia” oltre la quale un fatto morboso non è più funzionale all’evoluzione del bosco, ma ne determina il progressivo degrado assumendo caratteri epidemici.

Già Hartig nel 1891 e prima di lui altri fitopatologi francesi dell’800 (D’Arbois de Jubainville, Rousseau), affermavano che la recrudescenza delle malattie nei popolamenti forestali era in larga misura una conseguenza dei cambiamenti silvocolturali operati dall’uomo per migliorare la produzione legnosa dei boschi. Ciò attraverso la “messa a coltura” di piante forestali in ambienti naturali o seminaturali, con rimboschimenti artificiali a scopo protettivo e produttivo, con l’introduzione da altri paesi o continenti di specie arboree più produttive, ma spesso anche più suscettibili agli attacchi parassitari.

Tra le cause naturali che possono influenzare la stabilità degli ecosistemi, di sicuro sono da annoverare le modificazioni del clima, ma anche situazioni pedologiche deteriorate o un aumento progressivo dell’inquinamento ambientale. Tali condizioni oltre a provocare danneggiamenti specifici alle piante, possono causare nelle stesse forti squilibri fisiologici con allontanamento dal loro livello metabolico ottimale. Questo stato delle piante, comunemente definito con il termine di “stress” (Matta e Pennazio, 1984), identifica una condizione di sofferenza vegetativa che a seconda dell’intensità, frequenza e durata dei fattori avversi coinvolti, può essere “elastica”, cioè reversibile, ovvero “plastica” con insorgenza di veri e propri stati patologici, riduzione di efficienza

funzionale, perdita di produttività, alterazione di sviluppo, disseccamenti e infine morte delle piante.

Scenari di questo tipo si sono sempre manifestati nei soprassuoli forestali mediterranei, ma nel corso degli ultimi decenni hanno assunto più spesso caratteri epidemici, principalmente a seguito dei mutamenti climatici intervenuti, in particolare, dell'aumento progressivo della temperatura media e dell'alterazione del regime delle precipitazioni annuali. Tali condizioni, infatti, da un lato hanno indotto nelle piante stati di stress idrico, limitandone la tolleranza alle avversità, dall'altro hanno influenzato la bio-ecologia di molti parassiti, in particolare di quelli più termofili (per es. molti funghi patogeni agenti di "cancri" e disseccamenti appartenenti alle famiglie delle *Botryosphaeriaceae* e *Xylariaceae*, e altri pericolosi patogeni sia della chioma come *Ceratocystis* e *Chalara* agenti di "avvizzimenti", sia tellurici come le *Phytophthorae* agenti di "marciumi radicali e del colletto") che si sono avvantaggiati dell'aumento termico per espandere il loro areale di distribuzione o ampliare la gamma di specie ospiti, per riprodursi più velocemente incrementando le sorgenti di inoculo, per esprimere al meglio del loro potenziale genetico tutta la loro aggressività e virulenza (Franceschini *et al.* 1999, 2004; Moricca e Panconesi, 2000; Desprez-Loustau *et al.*, 2006; Gonthier *et al.*, 2006; Jurc e Ogris, 2006; Linaldeddu *et al.*, 2007, 2009, 2010b; Slippers e Wingfield, 2007; La Porta *et al.*, 2008; Vannini *et al.*, 2009).

Le malattie che si sviluppano di conseguenza e la cui incidenza negli ecosistemi forestali è aumentata negli ultimi 10-15 anni vengono comunemente definite "malattie emergenti" (Damsteegt, 1999). Tale termine comprende le "malattie nuove", le "malattie endemo-epidemiche" e le "malattie potenzialmente pericolose". Le "malattie nuove" sono quelle segnalate per la prima volta su un nuovo ospite e/o in una nuova area geografica; le "endemo-epidemiche" sono malattie già note in un'area geografica ma diventate improvvisamente epidemiche; le malattie "potenzialmente pericolose" sono invece quelle che non sono state ancora segnalate in un'area geografica, oppure lo sono state ma con

una distribuzione molto limitata; tra queste rientrano le malattie causate dai cosiddetti patogeni da quarantena.

A queste tipologie di malattie caratterizzate da un rapporto univoco tra patogeno e ospite, si aggiungono negli ecosistemi forestali quelle definite “complesse” o ad eziologia complessa. Sono infatti causate dall’interazione di più fattori avversi (abiotici, biotici e antropici) che agiscono in concomitanza o in successione inducendo nelle piante stati progressivi di sofferenza vegetativa fino a determinarne la morte (Manion, 1991). La peculiarità di queste malattie è dovuta al fatto che nessuno dei fattori coinvolti, se preso singolarmente e applicato a piante sane, è in grado di riprodurre la stessa sindrome osservata in bosco. Inoltre, la loro insorgenza negli ecosistemi forestali non si limita a compromettere la componente vegetazionale, ma comporta l’avvio di forme di degrado via via più gravi con perdita di biodiversità e semplificazione degli stessi. Non a caso queste malattie, di difficile definizione a causa della variabilità per tipo, intensità, frequenza e durata dei fattori avversi che possono essere coinvolti nelle diverse realtà forestali, vengono genericamente indicate col termine di “deperimento del bosco” (Anselmi e Franceschini, 2007). Attualmente esse, per le ampie aree geografiche sulle quali si manifestano, le numerose specie forestali implicate, la loro complessità eziologica e le conseguenti difficoltà che sussistono nel definire e applicare misure efficaci di prevenzione, rappresentano uno dei principali problemi, se non il principale problema sanitario delle formazioni forestali a livello mondiale.

1.2 I patogeni esotici e invasivi

Una delle cause principali di sviluppo di epidemie negli ecosistemi forestali è sicuramente rappresentata dall'introduzione e diffusione di patogeni esotici in aree che ne sono prive (Desprez-Loustau *et al.*, 2007; Cushman e Meentemeyer, 2008).

L'introduzione può avvenire attraverso diversi mezzi, principalmente tramite piante asintomatiche, suolo compreso, o con piante malate non diagnosticate correttamente (Brasier, 2008). I patogeni, una volta introdotti in un nuovo ambiente, possono trovare condizioni ottimali per sopravvivere, svilupparsi, riprodursi e diffondersi in forma epidemica con effetti detrimentalmente, soprattutto se favoriti sia dalla mancanza di resistenze efficaci da parte di ospiti nuovi che non si sono co-evoluti col patogeno, sia dalla presenza di nuovi vettori indigeni o anch'essi esotici. Altrettanto dannose e devastanti possono essere le conseguenze legate alla ricombinazione di specie correlate, autoctone ed esotiche, con la possibile formazione di patogeni nuovi o modificati dotati di maggiore virulenza e/o in grado di ampliare lo spettro d'ospiti (Brasier e Delcan, 2001).

La storia fitopatologica è ricca di esempi di epidemie gravi causate in seguito all'introduzione e successiva diffusione di patogeni esotici sia in campo agrario che in quello forestale.

In ambito agrario, uno degli eventi epidemici più eclatanti fu causato da *Phytophthora infestans*, agente della "peronospora della patata", introdotto in Europa dal continente americano. L'epidemia si verificò intorno alla metà del 1800 e causò la distruzione di estese coltivazioni di patate in tutto il centro Europa, con ripercussioni gravissime sulle popolazioni rurali, in quanto le patate costituivano all'epoca la principale fonte di sostentamento (Fry *et al.*, 1992; Smart e Fry, 2001).

In ambito forestale, e quindi in ambienti naturali o semi-naturali dove la biodiversità è molto più elevata rispetto agli ambienti agrari, l'introduzione accidentale di parassiti che nel loro areale di origine sono del tutto inoffensivi, può avere conseguenze imprevedibili legate alle maggiori opportunità che gli

stessi hanno di incontrare nei nuovi ambienti vari ospiti potenzialmente suscettibili o di trovare condizioni climatiche più favorevoli per svilupparsi o per esprimere tutta la loro virulenza. Un esempio in tal senso è rappresentato dal fungo *Diplodia scrobiculata*, presente come parassita di equilibrio nell'areale d'origine del *Pinus radiata* in California (USA), che si è manifestato come un patogeno altamente virulento sullo stesso ospite e su altri ospiti in Europa e Sud Africa (Burgess *et al.*, 2004; Linaldeddu *et al.*, 2006; Bihon *et al.*, 2010; Linaldeddu *et al.*, 2010a).

In Italia, la gran parte dei patogeni forestali esotici sono stati introdotti dalle Americhe nel corso del XX secolo, in seguito all'intensificazione dei rapporti commerciali e all'uso di mezzi di trasporto più veloci che consentivano agli stessi di mantenersi "vivi" nei materiali vegetali trasferiti da un continente all'altro (Anselmi, 1992). In tal modo arrivarono nel periodo compreso tra le due guerre mondiali, due patogeni altamente virulenti: *Cryphonectria parasitica* agente del "cancro corticale" del castagno e *Ophiostoma ulmi* agente della "grafiosi" dell'olmo. Essi nel giro di pochi anni si diffusero in tutte le regioni italiane causando devastazioni nei popolamenti dei rispettivi ospiti. I danni causati da *C. parasitica* hanno contribuito all'abbandono della castanicoltura in vaste aree del Paese e alla conseguente crisi del settore. I danni da "grafiosi" sono aumentati in epoca più recente in seguito a una seconda ondata epidemica della malattia, questa volta causata da un ceppo più virulento del patogeno (*Ophiostoma novo-ulmi*), anch'esso introdotto attraverso l'importazione di legname e prodotti derivati infetti (Brasier e Kirk, 2001b).

Nei primi anni '50 fece la sua comparsa il *Seiridium cardinale*, agente del "cancro del cipresso", che causò disseccamenti e morie di piante in ambito urbano, nei parchi periurbani e nei cipresseti. Nel 1963 fu segnalato per la prima volta un pericoloso patogeno del pioppo: *Marssonina brunnea*, agente della "bronzatura", che da allora continua a rappresentare un problema serio per la pioppicoltura italiana. Nel 1970 e nel 1976 furono introdotti due dannosi patogeni del platano, rispettivamente: *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* agente del "cancro colorato" e *Microsphaera platani* agente del "mal bianco".

Tra gli altri patogeni esotici rivelatisi deleteri in Italia assumono rilevanza: *Sirococcus strobilinus*, un pericoloso patogeno del pino introdotto nel 1992, ed *Erwinia amylovora* agente del “fuoco batterico” delle pomoidee, riscontrato per la prima volta nel 2001.

Attualmente, tra i diversi patogeni esotici di recente introduzione in Italia e non ancora ampiamente diffusi nei soprassuoli forestali, costituiscono una serie minaccia:

- *Chalara fraxinea*: agente di disseccamenti e morie di alberi di *Fraxinus* spp. Tale patogeno, è stato segnalato per la prima volta in Polonia (Kowalski, 2006) e si è rapidamente diffuso in diversi paesi dell’Europa centrale provocando ingenti danni sia in bosco che in vivaio. La sua presenza in regioni del Nord Italia è stata segnalata nel 2010 da Ogris e coll. (2010).

- *Phytophthora cinnamomi*: uno dei patogeni più temuti a livello mondiale quale agente di marciumi radicali e del colletto di numerose specie forestali. In Australia è stata segnalata su circa 3000 delle 9000 specie vascolari presenti nel Paese ed è considerato come una seria minaccia per la biodiversità degli ecosistemi naturali australiani (Dunstan *et al.*, 2010).

- *Phytophthora ramorum*: patogeno della parte aerea delle piante e causa di estese morie di *Quercus* spp. in America. Nel nostro Paese la sua presenza è stata segnalata finora solo in vivaio.

A questo proposito appare opportuno sottolineare che proprio i vivai rappresentano gli ambienti più a rischio per quanto riguarda l’introduzione di nuove specie patogene. Ciò è dovuto al fatto che in tali ambienti confluiscono varie specie vegetali importate da aree geografiche diverse. Inoltre, le piante vi vengono coltivate in modo intensivo, creando condizioni ideali per lo sviluppo e la diffusione di patogeni anche su specie vegetali che in natura non sono loro ospiti preferenziali (Jung e Blashke, 2006). Peraltro, le infezioni di molti patogeni in vivaio restano asintomatiche per lunghi periodi di tempo, per cui sussiste un elevato rischio di diffusione inconsapevole da parte degli acquirenti di materiale vegetale infettivo in ambienti forestali diversi. È anche vero che la sola presenza di materiale vegetale infetto in vivaio, rappresenta di per se un

problema. Infatti, in mancanza di interventi di eradicazione del patogeno o comunque di contenimento del suo potenziale d'inoculo, le aree utilizzate per lo stoccaggio di materiale vegetale possono rappresentare un'importante sorgente di inoculo di svariati patogeni potenzialmente in grado di diffondersi in altre aree del vivaio e all'esterno (Brasier *et al.*, 2005). Ciò, ovviamente, risulta molto pericoloso se i vivai sono ubicati in vicinanza di aree boschive. Tale rischio, come sottolineato in numerose comunicazioni presentate all'ultimo Convegno Internazionale di Patologia vegetale (ICPP, 2008), è particolarmente grave nel caso dei patogeni terricoli veicolati con i substrati di coltivazione.

Tra questi patogeni assumono rilevanza soprattutto quelli afferenti al genere *Phytophthora*. In un lavoro recentemente pubblicato, Moralejo e coll. (2009) hanno riscontrato in diversi vivai e nei *garden centers* della Spagna, la presenza di 17 specie di *Phytophthora* su 37 nuovi ospiti. Ben cinque di queste specie sono risultate nuove per la scienza.

I risultati di questa indagine rappresentano un classico esempio di diffusione di microrganismi patogeni attraverso il commercio di piante in Europa e allo stesso tempo comprovano il fatto che numerose specie di *Phytophthora*, in virtù della loro polifagia, possono costituire una seria minaccia per gli ecosistemi forestali quando introdotte attraverso attività di forestazione e/o riforestazione. Ciò anche in considerazione del fatto che questi patogeni possono essere facilmente movimentati da un ambiente all'altro attraverso vari vettori tra cui l'uomo, le macchine e gli animali (Shearer e Tippett, 1989; Davidson *et al.*, 2005; Webber e Rose, 2008).

1.2.1 I sistemi di prevenzione

Allo scopo di prevenire l'introduzione e la diffusione di patogeni esotici potenzialmente pericolosi, i paesi dell'Unione Europea hanno istituito l'*International Plant Protection Convention* (IPPC). Tale organizzazione ha il compito di ispezionare tutto il materiale vegetativo da e verso i paesi comunitari e verificare la presenza di patogeni pericolosi sia nei punti di entrata che nei punti di destinazione finale di tale materiale (MacLeod *et al.*, 2010). A livello

nazionale ciascun Paese ha predisposto delle liste di quarantena, gestite dall'EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*), 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 suddivisi in due liste: A1 e A2 (<http://www.eppo.org>). Esistono inoltre altre due liste, la prima l'*Alert list*, include i patogeni che recentemente hanno provocato allarme in altre regioni nel mondo, mentre la seconda, l'*Action list*, ha l'obiettivo di richiamare l'attenzione degli Stati membri, nei confronti degli organismi che sono stati inclusi recentemente nelle liste A1 e A2 o per i quali si ritiene sia necessario applicare immediate misure fitosanitarie.

Il principale compito di queste istituzioni è quello di segnalare la diffusione e la movimentazione dei patogeni invasivi e di allertare i paesi membri quando è necessario attuare un programma di eradicazione.

Le operazioni di eradicazione sono abbastanza semplici quando la diffusione dei microrganismi invasivi è confinata all'interno dei vivai, mentre risulta ben più problematica e difficoltosa quando questa avviene in bosco dove, spesso accade che ci si accorga di un problema fitosanitario solo quando i danni sono ormai rilevanti e il patogeno si è già ampiamente diffuso.

Questo è, per esempio, quello che recentemente è accaduto per le nuove specie di *Phytophthora* rinvenute in Europa, e dimostra nel caso specifico la necessità di aggiornare e approfondire le conoscenze scientifiche sia per quanto riguarda il monitoraggio di questi microrganismi, sia per la messa a punto di nuovi protocolli diagnostici e di controllo (Brasier, 2008).

2. STATO DELL'ARTE

2.1 Il genere *Phytophthora*

La progressiva diffusione di nuovi patogeni, definiti come “emergenti” o “invasivi”, avvenuta nel corso degli ultimi decenni, rappresenta un serio pericolo per l'integrità e la biodiversità di vari ecosistemi forestali (Agrios, 2005; Brasier, 2008). Tra questi assumono particolare rilevanza alcune specie afferenti al genere *Phytophthora* de Bary.

Il genere *Phytophthora* dal greco *phyto* (pianta) e *phthora* (distruttore), annovera al suo interno alcuni dei patogeni più distruttivi, in grado di causare epidemie gravi e danni ingenti di natura sia economica che ambientale.

Sebbene ancora oggi questi microrganismi vengano spesso inseriti tra gli organismi fungini in virtù del loro accrescimento filamentoso, studi di carattere genetico e biochimico hanno dimostrato la loro sostanziale diversità dai miceti, tanto che di recente sono stati classificati nel nuovo Regno dei Straminipila, insieme alle alghe brune e alle diatomee (Erwin e Ribeiro, 1996; Judelson e Blanco, 2005).

Gli anglosassoni sono soliti indicare le *Phytophthorae* col termine “*water moulds*”, per sottolineare due dei caratteri distintivi di questi microrganismi e cioè la predilezione a vivere in ambienti umidi, e la differenziazione di strutture riproduttive molto simili a quelle delle alghe (Kamoun, 2003).

Le *Phytophthorae* appartengono alla classe degli Oomiceti, organismi che presentano numerosi caratteri morfologici e biochimici differenti dai funghi veri e propri. In particolare, hanno ife diploidi con pareti cellulari costituite da cellulosa, anziché ife aploidi o dicarion con pareti cellulari chitinose tipiche dei funghi, e accumulano micolaminarano come carboidrato di riserva al posto del glicogeno accumulato nei funghi (Tab. 1).

Ognuna di queste strutture assolve a differenti funzioni biologiche:

- le *hyphal swelling*, si formano nel micelio in modo sia intercalare che terminale e possono avere forme variabili a seconda della specie. La funzione di queste strutture non è ancora ben conosciuta, presumibilmente costituiscono degli organi di conservazione;
- le clamidospore, sono le tipiche strutture di resistenza di forma globosa con pareti cellulari piuttosto spesse. Esse garantiscono la sopravvivenza della specie nel terreno, anche per lunghi periodi di tempo. Si formano nel micelio in modo sia terminale che intercalare (Fig. 2 a) assumendo forme e dimensioni molto simili fra le varie specie. In alcuni casi la forma e la dimensione delle clamidospore può rappresentare un carattere diagnostico informativo;
- gli sporangi, sono le strutture di moltiplicazione agamica più caratteristiche delle *Phytophthorae*. Essi rivestono un ruolo chiave nell'epidemiologia delle malattie causate da questi microrganismi. La morfologia degli sporangi varia considerevolmente tra le diverse specie e rappresenta un elemento tassonomico molto importante per l'identificazione a livello di specie (Waterhouse, 1963; Erwin e Ribeiro, 1996). A tal fine vengono considerati la lunghezza, la larghezza, il rapporto lunghezza/larghezza, la presenza e la forma della papilla e del pedicello degli sporangi (Fig. 2 b). Nelle specie più ancestrali infeudate ad ambienti acquatici o particolarmente umidi, gli sporangi rimangono aderenti alle ife da cui si differenziano (rami sporangiofori), mentre nelle specie più evolute gli sporangi sono decidui e una volta distaccati possono essere dispersi tramite l'acqua e/o il vento, permettendo una più efficiente disseminazione dell'inoculo rispetto alle specie con sporangi persistenti. La germinazione degli sporangi può avvenire tramite la produzione di zoospore e/o anche direttamente attraverso un tubulo germinativo. Questi due meccanismi possono variare tra le varie specie e nell'ambito della stessa specie anche in base alle condizioni ambientali;
- le zoospore, sono delle strutture biflagellate senza parete esterna. Dopo un periodo di motilità nell'acqua e dopo aver preso contatto con un ospite suscettibile si incistano, perdendo i flagelli e differenziando la parete. Se le

condizioni ambientali sono favorevoli emettono un tubulo germinativo oppure occasionalmente rilasciano nuove zoospore, fenomeno quest'ultimo che prende il nome di diplanetismo. Le zoospore costituiscono il principale propagulo infettivo del genere *Phytophthora* ed esibiscono un comportamento chemiotattico che gli permette di trovare il sito ottimale per l'infezione nella pianta ospite (es. ferite o apici radicali);

- le oospore, sono le spore sessuali che derivano dalla fusione tra i nuclei aploidi delle due strutture sessuali specializzate (gametangi), denominate rispettivamente oogonio e anteridi. L'anteridio può fecondare l'oogonio con due differenti meccanismi: nel primo denominato anfigino, l'anteridio penetra all'interno dell'oogonio avvolgendone il gambo alla base (Fig. 2 c); nel secondo chiamato paragino, l'anteridio aderisce lateralmente al gambo dell'oogonio. Dopo la fecondazione si ha lo sviluppo di una singola oospora di forma circolare all'interno dell'oogonio. Le oospore sono caratterizzate dall'aver una parete particolarmente spessa che consente a queste strutture di superare condizioni ambientali sfavorevoli fungendo da spore di resistenza. Inoltre, esse rivestono una notevole importanza per la corretta identificazione e descrizione delle specie del genere *Phytophthora*, in quanto in alcuni casi possono presentare caratteristiche ornamentazioni della parete.

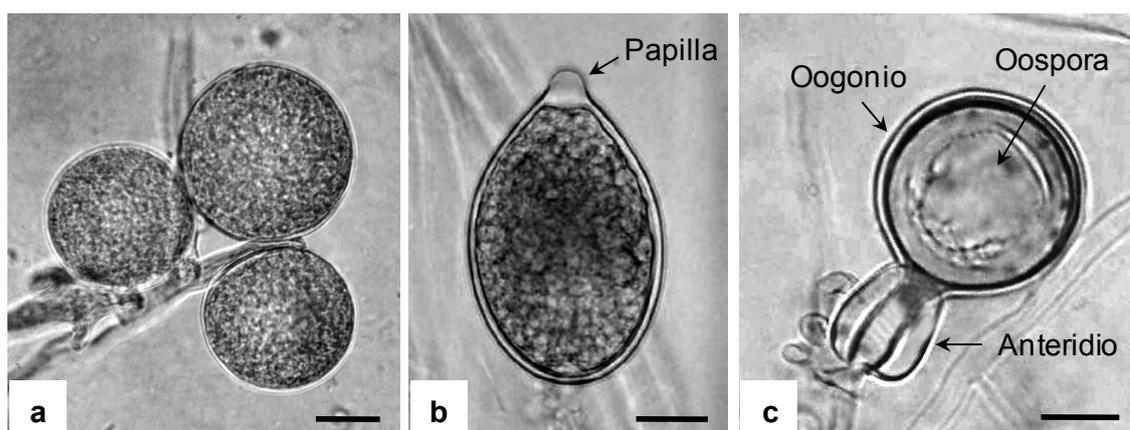


Figura 2. Propaguli di *Phytophthora* spp.: clamidospore (a), sporangio papillato (b), oogonio, oospora e anteridio anfigino (c). Barra = 20 μ m.

Alcune specie di *Phytophthora* sono omotalliche, *self-fertili*, ossia differenziano oogoni e anteridi in singola coltura e sono in grado di auto fecondarsi. In altre specie chiamate eterotalliche, non *self-fertili*, la fecondazione avviene in seguito all'incontro di due miceli di differente tipo sessuale "*mating type*" comunemente definiti di tipo A1 e A2.

Il processo di gametangiogamia nelle specie eterotalliche è tipicamente anfigino, in quanto il ramo oogoniale che si differenzia in prossimità di quello anteridiale, penetra entro quest'ultimo attraverso l'anteridio in modo che la struttura oogoniale risulti adagiata sull'anteridio stesso che a sua volta circonda come un anello il peduncolo su cui l'oogonio è inserito.

Le specie omotalliche possono avere gametangi con anteridi sia anfigini che paragini. In entrambi i meccanismi di gametangiogamia, i nuclei diploidi migrano dalle ife verso i gametangi dove avviene il processo meiotico che porta alla formazione di nuclei aploidi.

Successivamente, un nucleo aploide dell'anteridio si riversa nell'oogonio attraverso un tubulo fecondativo (Brasier e Sansome, 1975). Un eccesso di nuclei aploidi sia nell'oogonio che nell'anteridio spesso porta ad un aborto spontaneo delle oospore.

Il processo di riproduzione sessuale è di fondamentale importanza per lo scambio di materiale genetico all'interno delle popolazioni. Alcune specie di *Phytophthora* (per es.: *P. gonapodyides*) non sono in grado di riprodursi sessualmente, sono tuttavia in grado di stimolare la produzione di gametangi in altre specie allorché vengano a contatto (Pittis e Colhoun, 1984; Brasier *et al.*, 1993a).

2.2 Specie invasive di *Phytophthora*

Al genere *Phytophthora* afferiscono un centinaio di specie, di cui circa la metà sono state descritte nel corso degli ultimi 20 anni: nel 1931 si conoscevano solo 20 specie (Tucker, 1931), nel 1990 il numero di specie note era di circa 60 (Erwin e Ribeiro, 1996), al 2007 figurano ufficialmente descritte 105 specie (IUFRO, 2007). Questo rapido incremento è da attribuire, in parte alla scoperta di nuove specie criptiche all'interno di specie note, e in parte alla scoperta di specie nuove soprattutto negli ecosistemi naturali. Stante la crescita esponenziale del numero di nuove specie descritte (Fig. 3), è presumibile che nei prossimi anni verranno scoperte e descritte da 100 a 500 nuove specie di *Phytophthora* (Brasier, 2008).

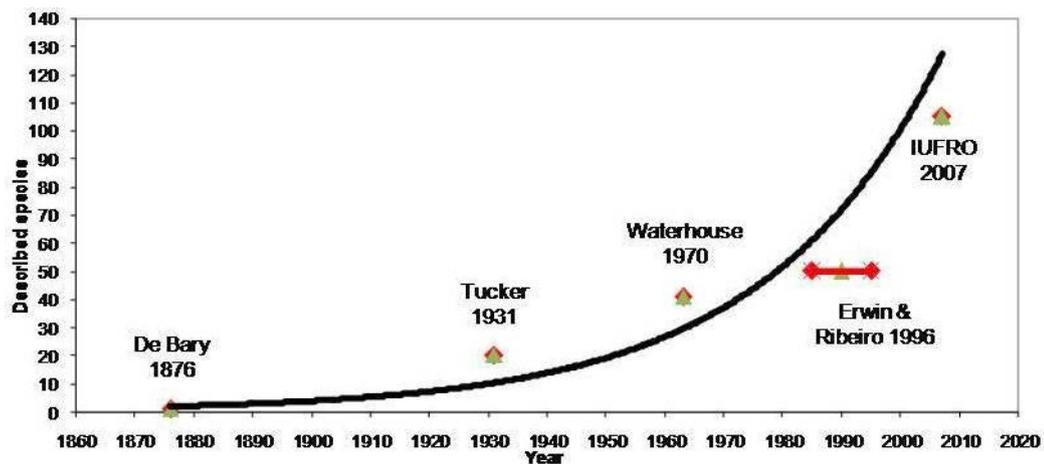


Figura 3. Andamento esponenziale del numero di specie di *Phytophthora* descritte (da IUFRO 2007).

L'incremento del commercio internazionale delle piante, in seguito alla globalizzazione dei mercati, ha permesso l'introduzione in nuovi ambienti sia di numerose specie di *Phytophthora*, sia dei loro rispettivi ospiti. L'introduzione di piante esotiche con i relativi patogeni in ambienti diversi da quelli di origine, da un lato agevola l'incontro tra nuovi ospiti potenzialmente suscettibili per le

specie di *Phytophthora* endemiche e dall'altro lato favorisce un più ampio range di ospiti vegetali infettabili per i patogeni esotici introdotti.

Oltre al caso di *Phytophthora infestans* già citato in premessa, numerose altre specie appartenenti a questo genere hanno originato danni gravi. Un esempio classico è rappresentato da *Phytophthora cinnamomi*, considerata come già detto una seria minaccia in ecosistemi di diverse aree del mondo. Sin dalla sua presunta introduzione in Oceania, agli inizi del 1900, tale specie si è ampiamente diffusa nelle foreste di *Eucalyptus marginata* in Australia e Nuova Zelanda, causando la morte non solo degli eucalitteti ma anche di numerose specie vegetali presenti nel sottobosco di queste foreste, con gravi ripercussioni sulla biodiversità dell'intero ecosistema. In tali Paesi sono attualmente in atto misure preventive di quarantena volte a impedire e/o limitare la diffusione di questo patogeno nelle aree non ancora infette (Shearer e Tippet, 1989; Dunstan *et al.*, 2010).

P. cinnamomi è stata introdotta anche in Nord America dove ha causato danni gravi su castagno (*Castanea dentata*), rallentando tra l'altro il processo di rigenerazione delle piante già attaccate dal "cancro della corteccia". Ciò in quanto alcuni ibridi di castagno, appositamente selezionati per la resistenza a *Cryphonectria parasitica*, sono risultati suscettibili alle infezioni di *P. cinnamomi* (Crandall *et al.*, 1945; Rhoades *et al.*, 2003).

In Europa *P. cinnamomi* è stata associata alle gravi morie di *Quercus ilex* e *Q. suber* verificatesi in Spagna e Portogallo sin dagli inizi degli anni '90 (Brasier, 1992; Brasier, 1996; Sánchez *et al.*, 2002). Sebbene entrambi i *mating types* di questa specie siano presenti all'interno delle popolazioni Europee, Nord Americane e Australiane in queste regioni è predominante il tipo A2.

Un altro esempio eclatante è quello di *Phytophthora ramorum*. Questo patogeno è stato segnalato per la prima volta in California dove è considerato l'agente causale del "Sudden Oak Death", malattia che ha assunto ormai proporzioni epidemiche e causato la morte di migliaia di querce e gravi danni anche su altri ospiti (Rizzo *et al.*, 2002). In Europa questa specie è stata rinvenuta principalmente in vivaio e meno frequentemente in ambienti forestali,

senza causare danni rilevanti come quelli verificatisi in California (Brasier e Jung, 2006). Tuttavia, a partire dalla fine del 2009 questo pericoloso patogeno sta mettendo in serio pericolo numerosi impianti di *Larix kaempferi* in Gran Bretagna (Brasier e Webber, 2010).

L'origine di questo patogeno sembrerebbe essere localizzata in alcune regioni dell'Asia Centrale e della Cina (Goheen *et al.*, 2007). Gli isolati Americani ed Europei di *P. ramorum* sono di differente *mating type* e mostrano differenze sia a livello fenotipico che molecolare, evidenziando come le invasioni nei due continenti non siano tra loro collegate (Werres *et al.*, 2001; Brasier *et al.*, 2006; Bonants *et al.*, 2007).

P. ramorum è un organismo da quarantena e le attività volte alla sua eradicazione sono previste sia in ambienti forestali che in vivaio.

In nord America si sta recentemente diffondendo nelle foreste native di *Chamaecyparis lawsoniana* della costa Est dell'Oregon e della California, un'altra specie invasiva, *Phytophthora lateralis*. Questa specie è filogeneticamente vicina a *P. ramorum* e a *Phytophthora foliorum*, una nuova specie anch'essa recentemente rinvenuta negli Stati Uniti (Donahoo *et al.*, 2006).

In Europa per contro, un'ulteriore specie invasiva, *Phytophthora kernoviae*, isolata per la prima volta nella regione del Cornwall in Gran Bretagna, si sta rapidamente diffondendo in vari ecosistemi. L'origine di questa specie è sconosciuta, tuttavia subito dopo la sua descrizione (Brasier *et al.*, 2005), ulteriori nuove segnalazioni sono state riportate in Nuova Zelanda.

Infine, un'altra specie invasiva, recentemente descritta come *Phytophthora pinifolia*, sta devastando estesi rimboschimenti di *Pinus radiata* in Cile (Durán *et al.*, 2008).

Uno degli aspetti più preoccupanti è che alcune di queste specie hanno eluso i controlli fitosanitari attuati nei vari Paesi in quanto sconosciute alla scienza. Ciò di fatto dimostra la necessità di rivedere e perfezionare gli attuali sistemi di prevenzione e controllo dei materiali vegetali in fase di importazione ed esportazione.

Un altro problema fitosanitario inerente la movimentazione delle *Phytophthorae* è legato alla potenziale capacità di questi microrganismi di ibridarsi in modo interspecifico grazie al fatto che le zoospore mancanti di pareti cellulari sono prive di barriere precostituite (Brasier, 2000). Pertanto, l'incontro di specie endemiche con specie esotiche può facilmente dar luogo a nuovi e pericolosi ibridi di *Phytophthora* che costituiscono una seria minaccia dagli esiti imprevedibili per gli ecosistemi sia agrari che forestali.

Un esempio di ibrido tra specie di *Phytophthora* è rappresentato da *P. alni*, rinvenuta per la prima volta nel Sud dell'Inghilterra. Questa specie mostra una forte somiglianza con *Phytophthora cambivora*, dalla quale si differenzia essenzialmente in quanto è omotallica (Brasier *et al.*, 1995). Studi più approfonditi a livello sia morfologico che molecolare, lasciano intendere che *P. alni* possa essere il risultato di una ibridazione tra *P. cambivora* e probabilmente *Phytophthora fragariae*.

P. alni include un gruppo di sottospecie particolarmente aggressive su *Alnus* spp., a differenza delle due specie parentali che non sono patogene su questa pianta forestale. Ciò evidenzia come in seguito all'ibridazione possa generarsi una nuova specie in grado di attaccare nuovi ospiti (Brasier, 2000).

2.3 Specie di *Phytophthora* in Italia: natura e diffusione

Il numero di specie *Phytophthora* rinvenute in Italia è aumentato progressivamente negli ultimi decenni. Le nuove segnalazioni hanno riguardato per lo più il settore vivaistico (Pane *et al.*, 2006). Nei vivai, infatti, a seguito della globalizzazione dei mercati e della necessità di diversificare le produzioni, sono state importate molte specie vegetali esotiche provenienti da Paesi tropicali o subtropicali. Ovviamente, ciò può aver comportato anche l'introduzione accidentale di specie esotiche di *Phytophthora*, sia con le piante e i substrati di coltivazione, ma anche attraverso il materiale di propagazione (semi, talee). Inoltre, il tipo di tecniche colturali adottate in vivaio e il continuo susseguirsi di specie e varietà di piante differenti in ambiti così ristretti, hanno senz'altro favorito all'interno dei vivai l'incontro tra numerosi patogeni e nuovi ospiti potenziali.

In passato, i danni causati dalle infezioni di *Phytophthora* spp. in vivaio sono stati spesso sottovalutati, sia per le scarse conoscenze al riguardo, sia per le difficoltà oggettive incontrate nell'effettuare diagnosi corrette. Inoltre, è frequente il caso in cui le infezioni radicali da *Phytophthora* spp. risultino associate a quelle provocate da altri funghi terricoli che ne mascherano la presenza. Le specie di *Phytophthora* rispetto ad altri microrganismi del terreno hanno una scarsa capacità competitiva e spesso su alcuni substrati di coltura artificiali si sviluppano molto più lentamente dei funghi.

Tra le specie esotiche di *Phytophthora* di recente introduzione nei vivai italiani, assume rilevanza *P. taxon niederhauserii* (Cacciola *et al.*, 2009a, b). Questa specie, non ancora formalmente descritta, è ormai diffusa in tutti e cinque i continenti dove è in grado di attaccare sia piante di interesse agrario che forestale (Pérez Sierra *et al.*, 2010).

In ambito forestale, invece, i danni causati da specie di *Phytophthora* non hanno mai destato serie preoccupazioni; o meglio, finora non è stata mai posta la giusta attenzione sulle affezioni causate da questi patogeni. Solo di recente è emersa anche in ambito forestale tutta la loro pericolosità e capacità distruttiva.

Le principali infezioni di *Phytophthora* spp. in Italia sono state segnalate nei castagneti e in boschi di querce. Nei primi, causano la ben nota sindrome del “mal dell'inchiostro”, una malattia che negli ultimi anni ha avuto una forte recrudescenza e attualmente sta creando problemi soprattutto nelle aree castanicole dell'Italia centro meridionale (Anselmi *et al.*, 1999; Vettraiño *et al.*, 2001).

Fino a qualche anno fa erano ritenute responsabili di questa malattia due specie di *Phytophthora*: *P. cambivora* e *P. cinnamomi*; recenti studi, invece, hanno messo in evidenza come nell'eziologia della malattia possano essere coinvolte anche altre specie dello stesso genere, in particolare *P. citricola* e *P. cactorum* (Vettraiño *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda i boschi di querce, in tutte le regioni italiane nel corso degli ultimi decenni si è verificata una costante espansione di quei gravi fenomeni, di cui si è accennato in premessa, noti col termine di “deperimento delle querce” (*oak decline*). In tali malattie ad eziologia complessa risultano coinvolti numerosi patogeni fungini ma anche varie specie afferenti al genere *Phytophthora* (Jung *et al.*, 1996). Recenti indagini condotte in varie regioni italiane hanno evidenziato come ben 11 specie di *Phytophthora*: *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. gonapodyides*, *P. megasperma*, *P. quercina* e *P. syringae*, e due specie non ancora identificate, siano diffuse nei querceti deperenti d'Italia. Alcune specie sono risultate più frequenti nel Nord del Paese, mentre altre nel Centro-Sud. Tra tutte, *P. quercina* è risultata quella più direttamente coinvolta nell'eziologia della malattia. Tuttavia, la sua diffusione sembrerebbe limitata per ora al Centro-Nord d'Italia e, soprattutto, nelle aree con suoli acidi o subacidi (Vettraiño *et al.*, 2002). A tale proposito, bisogna sottolineare che tra le Regioni monitorate in quell'indagine figurava anche la Sardegna, e che nelle aree indagate dell'Isola non è stata mai riscontrata la presenza di specie di *Phytophthora*.

3. SCOPO DELLA RICERCA

Le indagini svolte nel corso degli ultimi 30 anni dal Dipartimento di Protezione delle Piante dell'Università di Sassari, hanno messo in evidenza il progressivo peggioramento dello stato fitosanitario dei popolamenti forestali in Sardegna. In particolare, sono via via aumentati i casi di “deperimento” nei querceti e le morie di piante in castagneti e in ecosistemi ripari.

Per quanto riguarda gli eventi di “deperimento”, le indagini effettuate in varie formazioni a *Quercus* spp. dell'Isola hanno consentito di chiarire molti aspetti legati alla complessa eziologia di questi fenomeni, e di caratterizzare sotto il profilo fisiologico e patogenetico alcuni dei principali patogeni fungini che vi sono implicati (Franceschini *et al.*, 1999; Evidente *et al.*, 2003; Evidente *et al.*, 2005; Linaldeddu *et al.*, 2009; Linaldeddu *et al.*, 2010b; Maddau *et al.*, 2010). Tuttavia, nessuna ricerca specifica è stata mai effettuata per verificare il possibile coinvolgimento nella patogenesi di questa malattia di specie appartenenti al genere *Phytophthora*. Esse, in varie regioni forestali dell'Europa centro meridionale sono considerate tra i fattori che maggiormente contribuiscono a favorire l'insorgenza del “deperimento” del bosco e la conseguente evoluzione del degrado vegetativo delle piante verso un esito letale (Brasier, 1992; Jung *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2000; Vettraino *et al.*, 2002).

Allo stesso modo, nei castagneti sardi non è stata mai effettuata alcuna indagine specifica per approfondire le conoscenze sulla natura e distribuzione delle specie di *Phytophthora* associate al “mal dell'inchiostro”, principale causa delle morie di piante riscontrate nei popolamenti. Recentemente in Europa sono state isolate diverse specie di *Phytophthora* sia dal suolo sia, in alcuni casi, dai tessuti sintomatici di piante di castagno colpite da “mal dell'inchiostro”. Oltre a *P. cinnamomi* e *P. cambivora*, comunemente considerate come gli agenti causali di questa malattia, sono state rinvenute: *P. cactorum*, *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. megasperma* e *P. syringae* (Vettraino *et al.*, 2005; Perlerou *et al.*, 2010). Il ruolo patogenetico di queste specie non è ancora ben chiaro, anche perché l'espressione della loro virulenza, così come la capacità di

sopravvivenza, può variare notevolmente nelle diverse condizioni edafiche e climatiche delle stazioni in cui vegeta il castagno. In ogni caso, è indubbio che il loro rinvenimento assume importanza alla luce dell'acclarata recrudescenza del "mal dell'inchiostro" nelle aree castanicole. Questa malattia in Sardegna – dove peraltro spesso si manifesta insieme all'altra grave affezione delle piante di castagno: il "cancro della corteccia" causato da *Cryphonectria parasitica* – costituisce motivo di seria preoccupazione per i castanicoltori e richiede un maggiore impegno della ricerca per definirne i caratteri eziologici, epidemiologici e le strategie di prevenzione.

Infine, altrettanto preoccupante nei sistemi ripari del Centro e del Nord della Sardegna è l'aumento dei casi di progressivo disseccamento fino alla morte di piante di ontano nero (*Alnus glutinosa*) e di agrifoglio (*Ilex aquifolium*). Le cause di questi eventi sono ancora ignote; tuttavia, la sintomatologia manifestata dalle piante colpite ricorda da vicino quella indotta da varie specie di *Phytophthora* patogene, soprattutto da *P. alni*, su *Alnus* spp. in varie regioni dell'Europa centrale (Brasier *et al.*, 2004; Jung e Blaschke, 2004; Černý e Strnadova, 2010).

Pertanto, alla luce di quanto finora esposto sui problemi sanitari dei boschi, con particolare riferimento alle emergenze appena richiamate e al fatto che nelle formazioni forestali della Sardegna non sono state mai effettuate indagini specifiche per verificare la presenza, diffusione e patogenicità di specie di *Phytophthora*, è parso opportuno, nell'ambito di questa tesi di Dottorato, svolgere ricerche con l'intento di:

- monitorare querceti, castagneti, sistemi ripari e vivai forestali della Sardegna per individuare in tali ambienti zone con probabili focolai infettivi di *Phytophthora* spp.;
- valutare il grado di malattia nei popolamenti di castagno e di leccio con riferimento, rispettivamente al "mal dell'inchiostro" e al "deperimento";
- isolare, identificare e caratterizzare sotto il profilo morfologico, molecolare e patogenetico le specie di *Phytophthora* presenti nelle zone infette.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Siti d'indagine

Durante il primo anno del Corso di Dottorato è stata svolta una capillare attività di monitoraggio fitosanitario sia nelle principali aree boschive della Sardegna, sia in vivai forestali gestiti dall'Ente Foreste della Regione. Ciò ha consentito di individuare varie realtà in castagneti, querceti, sistemi ripari e vivai con piante che manifestavano sintomi (marciumi radicali, necrosi corticali, rarefazione e ingiallimento della chioma) assimilabili a quelli tipici causati da attacchi di *Phytophthora* spp.

Per effettuare le ricerche oggetto di questa tesi, tra tutte le emergenze rilevate ne sono state prescelte 5 in bosco e 3 in vivaio, come di seguito specificato:

Castagneti

Sono stati scelti due siti ubicati nel versante Nord-occidentale del massiccio del Gennargentu: uno ricade nel territorio di Aritzo (39°56'N, 9°11'E; 850 m s.l.m.) e l'altro in quello di Desulo (40°02'N, 9°13'E; 1200 m s.l.m.) (Fig. 4). In entrambi insistono boschi di castagno (*Castanea sativa*), abbandonati o governati per lo più a ceduo, con numerose piante sintomatiche.

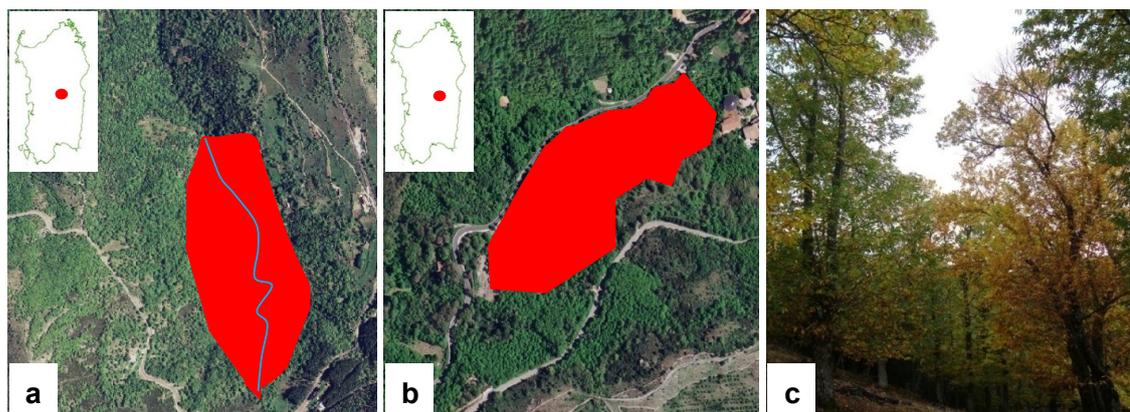


Figura 4. Ubicazione e ortofoto dei castagneti (in rosso i siti d'indagine) in agro di Aritzo (a) e di Desulo (b); piante di castagno sintomatiche (c).

Querceti

È stato scelto un sito ubicato nell'Isola di Caprera (41°12'N, 9°27'E; 50 m s.l.m.) che ricade all'interno del Parco Nazionale dell'Arcipelago di La Maddalena (Fig. 5). Il bosco è costituito principalmente da piante disetanee di *Quercus ilex*, con elementi sparsi di *Q. suber* e *Pinus* spp., e da un folto sottobosco di specie caratteristiche della macchia mediterranea (*Arbutus unedo*, *Cistus* spp., *Erica* spp. *Juniperus* spp., *Myrtus communis* e *Olea europaea* var. *sylvestris*).

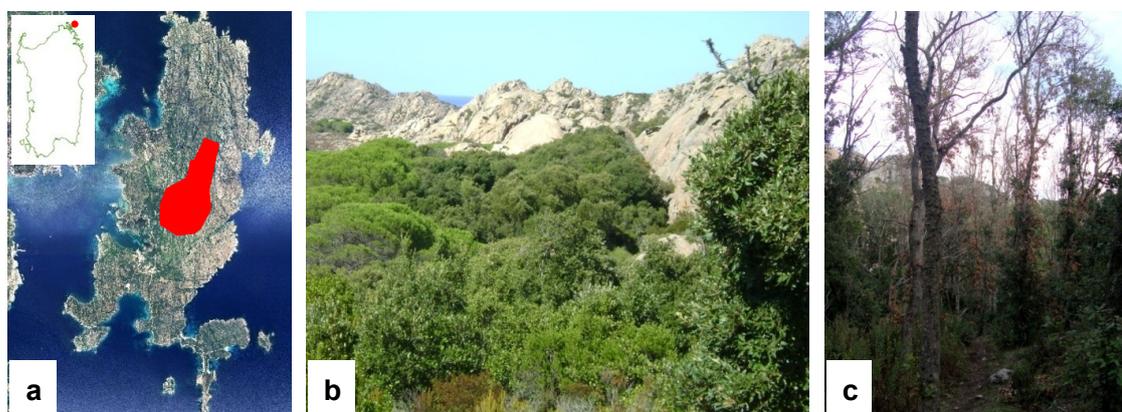


Figura 5. Ubicazione e ortofoto del bosco di leccio nell'Isola di Caprera (a); folta vegetazione di macchia mediterranea (b); sintomi di deperimento (c).

La gran parte delle piante di leccio mostravano sintomi di varia gravità (ingiallimenti della chioma più o meno estesi, rami epicormici, disseccamenti progressivi di branche, necrosi spesso umide su fusto e branche); numerose erano anche le piante ormai disseccate.

Sistemi ripari

Le indagini sono state effettuate in due sistemi ripari: uno ad ontano nero e agrifoglio ubicato nel Centro Sardegna in agro del Comune di Tonara (40°01'N, 9°12'E; 1300 m s.l.m.), l'altro ad ontano nero situato nel Nord dell'Isola nel territorio del Comune di Bortigiadas (40°51'N, 9°00'E; 100 m s.l.m.) (Fig. 6).

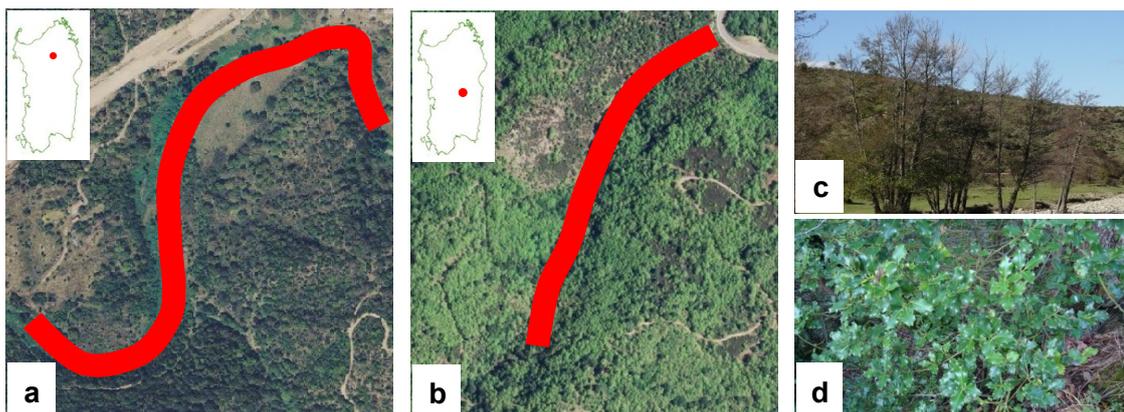


Figura 6. Ubicazione e ortofoto dei sistemi ripari a ontano nero a Bortigiadas (a), e a ontano nero e agrifoglio a Tonara (b); particolare di piante sintomatiche di ontano (c) e agrifoglio (d).

In entrambi i casi, lungo i versanti dei corsi d'acqua si riscontravano piante in precarie condizioni vegetative che manifestavano disseccamenti più o meno estesi della chioma, accanto ad altre ormai morte.

Vivai forestali

Sono stati individuati 3 vivai forestali, due situati in aree montane, rispettivamente nel territorio dei Comuni di Bono ($40^{\circ}25'N$, $8^{\circ}58'E$; 850 m s.l.m.) e di Sorgono ($40^{\circ}01'N$, $9^{\circ}04'E$; 750 m s.l.m.), e uno ubicato più vicino al livello del mare nel Centro Sardegna in agro di Oristano ($39^{\circ}57'N$, $8^{\circ}36'E$; 20 m s.l.m.) (Fig. 7).

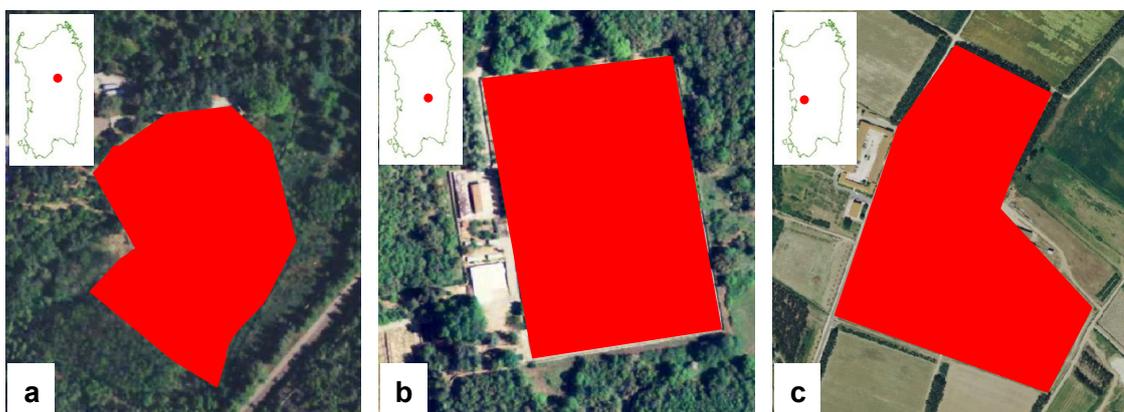


Figura 7. Ubicazione e ortofoto dei vivai forestali di Bono (a), Sorgono (b) e Oristano (c)

4.2 Valutazione dello stato sanitario di popolamenti di castagno e di leccio

La valutazione è stata effettuata con riferimento alla gravità del “mal dell’inchostro” delle piante di castagno nel bosco di Desulo e del “deperimento” delle piante di leccio nel bosco di Caprera. Per quanto riguarda il castagneto, i rilievi sono stati effettuati su 120 piante comprese in un transetto ipotetico di 20 m di larghezza e 250 m di lunghezza. In particolare, è stato rilevato il numero di piante malate e a ciascuna di esse è stata attribuita una “classe” di malattia compresa tra 0 e 4, in base alla percentuale di chioma sintomatica, come segue: 0 = <10%, 1 = 11-30%, 2 = 31-60%, 3 = 60-90% e 4 = >90%. I dati ottenuti sono stati utilizzati (Groth *et al.*, 1999), per calcolare il grado di:

- *Diffusione* (D%) della malattia, applicando la formula $D=(N_m / N) \times 100$, dove “ N_m ” rappresenta il numero di alberi malati e “ N ” il numero totale di alberi esaminati;
- *Intensità* (I%) della malattia, utilizzando la formula $G=(\sum(x_i n_i) / N_m \times 4) \times 100$, dove “ x_i ” rappresenta il valore della classe di malattia, “ n_i ” il numero di alberi malati nella classe n_i , “ N_m ” il numero totale di alberi malati e “4” il valore della classe di malattia più elevata;
- *Incidenza della Malattia* (IM%), definita dal prodotto del grado di diffusione (D) per il grado di intensità (I) della malattia.
- *Mortalità* (M) delle piante, dividendo il numero di piante morte (d) per il numero totale di piante esaminate: $M = d/N$.

Per valutare la gravità del “deperimento” delle piante di leccio è stata allestita nel bosco, con l’ausilio di un GPS portatile (eTrex, Garmin), una rete di 20 aree di saggio (ADS) circolari (\varnothing 10 m), scelte in modo da rappresentare tutte le situazioni vegetazionali ricomprese su una superficie complessiva di circa 100 ettari. In ciascuna ADS sono state esaminate tutte le piante di leccio presenti, rilevando il numero di quelle asintomatiche, di quelle deperenti (che mostravano trasparenza della chioma e/o necrosi, essudati, cancri, carie, rami epicormici su fusto e branche) e di quelle ormai disseccate. I dati ottenuti sono stati utilizzati per calcolare il grado di diffusione del “deperimento”.

4.3 Campionamenti

Nei due castagneti in esame sono state scelte *at random* in totale 47 piante sintomatiche (13 di queste disposte lungo un corso d'acqua) e 22 piante asintomatiche (7 erano disposte lungo un corso d'acqua). In prossimità di queste piante sono stati prelevati, a circa 50 cm dal fusto e lungo le 4 direzioni cardinali, campioni di suolo contenenti porzioni di radici ad una profondità compresa tra 5 e 15 cm. Ciascun campione è stato inserito in una busta di plastica, sul quale sono stati riportati i riferimenti del prelievo. Inoltre, da tutte le piante sintomatiche sono state asportate porzioni di tessuto corticale e xilematico a livello del colletto in corrispondenza del fronte di avanzamento della malattia. Ciascuno di questi campioni è stato messo in una busta di plastica sulla quale sono stati annotati i riferimenti del prelievo. Tutti i campioni prelevati sono stati infine trasferiti in giornata in laboratorio e conservati in frigorifero a 5°C fino al momento dell'uso per l'isolamento delle specie di *Phytophthora*.

I campionamenti nel bosco di leccio sono stati effettuati nelle ADS allestite per valutare il grado di deperimento delle piante. In particolare, in ciascuna ADS sono state individuate *at random* da 1 a 5 piante deperenti e in prossimità di ognuna di esse (a circa 50 cm dal fusto) è stato prelevato un campione di suolo e uno di radici fini alla profondità di circa 10-15 cm. Anche in questo caso i campioni sono stati trattati come i precedenti fino al momento dell'uso.

Nei sistemi ripari a ontano nero e ad agrifoglio sono stati prelevati tessuti corticali infetti da piante delle due specie scelte *at random* che mostravano cancri ed essudati al colletto, essudati nel fusto e disseccamenti della chioma. Oltre a questi campioni, trattati anch'essi come sopra, sono stati effettuati ulteriori prelievi lungo i corsi d'acqua dei due sistemi ripari, utilizzando la tecnica del *baiting* con foglie di rododendro (Reeser *et al.*, 2007), meglio specificata più avanti.

Infine, nei tre vivai monitorati sono state prelevate piantine coltivate in contenitori (vasi o fitocelle) o in piena terra delle diverse specie vegetali che mostravano disseccamenti e marciumi radicali. Una volta trasferite in

laboratorio, le piantine sono state prontamente esaminate con l'ausilio di un microscopio stereoscopico per rilevare la presenza di segni di parassiti e successivamente utilizzate per l'isolamento di eventuali patogeni. Per lo stesso fine sono state utilizzate anche porzioni di terreno prelevate dal campo in prossimità delle piantine oppure dai contenitori di ciascuna di esse.

4.4 Substrati di crescita

Per l'isolamento e la caratterizzazione delle specie di *Phytophthora* sono stati utilizzati i seguenti substrati di crescita:

Synthetic Mucor Agar (SMA)

È un substrato selettivo specifico per *Phytophthora* (Brasier e Kirk, 2001b), costituito da diversi elementi nutrizionali e antimicrobici per inibire lo sviluppo di batteri e funghi: saccarosio, 10 g; L-asparagina, 1 g; solfato di magnesio, 0,25 g; tiamina HCl, 0,001 g; elementi minerali¹, 1 ml; agar *technical* n. 3, 15 g; potassio diidrogeno orto fosfato, 0,5 g; 4% MBC², 0,5 ml; pimaricina (2,5% w/v), 0,4 ml; rifamicina SV (1% w/v), 3 ml; acqua distillata 1 L. Dopo correzione del pH a 6,5 con NaOH 1 M, il substrato è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti. I due antibiotici (pimaricina e rifamicina) sono stato aggiunti dopo la sterilizzazione ad una temperatura di circa 45°C.

Carota-agar (CA)

È un substrato idoneo sia per la crescita sia per la conservazione delle specie di *Phytophthora*. È costituito da: filtrato di carote 200 g; agar tecnico N. 3 15 g e acqua distillata 1000 ml. Il filtrato di carote è stato ottenuto per triturazione di 200 grammi di carote con 500 ml di acqua distillata. All'omogenato, dopo filtrazione su garza, è stato aggiunto l'agar (2% w/v) e 500 ml di acqua distillata. Il substrato è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti. In alcuni casi il terreno è stato sterilizzato due volte.

Patata-destrosio-agar (PDA).

È il substrato di crescita standard, costituito da: Potato Dextrose Agar (PDA, Oxoid) 39 g; acqua distillata 1000 ml. Il substrato è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti.

¹Elementi minerali: Na₂B₄O₇ 10H₂O 0,044 g; Fe₂(SO₄)₃ 9H₂O 0,5035 g; CuSO₄ 5H₂O 0,1965 g; MnCl₂ 4H₂O 0,036 g; NaMoO₄ 2H₂O 0,025 g; ZnSO₄ 7H₂O 2,2015 g; EDTA 2,5 g; H₂O 500 ml.

²)MBC 4%: Carbendazim 4 g; HCl 2,8 ml; H₂O 47,2 ml.

4.5 Metodi d'isolamento delle specie di *Phytophthora*

L'isolamento diretto delle specie di *Phytophthora* da tessuti di organi infetti (foglie, fusto, radici) delle piante o dal suolo è estremamente difficile. Ciò a causa della scarsa capacità competitiva di questi microrganismi rispetto ai funghi e ai batteri. Nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi protocolli d'isolamento al fine di superare questo problema. Ad oggi, la tecnica *baiting*, che sfrutta la capacità delle specie di *Phytophthora* di infettare i tessuti di alcune piante esca, risulta sicuramente una delle più efficaci e perciò una delle più utilizzate (Ribeiro, 1978).

In questo studio gli isolamenti sono stati effettuati utilizzando due differenti tecniche di *baiting* e/o direttamente su piastre contenenti un substrato selettivo.

Baiting con foglie di *Rhododendron* sp.

I campioni prelevati in bosco e in vivaio sono stati analizzati in laboratorio entro le 24 ore successive al loro prelievo. In particolare, i campioni di suolo (circa 200 g) sono stati versati all'interno di vaschette di plastica contenenti 500 ml di acqua distillata e frammenti di foglie fresche di *Rhododendron* sp. come trappola (Fig. 8 b). I campioni di radici, accuratamente separati dal suolo, sono stati lavati abbondantemente con acqua distillata e successivamente posti in vaschette contenenti acqua sterile e foglie di rododendro.

Le vaschette sono state mantenute in laboratorio a una temperatura di circa 20°C. Dopo 5 e 7 giorni le foglie che presentavano maculature o aree necrotiche, sono state lavate in acqua sterile, asciugate su carta da filtro sterile e successivamente trasferite su piastre Petri contenenti SMA (Fig. 8 c). Le piastre sono state trasferite in termostato a 18-20°C, controllate giornalmente e tutte le colonie con caratteristiche morfologiche tipiche del genere *Phytophthora* sono state asetticamente trapiantate in piastre Petri (90 mm Ø) contenenti CA e PDA. Le colonie ottenute in purezza sono state mantenute in termostato a 20°C al buio, per la differenziazione delle strutture morfologiche necessarie per l'identificazione a livello di specie.

Baiting con mele Granny Smith

Il metodo prevede l'uso di mele della varietà *Granny Smith* come trappola. Nelle mele, previa sterilizzazione superficiale con alcool etilico al 70%, sono stati effettuati due fori di circa 13 mm di diametro e 25 mm di profondità e al loro interno sono state introdotte porzioni di radici, suolo e/o tessuti infetti. Le mele così trattate sono state mantenute in laboratorio per 5-6 giorni, a una temperatura di circa 20°C. Dal margine delle lesioni tipiche (superficiali, dure e di colore marrone-scuro) sviluppatasi sui tessuti superficiali delle mele (Fig. 8 a), sono stati effettuati gli isolamenti su SMA, e le colonie successivamente trapiantate su CA e PDA come descritto nel precedente metodo.



Figura 8. Tecniche di *baiting*: caratteristica necrosi da *Phytophthora* su mela (a); frammenti di foglie di rododendro impiegate come esca (b), frammenti di foglie trasferiti su piastra Petri contenente SMA (c).

Isolamento dai tessuti infetti su terreno selettivo

Gli isolamenti da campioni di tessuti sintomatici di radici, fusto, rami e foglie, talvolta sono stati effettuati direttamente su SMA. A tal fine, i campioni sono stati lavati con acqua distillata e alcool etilico al 70% ed asciugati su carta da filtro sterile. Successivamente, da ciascun campione (in prossimità del margine della lesione) sono stati prelevati frammenti di circa 3-4 mm² e trasferiti in piastre Petri (90 mm Ø) contenenti SMA. Le piastre sono state incubate in termostato a 20°C e al buio. Anche in questo caso le piastre sono state controllate giornalmente e tutte le colonie tipiche di *Phytophthora* sono state trapiantate asetticamente su CA e PDA in coltura pura.

4.6 Identificazione degli isolati di *Phytophthora*

L'identificazione su base morfologica a livello di specie delle *Phytophthorae* risulta quasi sempre relativamente semplice. Tuttavia, esistono dei casi in cui le differenze morfologiche tra alcune specie sono minime per cui la loro corretta identificazione può essere fatta solo integrando i dati morfologici con quelli fisiologici e biomolecolari.

Le specie isolate in questo studio sono state identificate su base morfologica utilizzando sia le chiavi di identificazione proposte da Chen e Zentmyer (1970) e Erwin e Ribeiro (1996), sia per confronto con isolati di *Phytophthora* spp. *tester* (Tab. 2). Inoltre, l'identificazione di alcune specie è stata confermata con l'ausilio di tecniche biomolecolari.

Tabella 2. Isolati di specie di *Phytophthora* utilizzati come *tester* in questo studio.

Isolato	Specie	Mating type	Località	Fornito da:
P2089	<i>P. cambivora</i>	A1	UK	C.M. Brasier
P904	<i>P. cinnamomi</i>	A1	Australia	C.M. Brasier
P1889	<i>P. cinnamomi</i>	A2	UK	C.M. Brasier
IMI 397618	<i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	A2	Itala (Sicilia)	G. Magnano di San Lio
STEU6265	<i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	A1	Sud Africa	K. Bezuidenhout
BS21	<i>P. citricola</i>	Omotallica	UK	J.F. Webber
P2088	<i>P. citrophthora</i>	-	Spagna	C.M. Brasier
P542	<i>P. cryptogea</i>	A2	UK	C.M. Brasier
P537	<i>P. dreschleri</i>	A1	UK	C.M. Brasier
P540	<i>P. dreschleri</i>	A2	UK	C.M. Brasier
P897	<i>P. gonapodyides</i>	-	UK	C.M. Brasier
899.1	<i>P. ilicis</i>	Omotallica	UK	J. Denton
P540	<i>P. pseudosyringae</i>	Omotallica	UK	J.F. Webber

4.6.1 Caratterizzazione morfologica

Lo studio dei caratteri morfo-culturali delle strutture riproduttive e di conservazione di ciascun isolato, è stato fatto su colonie coltivate in purezza su CA e PDA. Inizialmente gli isolati sono stati suddivisi in gruppi sulla base dell'aspetto miceliare delle colonie (tessitura, voluminosità e tipo di crescita).

Per tutti gli isolati è stata verificata sia la capacità di produrre clamidospore e *hyphal swelling* sia la forma e le dimensioni delle medesime. Inoltre, è stata rilevata la forma e le dimensioni degli sporangi e, per le specie omotalliche, anche dell'oospora. A tal fine, sono stati allestiti dei preparati per microscopia utilizzando blu di lattofenolo. I dati biometrici delle strutture riproduttive sono stati rilevati utilizzando il software in dotazione alla camera digitale Optika™ Vision Pro versione 2.7 connessa al microscopio ottico Leitz Diaplan (Leitz, Germany). Le osservazioni sono state effettuate su 25 sporangi per specie. Per alcune specie è stato necessario stimolare la differenziazione degli sporangi trasferendo dischetti di micelio di 1 cm di diametro in piastre Petri da 60 mm contenenti acqua distillata e/o acqua di stagno.

4.6.2 Accrescimento miceliare in funzione della temperatura

L'effetto della temperatura sullo sviluppo degli isolati è stato valutato attraverso l'accrescimento diametrico. Un dischetto (5 mm Ø) è stato prelevato dal margine di colture di 5 giorni di età e posizionato in piastre Petri (90 mm Ø) contenenti 20 ml di CA. Le piastre sono state incubate per 4 o 7 giorni a seconda della specie, a diverse temperature, in un *range* compreso tra 5 e 40°C, con intervalli di 5°C. Ciascuna prova è stata allestita con 3 replicazioni e ripetuta due volte. Dopo il periodo di incubazione, è stato misurato il diametro delle colonie di ciascuna specie e calcolato l'accrescimento diametrico giornaliero, dividendo la misura del diametro, previa sottrazione del diametro dell'inoculo, per il numero dei giorni di incubazione.

4.6.3 Comportamento sessuale

Per le specie eterotalliche sono stati effettuati dei saggi in coltura duale per determinare il *mating type* (A1 o A2) degli isolati ottenuti. Tale procedura è stata effettuata grazie all'utilizzo di ceppi di *Phytophthora* di tipo sessuale A1 e A2 già noto¹ (Tab. 2).

¹Il saggio permette di differenziare il tipo sessuale (*mating type* A1 o A2), ma non i caratteri morfo-biometrici dei gametangi che sono acquisiti da entrambe le specie. Ciò è possibile solo se vengono appaiati due isolati della stessa specie.

Dischetti di micelio di 5 mm di diametro, prelevati da giovani colonie (4-8 giorni età a seconda della specie), sono stati appaiati con isolati *tester* di *mating type* noto, in piastre Petri (90 mm Ø) contenenti CA. Il substrato per questi saggi è stato autoclavato due volte a 121°C per 15 minuti e versato in modo tale che esso formasse uno strato sottile in piastra. Le piastre sono state incubate al buio, per 10 giorni a 20°C e per ulteriori 5 giorni a 10°C, per stimolare la produzione delle strutture sessuali (Brasier e Kirk, 2004). La presenza dei gametangi è stata osservata lungo la linea di sovrapposizione miceliare al microscopio ottico capovolgendo le piastre.

4.6.4 Caratterizzazione biomolecolare

Alcuni isolati rappresentativi di ciascuna delle specie di *Phytophthora* ottenute in questo studio, sono stati utilizzati per il sequenziamento e l'analisi delle regioni ITS del rDNA.

Estrazione del DNA

Frammenti di micelio di ciascun isolato sono stati posizionati su piastre Petri contenenti CA e una membrana in cellofan, al fine di evitare la penetrazione del micelio all'interno dell'agar.

L'estrazione del DNA è stata effettuata seguendo il metodo CTAB riportato da Doyle e Doyle (1987), leggermente modificato. Porzioni di micelio sono state prelevate dalla superficie della membrana in cellofan e trasferite all'interno di tubetti eppendorf contenenti delle biglie d'acciaio di 3 mm di diametro. I tessuti dei campioni sono stati tritati mediante un omogeneizzatore Mixer Mill (Qiagen), per 2,5 minuti ad una frequenza di 30 Hz per 2 volte; la prima volta senza tampone e la seconda con l'aggiunta di 500 µl di tampone (Doyle e Doyle, 1987). Successivamente i campioni sono stati incubati a 55°C per 30 minuti. Dopo l'incubazione è stato aggiunto un volume (500 µl) di cloroformio/alcool isoamilico (24:1 v/v). I campioni sono stati centrifugati per 10 min a 8000 rpm a 20°C. Il surnatante è stato trasferito in tubetti eppendorf ed è stato aggiunto un volume di isopropanolo (pre-raffreddato a 20°C), mescolati e incubati in ghiaccio per 10 minuti. I campioni sono stati ulteriormente

centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C e l'isopropanolo è stato eliminato. Il pellet di DNA è stato asciugato e risospeso in 100 µl di TE buffer (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM) a pH 8 e conservato a 4°C per le successive analisi.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'amplificazione delle regioni ITS1, 5.8S e ITS2 è stata ottenuta mediante PCR con l'impiego dei *primers* universali ITS1 and ITS4 (White *et al.*, 1990). La reazione è stata realizzata in un volume totale di 50 µl contenente i reagenti, come di seguito riportato: H₂O, 22,3 µl; Buffer 5x, 10 µl; dNTPs (2 mM), 5 µl; MgCl₂ (25mM), 1,5 µl; Primer ITS1, 5 µl; Primer ITS4, 5 µl; Promega GoTaq polymerase, 0,2 µl; Template (50 ng/µl), 1 µl.

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio (1,5% w/v), a 70V per 90 minuti. Successivamente il gel è stato visualizzato al *GelDoc* e il DNA è stato quantificato attraverso l'impiego del software *Quantity One*[®] (Biorad), mediante il confronto con il marcatore di peso molecolare "1kb plus DNA ladder" (Invitrogen).

Sequenziamento della regione ITS1-5.8S-ITS2

Gli amplificati sono stati purificati con il kit "*Charge Switch PCR Clean-Up Kit*" (Invitrogen), e sequenziati presso la BMR-Genomics, servizio di sequenziamento di DNA, Spin-off dell'Università di Padova (<http://www.bmr-genomics.it/>).

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 della regione ITS1-5.8S-ITS2 dell'rDNA di alcune specie ottenute in questo studio, sono state depositate in GenBank utilizzando il sistema BankIt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.7 Saggi di patogenicità

Per tutte le specie di *Phytophthora* isolate da ospiti non riportati in letteratura è stata saggiata la patogenicità e soddisfatti i postulati di Koch attraverso tre differenti saggi.

Inoculazione tramite ferita su fusto

L'inoculazione su fusto è stata effettuata su semenzali di 1 e/o 2 anni di età della stessa specie da cui le *Phytophthorae* erano state isolate. Tutti i semenzali sono stati coltivati in fitocella e tenuti in ambiente controllato ad una temperatura compresa tra 10 e 25°C.

In particolare, è stata praticata con un bisturi sterile un'incisione longitudinale di circa 1 cm sul fusto di ciascun semenzale. Nella ferita è stato quindi inoculato un dischetto di micelio di 5 mm, prelevato dal margine di colonie del patogeno di 5 giorni di età su CA. Per evitare la rapida disidratazione del micelio, il punto d'inoculo è stato avvolto per una settimana con cotone sterile inumidito e protetto con carta stagnola o parafilm "M". I testimoni sono stati inoculati con un dischetto di CA sterile.

Ciascun isolato è stato saggiato su 5 semenzali e tre semenzali sono stati impiegati come testimoni. Alla fine della prova è stata rilevata su ciascun semenzale la lunghezza della lesione e il tipo di sintomo causato dal patogeno.

Inoculazione tramite suolo infettato

I saggi attraverso suolo infettato sono stati effettuati come riportato da Vettrano e coll. (2001) apportando leggere modifiche. I semenzali utilizzati sono stati ottenuti in serra attraverso la semina di castagne, previa sterilizzazione superficiale. Le piantine sono state coltivate in vasi di plastica da 0,5 L (Bamaplast), contenenti 60% di torba e 40% di sabbia. Una volta raggiunta l'altezza di circa 20-30 cm, le piantine sono state trasferite in vasi di plastica da 1 L contenenti suolo infettato da *Phytophthora* spp. L'inoculo di *Phytophthora* è stato preparato come di seguito riportato: dischetti di 5 mm sono stati prelevati da colonie di 5 giorni di età e posizionati all'interno di beute

da 250 ml contenenti 150 ml di semi di loliessa (*Lolium italicum*) e 100 ml di brodo di V8 (200 ml V8 Juice, 3 g CaCO₃; 800 ml di acqua distillata). Le beute sono state incubate in termostato ad una temperatura di 20°C per 4-6 settimane. Trascorso tale periodo la miscela ormai colonizzata dal micelio è stata lavata ripetutamente con acqua sterile al fine di ridurre l'eccesso di nutrienti, e successivamente aggiunta (25 ml) al substrato (1 L). I vasi sono stati conservati in laboratorio e dopo 5 giorni dall'inoculazione immersi per 24 ore in vaschette di plastica contenenti acqua distillata al fine di indurre la sporulazione degli isolati di *Phytophthora*. Due mesi dopo l'inoculazione sono stati prelevati dai vasi campioni di suolo per verificare la presenza di *Phytophthora* spp. attraverso la tecnica del *baiting*.

La gravità dei sintomi è stata valutata attraverso una scala empirica di valori da 0 a 4, dove: 0 = pianta sana; 1 = avvizzimento inferiore al 10%; 2 = avvizzimento del 50%; 3 = avvizzimento e necrosi fino al 100%; 4 = pianta morta. Alla fine della prova è stato calcolato l'Indice della Malattia (IM), usando la seguente formula: $IM = \sum(g \times n)/N$, dove g = classe di danno, n = numero di piante appartenenti a ciascuna classe e N = numero totale di piante inoculate.

Inoculazione su astoni di castagno

Astoni di circa 5-8 cm di diametro e 1,5 m di lunghezza, sono stati tagliati da ceppaie di castagno e portati in laboratorio per l'inoculazione (Brasier e Kirk, 2001). Prima dell'inoculazione gli astoni sono stati disinfettati in superficie con alcool etilico al 70% e le due estremità e le eventuali ferite procurate durante il taglio delle branche laterali sono state trattate con mastice cicatrizzante. Successivamente sono stati individuati tre punti di inoculazione, equamente distribuiti sul tronco.

Attraverso l'ausilio di un bisturi è stata effettuata un'incisione longitudinale di circa 1 cm asportando la corteccia, ed è stato quindi inoculato un dischetto di micelio di 5 mm² del patogeno da saggiare prelevandolo da culture giovani su CA. Il punto di inoculo è stato avvolto con del cotone idrofilo, inumidito con acqua distillata sterile, avvolto con carta stagnola e sigillato con del nastro

isolante. Ciascun astone è stato inoculato con due isolati *Phytophthora* e un dischetto di CA sterile (testimone). Per ciascun isolato saggiato sono state effettuate 5 repliche.

Una volta inoculati gli astoni sono stati posizionati all'interno di buste di plastica, sigillate e incubate ad una temperatura di circa 20°C per 2 mesi. Trascorso tale periodo gli astoni sono stati scortecciati intorno al punto di inoculazione ed è stata misurata la lunghezza delle lesioni causata da ciascuna specie di *Phytophthora* saggiata.

4.8 Produzione *in vitro* di metaboliti secondari fitotossici

Al fine di ampliare le conoscenze sulla biologia delle specie del genere *Phytophthora*, tre isolati rappresentativi delle specie *P. cambivora* (PH041), *P. gonapodyides* (PH038) e *P. pseudosyringae* (PH043), sono stati saggiati per la loro capacità di produrre *in vitro* metaboliti secondari fitotossici potenzialmente coinvolti nella patogenesi.

Ottenimento dei filtrati colturali

Gli isolati sono stati allevati in condizioni statiche su due differenti substrati liquidi.

Il primo (substrato A) è stato preparato sulla base di quello proposto da Erwin e Katznelson (1961) e Clare e Zentmyer (1966), al quale sono state apportate leggere modifiche: D-glucosio, 30 g; L-asparagina, 1 g; $\text{FeSO}_4\text{H}_2\text{O}$, 1 mg; $\text{CaCl}_2\ 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; $\text{MgSO}_4\ 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g; KH_2PO_4 , 0,47 g; K_2HPO_4 , 0,26 g; tiamina, 1 mg; H_2O distillata, 1 L; β -sitosterolo, 20 mg; 1ppm di Zn ($\text{ZnSO}_4\ 7\text{H}_2\text{O}$); 0,02 ppm di Cu ($\text{CuSO}_4\ 5\text{H}_2\text{O}$), Mo ($\text{NaMoO}_4\ 2\text{H}_2\text{O}$), e Mn ($\text{MnCl}_2\ 4\text{H}_2\text{O}$).

Il secondo (substrato B) riportato da Cristinzio e coll. (1992), è composto da: L-asparagina, 1 g, saccarosio, 10 g; estratto di lievito, 5 g; tiamina 0,001 g; $\text{KH}_2\text{PO}_4\ 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; H_2O distillata, 1 L. 170 ml di ciascun substrato nutritivo sono stati versati in bottiglie di Roux (1 L) ed inoculati con 4 ml di una sospensione miceliare, ottenuta allevando ciascun isolato in beute (250 ml) contenenti brodo di carota e mantenute in agitazione a 150 rpm per 7 giorni a 25°C.

Le bottiglie di Roux inoculate sono state mantenute per 30 giorni in una camera climatica a 25°C al buio. Al termine del periodo di incubazione, le colture sono state filtrate prima su garza e successivamente su filtri a membrana millipore (ExpressTM Plus) da 0,22 μm . Il filtrato colturale ottenuto è stato conservato in congelatore a -20°C fino al momento della successiva estrazione.

Ottenimento degli estratti organici

Un'aliquota di ciascun filtrato colturale è stata estratta esaustivamente con acetato di etile dopo correzione del pH iniziale a 4 con HCl 2N. Una seconda aliquota è stata estratta in modo analogo senza modificare il pH della soluzione. Le fasi organiche combinate sono state anidificate con solfato di sodio anidro, concentrate a pressione ridotta in rotavapor a 40°C, evaporate a secchezza e successivamente pesate.

Biosaggi

L'attività fitotossica dei filtrati colturali e degli estratti organici è stata valutata su piantine recise di pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) di circa 21 giorni, coltivate in cella climatizzata a 25°C e umidità relativa del 70-80%. I recisi sono stati immersi nelle soluzioni di saggio (3 ml) per 48 ore, poi trasferiti in acqua distillata sterile fino alla comparsa dei sintomi. Il filtrato colturale è stato saggiato tal quale e diluito serialmente da 10^{-1} a 10^{-2} . L'estratto organico è stato saggiato alla concentrazione di 0.25, 0.5 e 1 mg/ml. È stata saggiata anche l'attività fitotossica degli esausti acquosi, sia tal quali che diluiti serialmente, per valutare la presenza di metaboliti idrofili e/o ad elevato peso molecolare non estraibili con l'acetato di etile.

Le tesi di controllo sono state allestite con i due substrati di crescita non inoculati, con una soluzione acquosa di metanolo allo 0,5% e con acqua sterile. Per tutta la durata dell'esperimento i recisi sono stati mantenuti in una cella climatizzata alla temperatura di 25°C, ed umidità relativa del 60%.

4.9 Conservazione delle specie di *Phytophthora*

Gli isolati di *Phytophthora* ottenuti in questo studio sono stati conservati in coltura pura secondo tre differenti metodologie (Erwin e Ribeiro, 1996):

- a) dischetti di micelio sono stati posizionati all'interno di *vials* di vetro da 16 ml contenenti CA, dopo circa 6 giorni dalle inoculazioni sono stati aggiunti 5 ml di olio di paraffina e quindi sigillati;
- b) dischetti di micelio posizionati all'interno di *vials* come sopra ma senza aggiunta di olio di paraffina;
- c) dischetti di micelio sono stati trasferiti all'interno di *vials* contenenti acqua sterile.

In tutti e tre i metodi i *vials* sono stati conservati in termostato a 10°C e le colonie trapiantate dopo 2 anni di conservazione.

4.10 Elaborazione dei dati

I dati relativi alla lunghezza dell'area necrotica causata da ciascuna specie di *Phytophthora* 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).

5. RISULTATI

5.1 Indagine nei castagneti

5.1.1 Stato sanitario dei popolamenti

In entrambi i siti monitorati è stata rilevata la presenza di numerose piante che mostravano la sindrome tipica del “mal dell’inchiostro” (Fig. 9).

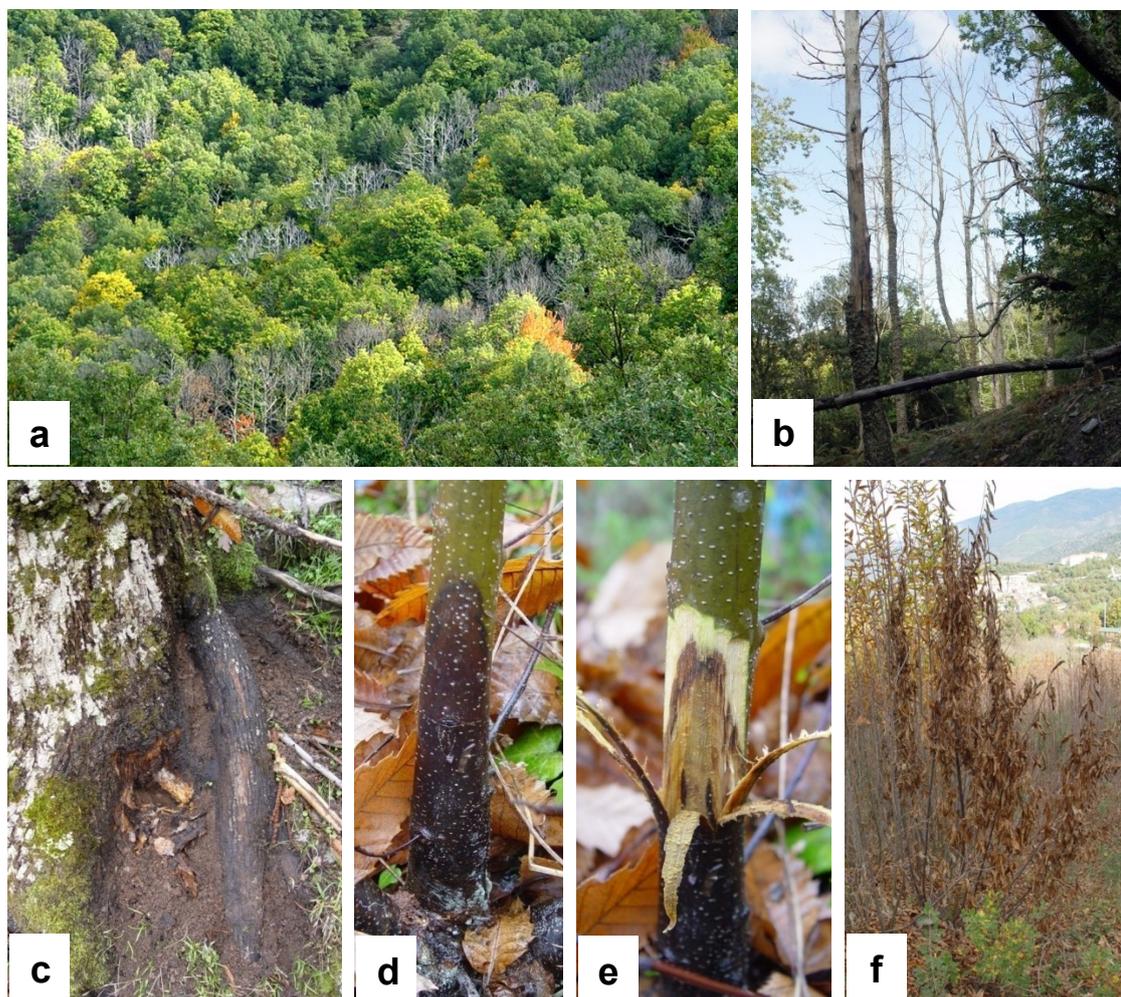


Figura 9. Sintomi di “mal dell’inchiostro” rilevati nelle aree di studio: morie estese lungo le linee di compluvio (a); particolare di piante disseccate (b); necrosi nel colletto e nelle grosse radici (c); tipica “fiammata” su giovane pollone (d); particolare della “fiammata” a livello sotto-corticale (e); foglie persistenti sui rami disseccati durante il periodo invernale (f).

I sintomi erano rappresentati a livello di chioma da microfillia, rarefazione, clorosi e disseccamenti (Fig. 9 a, b) – spesso i ricci e le foglie persistevano nei rami anche durante la stagione invernale (Fig. 9 f) – a livello di colletto da vaste aree necrotiche di colore marrone scuro tendente al nero, a contorno definito e dalla caratteristica forma a fiamma. Anche le grosse radici spesso mostravano aree necrotiche da cui fuoriuscivano essudati nerastri (Fig. 9 c).

Tali sintomi sono stati riscontrati soprattutto durante la stagione autunnale e primaverile sia su fustaie sia su giovani polloni di ceppaia. Questi ultimi mostravano in particolare ampie necrosi corticali a livello del colletto (Fig. 9 d, e) e repentini disseccamenti della chioma. Spesso le ceppaie colpite esaurivano la loro capacità pollonifera a causa della distruzione dell'apparato radicale.

Dai rilievi effettuati nel sito di Desulo (Tab. 3), è emersa l'elevata gravità di questa malattia in termini sia di diffusione (l'85% delle piante erano sintomatiche), sia di intensità, valutata pari all'87,8%, sia di mortalità (69 piante morte su 120 esaminate). Nel complesso l'incidenza della malattia è risultata del 75,4%.

Tabella 3. Valutazione dell'incidenza del “mal dell'inchiostro” nel castagneto di Desulo.

N° piante esaminate	N° piante per classe di malattia				
	0	1	2	3	4
120	17	8	7	12	76

5.1.2 Isolamento, identificazione e caratterizzazione delle specie di *Phytophthora*

L'isolamento è stato effettuato da campioni di rizosfera e/o di tessuti corticali di 69 piante di castagno: 34 sintomatiche, 15 asintomatiche e 20 dislocate lungo corsi d'acqua.

Il risultato di isolamenti da più campioni per pianta è qui inteso come risultato di un unico isolamento per pianta (Tab. 4). In tal modo emerge che dal 73,5% delle piante sintomatiche sono state isolate specie di *Phytophthora*, mentre dalle piante asintomatiche la percentuale di isolamenti positivi è stata solo del 26,7%. Inoltre, emerge che colonie di *Phytophthora* spp. sono state isolate dal 90% delle piante disposte lungo i corsi d'acqua, a dimostrazione della diffusione di questi microrganismi prevalentemente lungo le linee di compluvio.

Complessivamente sono stati ottenuti 80 isolati di *Phytophthora*, appartenenti a 3 differenti specie: *P. cambivora*, *P. gonapodyides* e *P. pseudosyringae*.

Tabella 4. Frequenza di isolamento di *Phytophthora* spp. da piante di castagno asintomatiche e sintomatiche situate in bosco e lungo corsi d'acqua.

	Piante in bosco		Piante lungo corsi d'acqua		Totale
	Sintomatiche	Asintomatiche	Sintomatiche	Asintomatiche	
N° totale isolamenti	34	15	13	7	69
N° isolamenti positivi di <i>Phytophthora</i> spp.	25 (73,5)	4 (26,7%)	13 (100%)	5 (71,4%)	47 (68,1%)
<i>Phytophthora cambivora</i>	20 (58,8%)	2 (13,3%)	8 (61,5%)	0	30 (43,5%)
<i>Phytophthora gonapodyides</i>	4 (11,8%)	1 (6,7%)	5 (38,5%)	5 (71,4%)	15 (21,7%)
<i>Phytophthora pseudosyringae</i>	16 (47%)	2 (13,3%)	13 (100%)	4 (57,1%)	35 (50,7%)

Phytophthora cambivora

Sono stati ottenuti 30 isolati di *P. cambivora* da tessuti corticali, suolo e radici di piante sintomatiche e asintomatiche (Tab. 4). Tali isolati su CA formano colonie con abbondante micelio aereo di colore bianco-niveo (Fig. 10 a) e differenziano sporangi non papillati (Fig. 10 b), di forma ovale, misuranti $44 \pm 3,2 \times 27,5 \pm 2,2 \mu\text{m}$ (media \pm deviazione standard), intervallo di confidenza al 95% $42,7\text{--}45,3 \times 26,6\text{--}28,4 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di 1,6:1. Tutti gli isolati non producono clamidospore e sono di tipo A2; dopo l'appaiamento in coltura duale con i ceppi tester P2089, P904 e P537 (Tab. 2) formano oogoni a parete verrucosa e anteridi anfigini bicellulari (Fig. 10 c). In relazione alle esigenze termiche, le loro migliori condizioni di sviluppo si hanno tra 20 e 25°C, con *optimum* di 22°C (Fig. 11). La temperatura minima di crescita è <5°C mentre la massima è compresa tra 30 e 35°C. L'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi delle sequenze delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA di un isolato rappresentativo. L'analisi BLAST mostra il 99-100% di similarità con le sequenze di *P. cambivora* depositate in GenBank (numero di accesso: EU000090 e EF194775).

Phytophthora gonapodyides

P. gonapodyides è stata isolata solo da campioni di suolo prelevati da piante situate lungo i corsi d'acqua (Tab. 4). I 15 isolati ottenuti formano tutti una caratteristica colonia a rosetta ad accrescimento molto lento (Fig. 10 d). Gli sporangi non papillati di forma ovale e/o ellissoidale si producono in coltura liquida (Fig. 10 e). Le loro dimensioni sono di $47,4 \pm 4,2 \times 30 \pm 2,7 \mu\text{m}$ (media \pm deviazione standard), intervallo di confidenza al 95% $45,8\text{--}49,1 \times 28,9\text{--}31 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di 1,6:1. Tutti gli isolati sono incapaci di differenziare oogoni in coltura duale con i ceppi di *mating type* di riferimento, a conferma della ben nota sterilità di questa specie. La temperatura minima di crescita è <5°C e quella massima è compresa tra 30°C e 35°C, con *optimum* di 25°C (Fig. 11). L'analisi delle sequenze nucleotidiche delle regioni ITS1 e ITS2

dell'rDNA di un isolato rappresentativo mostrano il 99-100% di similarità con le sequenze di *P. gonapodyides* depositate in GenBank (numero di accesso: EU194412 e EU194417).

Phytophthora pseudosyringae

I 35 isolati di *P. pseudosyringae* sono stati ottenuti da piante sia sintomatiche sia asintomatiche e soprattutto lungo i corsi d'acqua (Tab. 4). Tale specie è stata isolata dal suolo e dalle radici sottili; in alcuni casi è stata isolata anche dai tessuti corticali delle grosse radici. Tutti gli isolati su CA hanno formato colonie stellate (Fig. 10 f) e leggermente raggiate, con micelio aereo cotonoso e margine irregolare su PDA. Sia su substrati liquidi che su quelli solidi, formano *hyphal swelling* unite in catenelle semplici o ramificate (Fig. 10 i). Gli sporangi si sono differenziati soprattutto nei substrati liquidi; sono semi-papillati, raramente bipapillati, da limoniformi a ovoidali (Fig. 10 g), occasionalmente decidui con un corto pedicello (<5 µm). Le loro dimensioni sono di $46,3 \pm 7,2 \times 31,9 \pm 3,4$ µm (media ± deviazione standard), intervallo di confidenza al 95% $43,4-49,2 \times 30,5-33,3$ µm, con rapporto lunghezza / larghezza di 1,5:1. Tutti gli isolati in coltura singola producono su CA oogoni sub-sferici con parete liscia e diametro variabile da 23 a 31 µm, con oospore plerotiche e anteridi paragini (Fig. 10 h). La temperatura ottimale per la crescita è compresa tra 15 e 20°C, con un minimo e un massimo rispettivamente di 2 e 26°C (Fig. 11). L'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi delle sequenze delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA. Esse mostrano il 99-100% di similarità con le sequenze di isolati di *P. pseudosyringae* presenti in GenBank (numero di accesso: AY230190 e EU074793). Le sequenze delle regioni ITS di un ceppo rappresentativo ottenuto in questo studio è stato depositato in GenBank (numero di accesso: GU460375).

Di seguito si riferisce sui risultati delle indagini effettuate per saggiare l'attività patogenetica e fitotossica delle specie di *Phytophthora* isolate.

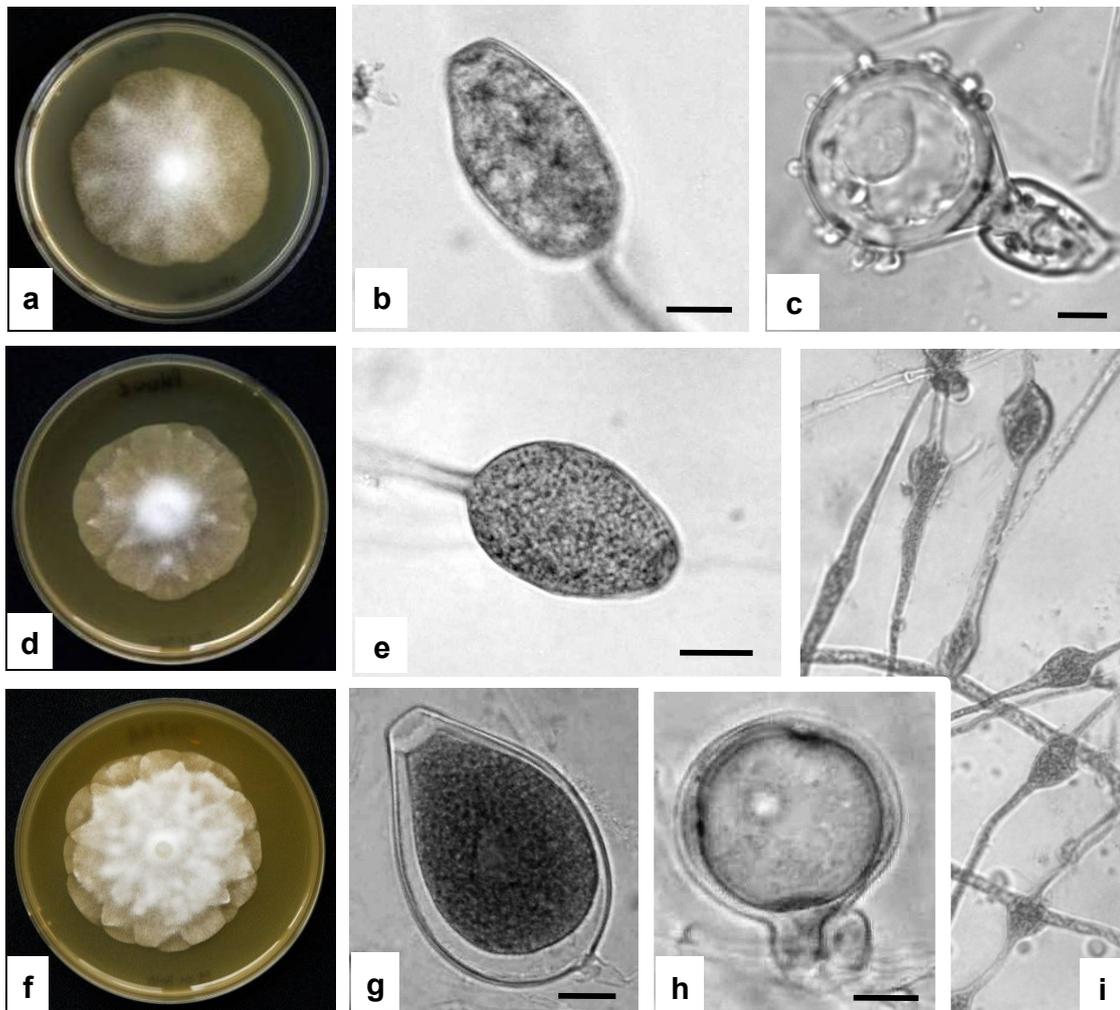


Figura 10. Aspetto delle colonie di 4 giorni di età su CA di *Phytophthora cambivora* (a), *P. gonapodyides* (d) e *P. pseudosyringae* (f); sporangio non papillato (b) e oogonio ornamentato (c) di *P. cambivora*; sporangio non papillato (e) di *P. gonapodyides* ; sporangio semi-papillato (g), oogonio (h) e *hyphal swelling* (i) di *P. pseudosyringae*. Barra = 20 µm.

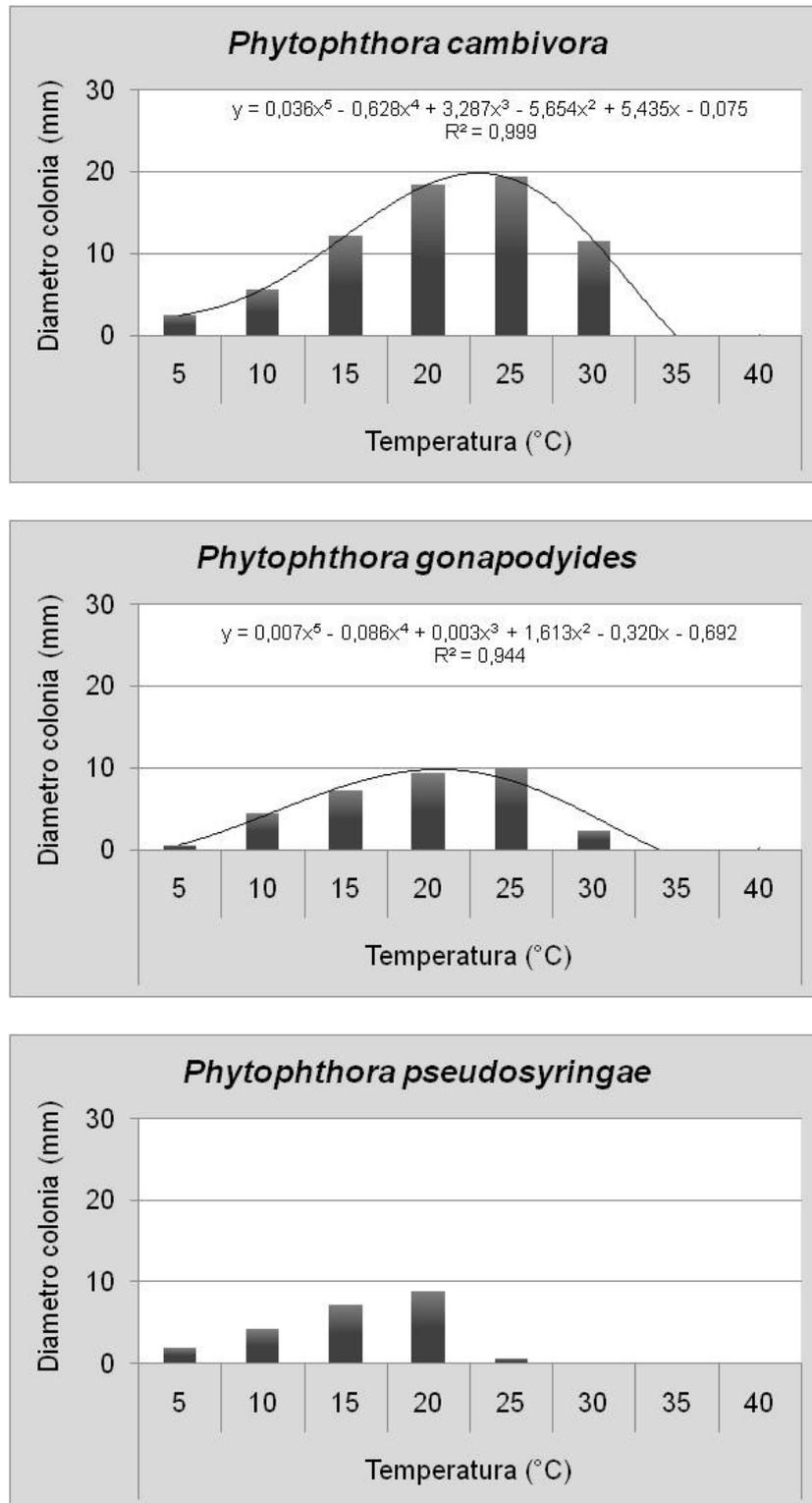


Figura 11. Accrescimento diametrico giornaliero su CA a differenti temperature delle colonie di *Phytophthora cambivora*, *P. gonapodyides* e *P. pseudosyringae*.

5.1.3 Attività patogenetica

Inoculazione tramite ferita su fusto

Tutti i semenzali di castagno inoculati con *P. cambivora* e *P. pseudosyringae* mostravano sintomi 20 giorni dopo l'inoculazione. Entrambe le specie hanno causato sia lesioni necrotiche sul fusto, sia l'avvizzimento delle foglie dei semenzali. Tuttavia, sono emerse differenze statisticamente significative tra le specie in relazione alla lunghezza delle lesioni necrotiche (Fig. 13). L'isolato di *P. cambivora* è risultato il più virulento e ha causato la comparsa di una vasta area necrotica su tutta la circonferenza del fusto (Fig. 12 b). *P. pseudosyringae* ha causato lesioni necrotiche depresse che oltre alla corteccia interessavano anche i tessuti xilematici (Fig. 12 c). I semenzali inoculati con *P. gonapodyides* mostravano solo un piccolo imbrunimento della corteccia limitato al punto di inoculazione e nessun sintomo a livello fogliare. Tutte le specie di *Phytophthora* inoculate sono state re-isolate con successo dai tessuti infetti. I semenzali utilizzati come testimoni sono rimasti asintomatici.

Inoculazione tramite suolo infettato

Anche in questo saggio gli isolati di *P. cambivora* e *P. pseudosyringae* hanno causato necrosi e avvizzimenti un mese dopo l'inoculazione (Fig. 12 a). *P. pseudosyringae* ha causato lesioni necrotiche e depresse a livello del colletto, differenti rispetto a quelle di *P. cambivora* (Fig. 12 d). *P. cambivora* ha confermato una maggiore aggressività rispetto a *P. pseudosyringae*, mentre *P. gonapodyides* è risultata poco aggressiva su castagno (Fig. 14). Tutte le specie di *Phytophthora* saggiate sono state re-isolate con successo dal suolo dei semenzali inoculati. Alla fine della prova le piante testimoni non hanno manifestato nessun sintomo di malattia.

Inoculazione su astoni di castagno

Tutte le specie di *Phytophthora* saggiate causavano lesioni più o meno estese in corrispondenza del punto di inoculazione; solo *P. gonapodyides*

induceva una lesione più limitata (Fig. 12 e, f, g, h, i). Tra gli isolati saggati sono emerse differenze statisticamente significative in relazione alla lunghezza delle lesioni causate (Fig. 15). L'isolato di *P. cinnamomi* è risultato il più aggressivo, causando lesioni mediamente superiori a 280 mm. Tra i due isolati di *P. pseudosyringae* saggati è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa in termini di aggressività: l'isolato sardo è risultato più virulento di quello inglese. Tutte le specie di *Phytophthora* inoculate sono state re-isolate dal margine delle lesioni. Sugli astoni di castagno inoculati con il testimone sono stati osservati degli imbrunimenti, probabilmente dovuti all'ossidazione dei tessuti legnosi in seguito alla ferita.

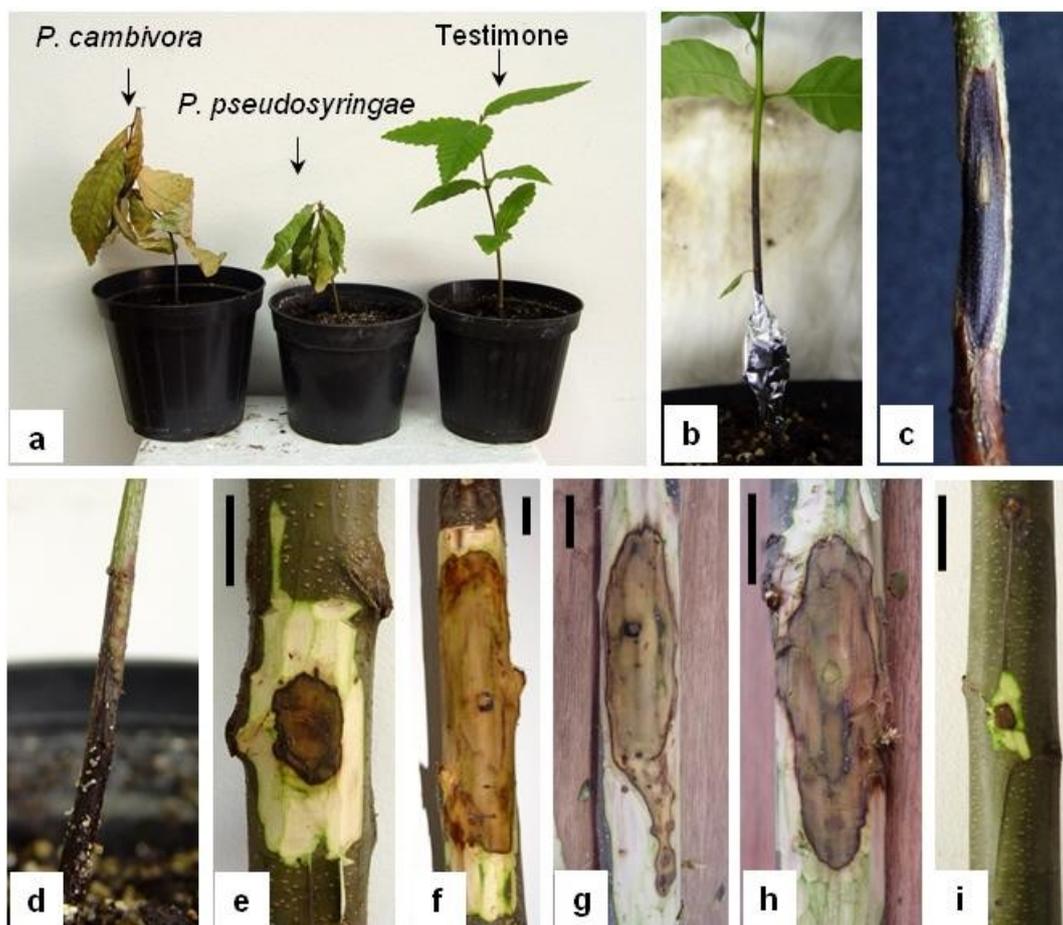


Figura 12. Esito dei saggi di patogenicità su castagno effettuati attraverso: impiego di suolo infettato (a) con particolare di lesioni al colletto causate da *P. pseudosyringae* (d); inoculazione sul fusto con *Phytophthora cambivora* (b) e *P. pseudosyringae* (c); inoculazione di astoni con *P. gonapodyides* (e), *P. cinnamomi* (f), *P. cambivora* (g), *P. pseudosyringae* (h); testimone (i). Barra = 40 mm.

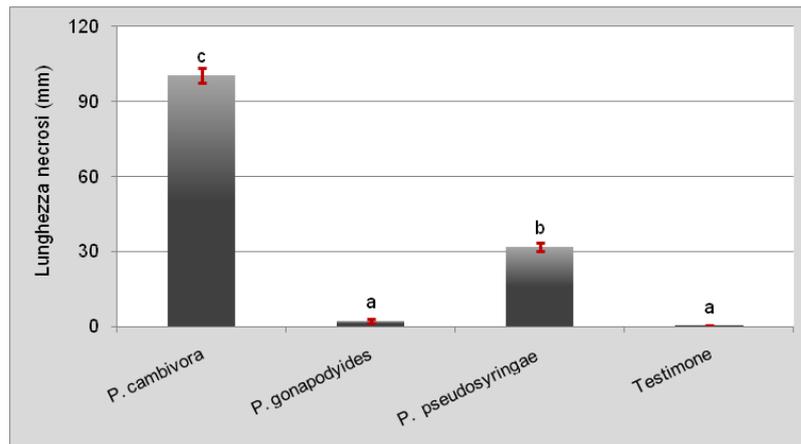


Figura 13. Lunghezza media (mm) delle lesioni causate da specie di *Phytophthora* sul fusto di semenzali di castagno. Istogrammi con lettere uguali non differiscono in modo statisticamente significativo al test LSD per $P \leq 0,05$. La barra verticale rappresenta l'errore standard.

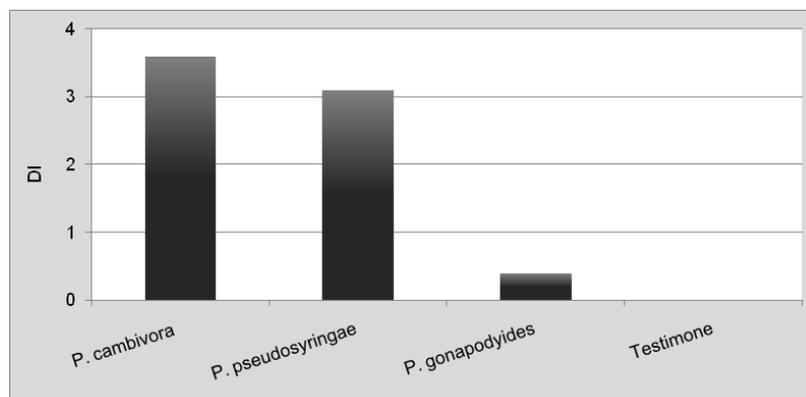


Figura 14. Indice di malattia causata dalle differenti specie di *Phytophthora* su semenzali di castagno inoculati con suolo infetto.

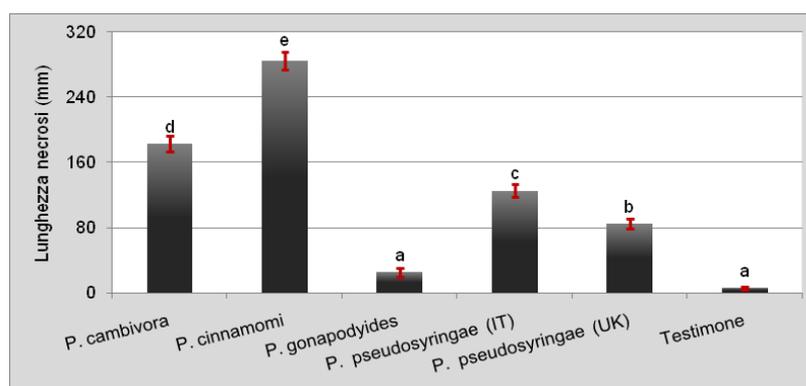


Figura 15. Lunghezza media (mm) delle lesioni necrotiche causate da specie di *Phytophthora* su astoni di castagno. Istogrammi con lettere uguali non differiscono in modo statisticamente significativo al test LSD per $P \leq 0,05$. La barra verticale rappresenta l'errore standard.

5.1.4 Attività fitotossica

I saggi effettuati su recisi di pomodoro hanno evidenziato la presenza di metaboliti secondari fitotossici sia nei filtrati colturali sia negli estratti organici di tutte e tre le specie di *Phytophthora* in esame. I sintomi osservati sui recisi sono descritti nelle tabelle 5 e 6.

I filtrati colturali più attivi sono risultati quelli di *P. cambivora* e di *P. pseudosyringae* che hanno mostrato attività fino alla diluizione più alta saggiata (10^{-2}). In entrambi i casi sono stati osservati sintomi di avvizzimento dei recisi di pomodoro entro 24 ore dal trattamento (Fig. 16 a).

Inoltre, dai risultati ottenuti si evince, anche se in misura diversa, un'influenza del substrato di crescita nell'espressione dei metaboliti fitotossici. Infatti, i filtrati di *P. cambivora* cresciuta sul substrato "A" sono risultati più attivi di quelli ottenuti allevando tale specie sul substrato "B". Nel primo caso, le piantine trattate con il filtrato colturale diluito serialmente fino a 10^{-2} morivano entro 24 ore dal trattamento (Fig. 16 c); nel secondo caso e nelle stesse condizioni sperimentali, le piantine presentavano solo lievi sintomi di avvizzimento. Risultati simili sono stati osservati anche con i filtrati di *P. gonapodyides* che, oltre ad indurre la morte dei recisi, determinavano anche la comparsa di sintomi di *stewing* (marciume) sul caule (Fig. 16 b). Tali differenze non sono state osservate in modo così marcato con i filtrati colturali di *P. pseudosyringae*.

I risultati ottenuti dall'estrazione dei filtrati colturali con acetato di etile hanno consentito di evidenziare la presenza di metaboliti lipofili tossici nei filtrati colturali di *P. cambivora* e *P. pseudosyringae*. Gli estratti organici di queste due specie sono risultati attivi sui recisi di pomodoro entro 48 ore dal trattamento alla concentrazione di 0,5 e 1,0 mg/ml. Alla concentrazione più bassa di 0,25 mg/ml, sintomi di avvizzimento e/o di *stewing* sono stati osservati solo con gli estratti ottenuti previa correzione del pH iniziale del filtrato colturale ottenuto dal substrato "B". Sarebbe pertanto che la modifica del pH del filtrato abbia aumentato l'efficienza della procedura di estrazione.

Per quanto riguarda *P. pseudosyringae* è stato valutato anche l'effetto tossico dell'esausto acquoso, non diluito e diluito serialmente fino a 10^{-2} , sulle piantine recise di pomodoro. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza la presenza di fattori fitotossici idrosolubili nella fase acquosa dopo l'estrazione con l'acetato di etile. Le piantine morivano entro 24 ore dal trattamento a tutte le diluizioni saggate (Fig. 16 d).

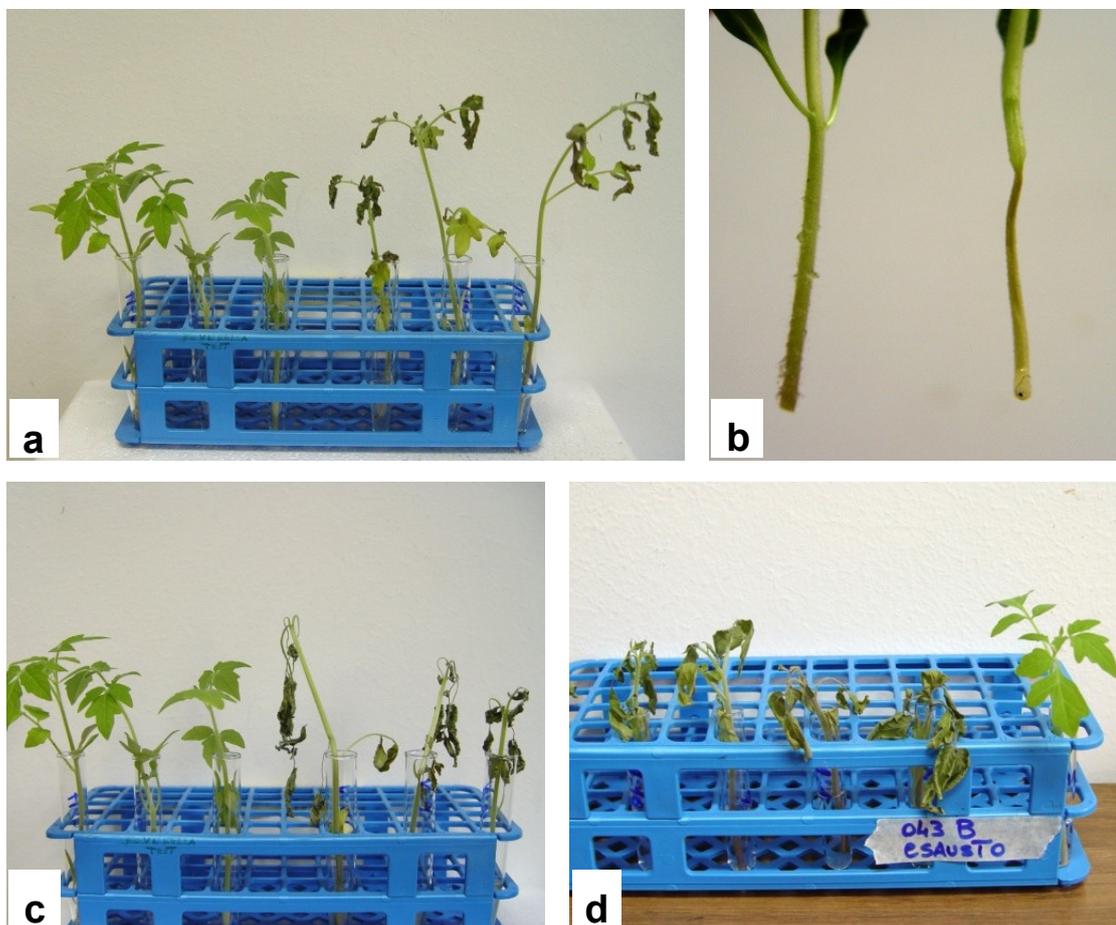


Figura 16. Esempio di effetti tossici dei filtrati culturali delle specie di *Phytophthora* isolate da castagno a 24 ore dal trattamento su recisi di pomodoro: avvizzimento (a), *stewing* (b), morte (c). Tossicità dell'esausto di *Phytophthora pseudosyringae* dopo 24 ore dal trattamento (d).

Tabella 5. Attività tossica su recisi di pomodoro dei filtrati colturali delle specie di *Phytophthora* isolate da castagno, 24 ore dopo il trattamento. ND = Non Diluito.

Isolati	Substrati	Sintomi				
		ND	Diluizione del filtrato colturale			
			1:1	1:4	1:10	1:100
<i>Phytophthora cambivora</i> (PH041)	A	Morte	Morte	Morte	Morte	Avvizzimento
	B	Morte	Avvizzimento lieve	Avvizzimento lieve	Avvizzimento lieve	-
<i>Phytophthora gonapodyides</i> (PH038)	A	Morte e <i>stewing</i>	Morte e <i>stewing</i>	Morte e <i>stewing</i>	Morte	-
	B	Avvizzimento e <i>stewing</i>	Avvizzimento e <i>stewing</i>	-	-	-
<i>Phytophthora pseudosyringae</i> (PH043)	A	Morte	Morte	Avvizzimento	Avvizzimento lieve	-
	B	Morte	Morte	Morte	Morte	Avvizzimento

Tabella 6. Attività tossica su recisi di pomodoro degli estratti organici delle specie di *Phytophthora* isolate da castagno, 48 ore dopo il trattamento.

Isolato	Substrato	Sintomi				
		Concentrazione dell'estratto organico			Metanolo	Acqua
		1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml		
<i>Phytophthora cambivora</i> (PH041)	A	Morte e <i>stewing</i>	Avvizzimento e <i>stewing</i>	-	-	-
	A corretto	Avvizzimento e <i>stewing</i>	-	-	-	-
	B	Avvizzimento e <i>stewing</i>	<i>Stewing</i>	-	-	-
	B corretto	Morte e <i>stewing</i>	Avvizzimento e <i>stewing</i>	Avvizzimento e <i>stewing</i>	-	-
<i>Phytophthora pseudosyringae</i> (PH043)	A	Avvizzimento e <i>stewing</i>	<i>Stewing</i>	-	-	-
	A corretto	Avvizzimento e <i>stewing</i>	<i>Stewing</i>	-	-	-
	B	<i>Stewing</i>	-	-	-	-
	B corretto	Avvizzimento e <i>stewing</i>	Avvizzimento e <i>stewing</i>	<i>Stewing</i>	-	-

5.2 Indagine nei querceti

5.2.1 Stato sanitario dei popolamenti

Dai sopralluoghi effettuati è emerso che un'estesa area boschiva dell'Isola di Caprera, di rilevante valenza naturalistica, popolata da alberi di leccio (*Quercus ilex*) 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, mostrano sintomi di un graduale declino vegetativo con disseccamenti più o meno ampi della chioma e sviluppo eccessivo di rami epicormici nel fusto e nelle branche (Fig. 17 a). Inoltre, non è infrequente riscontrare piante vigorose che hanno subito una morte repentina non associata a sintomi specifici di natura parassitaria a livello di chioma o fusto (Fig. 17 b). Le piante deperenti spesso presentano nelle grosse radici, sul colletto e/o lungo il fusto, aree depresse più o meno vaste con cancri, spesso umidi per l'emissione di essudati brunastri (Fig. 17 c, d). Altresì è stata riscontrata la presenza di numerosi giovani polloni disseccati (Fig. 17 e) e/o ceppaie che non si sono rigenerate, a dimostrazione che gli apparati radicali sono fortemente compromessi o già distrutti e quindi incapaci di generare nuova vegetazione.

Oltre agli alberi di leccio, appaiono interessate da disseccamenti e morie anche molte piante di quercia da sughero (*Quercus suber*) (Fig. 17 f, g) e di altre specie della macchia mediterranea, principalmente corbezzolo (*Arbutus unedo*) e mirto (*Myrtus communis*) (Fig. 17 h, i).

A tale proposito è stato rilevato che i disseccamenti interessano più frequentemente le piante delle varie specie situate lungo i corsi d'acqua e/o i sentieri. Ciò farebbe supporre che il ruscellamento dell'acqua e le attività antropiche possano aver avuto un ruolo importante nella diffusione di eventuali patogeni. In ogni caso, l'elevata frequenza di piante con foglie e frutti disseccati ancora attaccati ai rami, testimonia che la fase epidemica della malattia non è terminata e che il suo andamento è decisamente rapido e devastante.

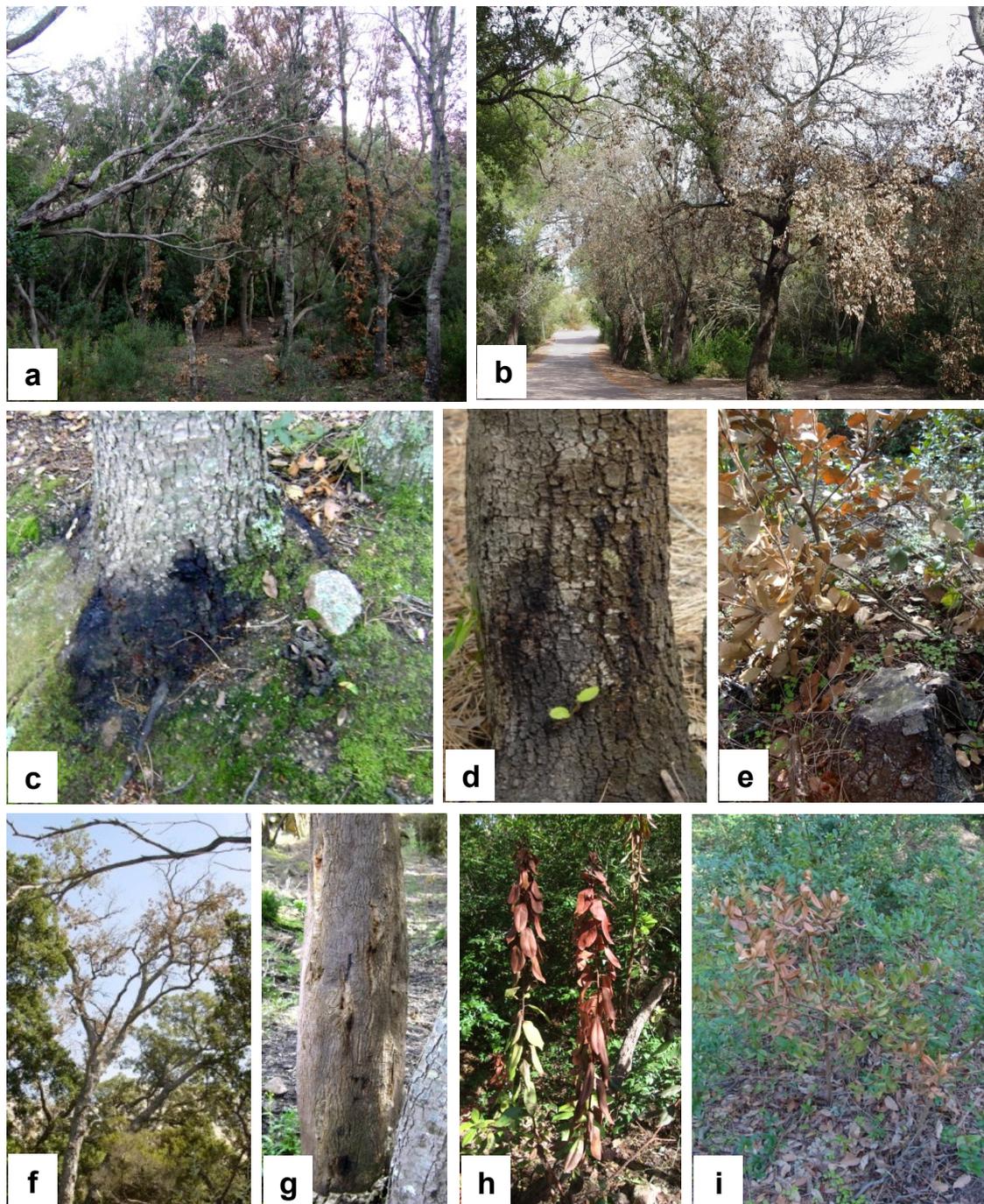


Figura 17. Principali quadri sintomatologici riscontrati su piante di leccio nell'Isola di Caprera: disseccamenti della chioma e presenza di rami epicormici sul fusto (a), morte repentina delle piante (b); essudati al colletto (c) e sul fusto (d); giovani polloni disseccati (e); disseccamenti della chioma (f) ed essudati sul fusto (g) su quercia da sughero; avvizzimento progressivo su corbezzolo (h); disseccamenti della chioma su mirto (i).

I risultati dei rilevamenti effettuati nelle 20 aree di saggio allestite, evidenziano la gravità della situazione fitosanitaria nell'intera area boschiva, sia per l'elevato numero di piante di leccio colpite da "deperimento", sia per l'intensità dei sintomi che le stesse manifestano. In totale sono state monitorate 369 piante di leccio: solo 20 (5,4%) erano asintomatiche, 290 (78,6%) mostravano cancri ed essudati sul colletto e sul fusto, rami epicormici e disseccamenti della chioma, e ben 59 (16%) erano già morte (Tab. 7). In 12 ADS tutte le piante presenti erano deperenti e/o morte.

Tabella 7. Numero di piante di leccio monitorate e relativo stato fitosanitario nelle 20 aree di saggio (ADS) allestite nell'area boschiva dell'Isola di Caprera.

ADS	Numero di piante	Piante asintomatiche (%)	Piante deperenti (%)	Piante morte (%)
1	26	0	100	0
2	20	5	85,0	10,0
3	16	0	87,5	12,5
4	19	10,5	26,9	52,6
5	19	0	57,9	42,1
6	11	0	90,9	9,1
7	22	0	59,1	40,9
8	25	0	92,0	8,0
9	17	11,8	82,3	5,9
10	14	7,1	82,9	0
11	27	25,9	74,1	0
12	10	0	80,0	20,0
13	23	0	87,0	13,0
14	32	0	93,7	6,3
15	6	0	66,7	33,3
16	10	0	80,0	20,0
17	17	0	41,2	58,8
18	21	4,8	90,4	4,8
19	13	38,5	53,8	7,7
20	21	4,8	90,2	4,8
Totale	369	5,4	78,6	16

5.2.2 Isolamento, identificazione e caratterizzazione delle specie di *Phytophthora*

Dagli isolamenti effettuati sui campioni di suolo e di radici prelevati nelle 20 aree di saggio, sono state ottenute diversi isolati di *Phytophthora* che, dopo il trapianto in coltura pura su substrati di crescita a base di PDA e CA, sono stati identificati come: *P. cinnamomi*, *P. cryptogea* e *P. gonapodyides* (Tab. 8).

Tabella 8. Specie di *Phytophthora* isolate dai campioni di suolo e radici prelevati nelle 20 aree di saggio (ADS) allestite nell'area boschiva dell'Isola di Caprera.

ADS	<i>Phytophthora cinnamomi</i>		<i>Phytophthora cryptogea</i>		<i>Phytophthora gonapodyides</i>	
	Radici	Suolo	Radici	Suolo	Radici	Suolo
1	(+)	-	-	(+)	-	(+)
2	(+)	(+)	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	(+)
5	(+)	(+)	-	(+)	-	(+)
6	-	-	-	(+)	-	(+)
7	(+)	(+)	-	(+)	-	(+)
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	(+)
12	(+)	(+)	-	-	-	(+)
13	(+)	(+)	-	-	-	(+)
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	(+)	(+)	-	(+)	-	(+)
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
Totale	7	6	-	5	-	9

Phytophthora cinnamomi

È stata isolata da campioni di suolo e radici in 7 dei 20 siti indagati (Tab. 8). Da rimarcare la presenza di questo patogeno nei siti n. 5, 7 e 12, dove tutte le piante erano sintomatiche e la mortalità molto elevata: oltre il 40%.

Gli isolati di questa specie sviluppano su CA colonie a forma di rosetta (Fig. 18 a), con micelio ricco di *hyphal swelling*. Tutti gli isolati producono abbondanti clamidospore, di forma sferica, a parete liscia, sia in posizione intercalare che terminale (Fig. 18 b). Gli isolati differenziano in coltura liquida, sporangi, non papillati, portati nella parte terminale degli sporangiofori, di forma ovale misuranti $40,3 \pm 6,7 \times 25,4 \pm 2,3 \mu\text{m}$ (media \pm deviazione standard), intervallo di confidenza al 95% $37,6\text{--}43 \times 24,5\text{--}26,4 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di 1,6:1. Tutti gli isolati risultano di tipo A2 e, dopo l'appaiamento in coltura duale con i ceppi tester P904 e P1889, formano oogoni a parete liscia e anteridi anfigini (Fig. 18 c) (Tab. 2). In relazione alle esigenze termiche, le migliori condizioni di sviluppo si osservano tra 25 e 30°C, con *optimum* intorno a 30°C (Fig. 19). La temperatura minima di crescita è di 6°C, mentre la massima di 33°C. L'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi delle sequenze delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA di un isolato rappresentativo. L'analisi BLAST ha mostrato il 99-100% di similarità con le sequenze di *P. cinnamomi* depositate in GenBank (numero di accesso: FM956654 e GU111594).

Phytophthora cryptogea

È stata isolata solo da campioni di suolo prelevati da piante deperenti in 5 dei 20 siti indagati (Tab. 8).

Gli isolati di questa specie mostrano una caratteristica colonia petaloide su CA (Fig. 18 d). Gli sporangi non sono papillati (Fig. 18 e), hanno forma ovoidale e sono persistenti sullo sporangioforo. Essi misurano $49,2 \pm 3,4 \times 30,9 \pm 2,4 \mu\text{m}$ (media \pm deviazione standard), intervallo di confidenza al 95% $47,9\text{--}50,6 \times 29,9\text{--}31,8 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di 1,6:1. Tutti gli isolati sono di tipo A1 e, dopo l'appaiamento in coltura duale con il ceppo tester P542, formano oogoni a parete liscia e anteridi anfigini (Fig. 18 f) (Tab. 2). In relazione alle esigenze termiche, le migliori condizioni di sviluppo si osservano tra 20 e 25°C, con *optimum* intorno a 25°C (Fig. 19). La temperatura minima di crescita è inferiore a 5°C, mentre la massima è di 35°C. L'analisi delle sequenze

nucleotidiche delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA di un isolato rappresentativo ha mostrato il 99-100% di similarità con le sequenze di *P. cryptogea* depositate in GenBank (numero di accesso: GQ463702 e GU191214).

Phytophthora gonapodyides (Già descritta al paragrafo 4.1.2).

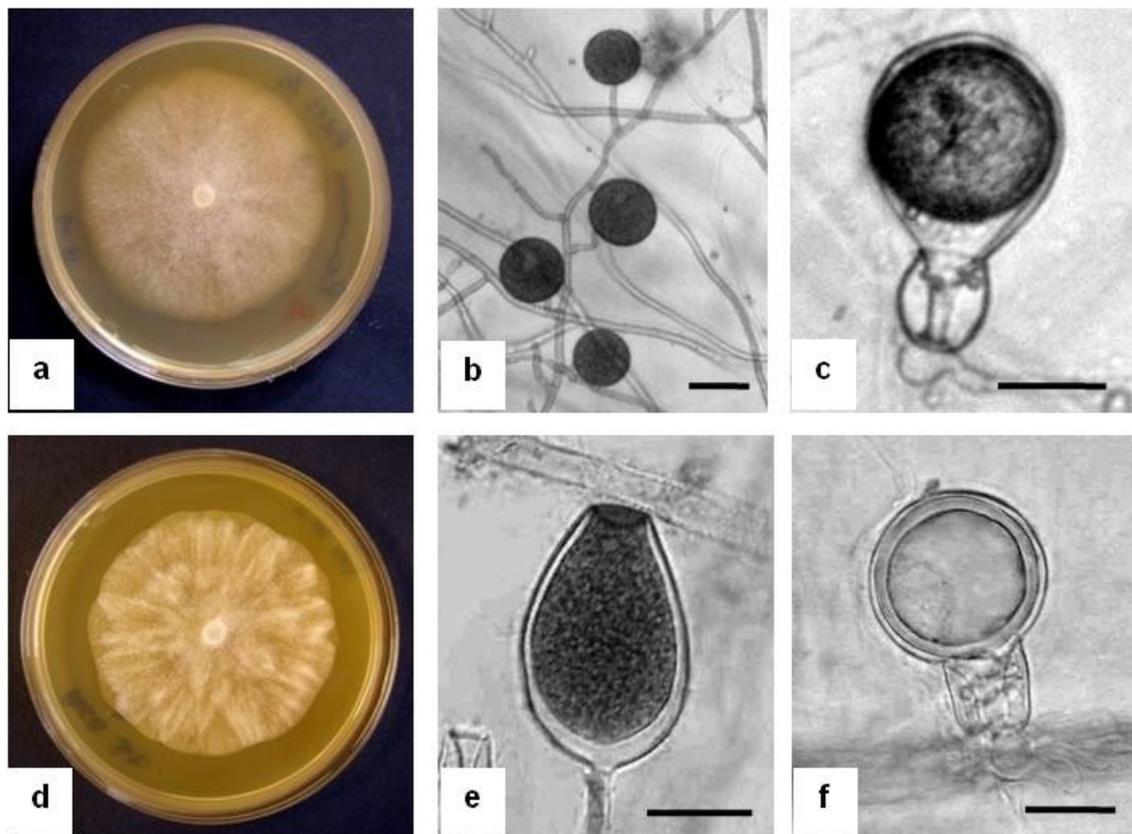


Figura 18. *Phytophthora cinnamomi*: aspetto della colonia su CA (a), clamidospore (b), oogonio con anteridio anfigino osservato in coltura duale con l'isolato tester P904 (c). *P. cryptogea*: aspetto della colonia su CA (d), sporangio non papillato (e), oogonio con anteridio anfigino osservato in coltura duale con l'isolato tester P542 (f). La barra equivale a 20 µm.

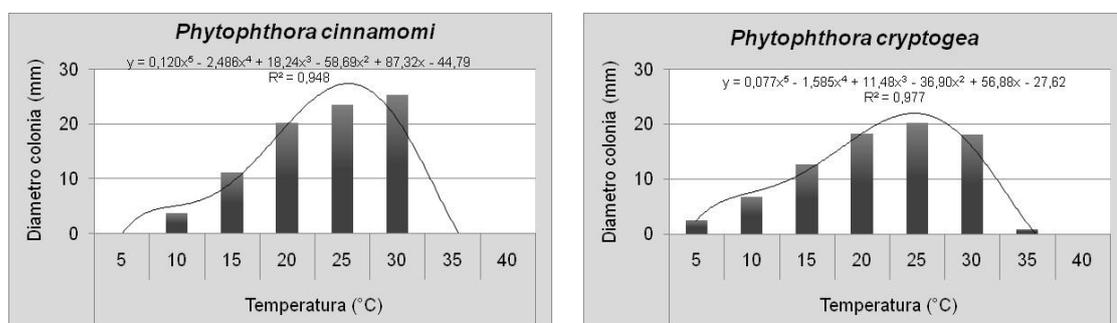


Figura 19. Accrescimento diametrico giornaliero a differenti temperature delle colonie di *Phytophthora cinnamomi* e *P. cryptogea*.

5.3 Sistemi ripari

5.3.1 Stato sanitario dei popolamenti

Durante le indagini effettuate in sistemi ripari ad ontano nero e agrifoglio nella Sardegna centrale e settentrionale sono state riscontrate aree con deperimenti diffusi e moria di piante. In particolare, le piante deperenti di ontano nero mostravano i sintomi di un generale degrado vegetativo, caratterizzato da fogliame verde pallido, microfillia, clorosi e filloptosi, e nei casi più gravi anche dal disseccamento dell'intera chioma, fino alla morte delle piante (Fig. 20 a, b). Lungo il fusto e in particolare a livello del colletto e delle grosse radici erano ben visibili imbrunimenti e fessurazioni della corteccia da cui spesso fuoriuscivano essudati liquidi nerastri (Fig. 20 c, d). Scortecciando in prossimità delle aree necrotiche, a livello del cambio erano presenti delle aree scure dal margine ben definito (Fig. 20 e, f). Non sempre, però, le piante deperenti mostravano sintomi specifici sul fusto.

Le piante di agrifoglio lungo i corsi d'acqua del massiccio del Gennargentu erano interessate da gravi defogliazioni (Fig. 20 g). Tali sintomi si manifestavano soprattutto durante i periodi piovosi invernali e primaverili. Inizialmente, le piante colpite mostravano nella parte bassa della chioma, foglie con numerose maculature di colore scuro (Fig. 20 h). Spesso le necrosi interessavano la base del picciolo con successivo disseccamento dell'intera foglia (Fig. 20 i). Aree necrotiche simili a quelle osservate sulle foglie erano presenti anche sui giovani rametti. Tali aree spesso evolvevano in cancri di color scuro che durante il periodo estivo assumevano una colorazione rossastra (Fig. 20 l). Le dimensioni dei cancri variavano da pochi centimetri a circa 20 cm di lunghezza; in alcuni casi essi avvolgevano completamente il rametto causando il disseccamento della parte distale e la conseguente caduta delle foglie. Talvolta, lesioni cancerose sono state osservate anche sul fusto e a livello del colletto.

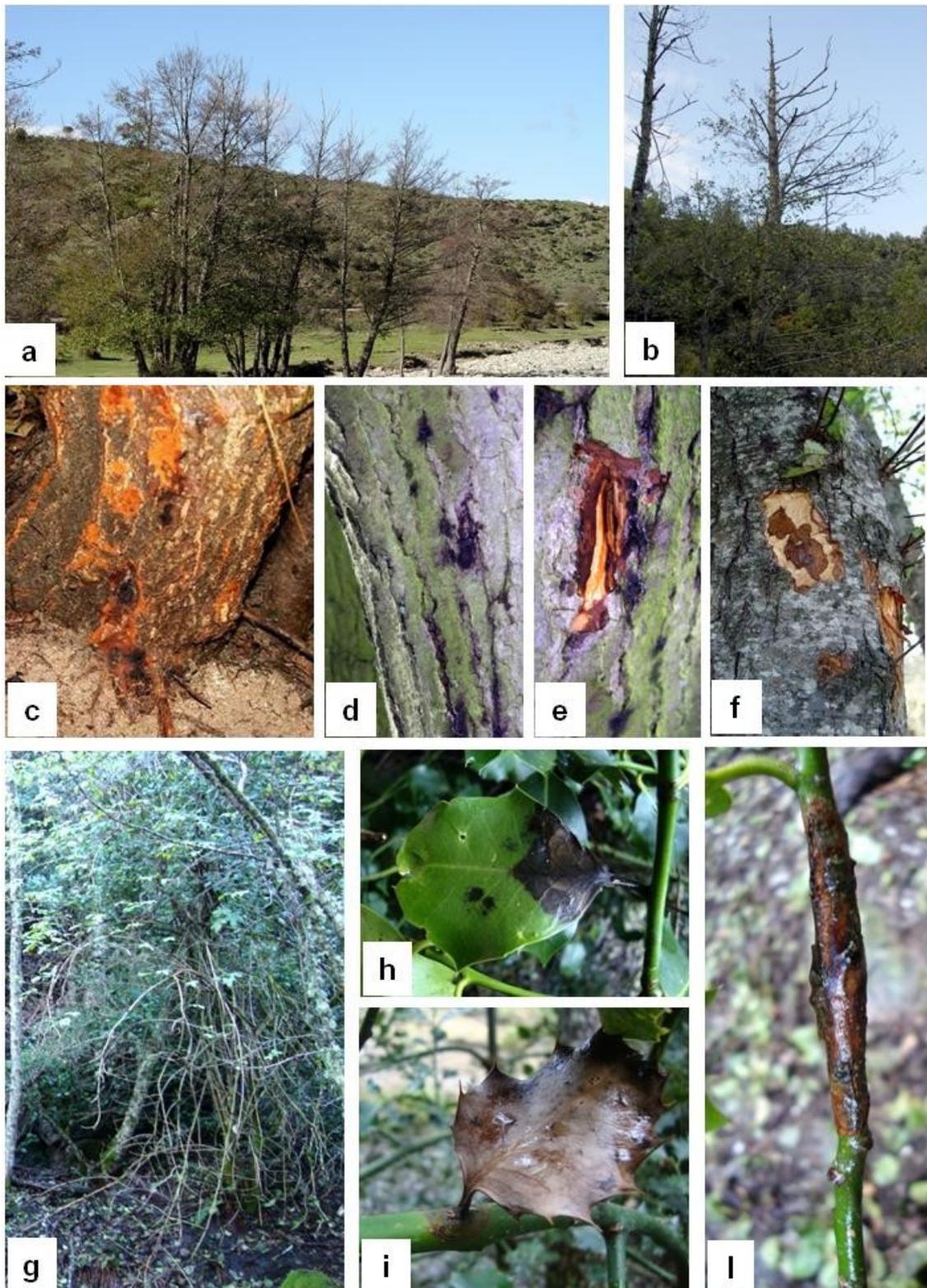


Figura 20. Piante di ontano nero: moria (a); particolare dei disseccamenti della chioma (b); cancri e lesioni con essudati sul colletto (c) e sul fusto (d); necrosi sottocorticali (e, f). Piante di agrifoglio sintomatiche: defogliazione della chioma (g); maculature, necrosi alla base del picciolo e disseccamento delle foglie (h, i); cancro su rametto (l).

5.3.2 Isolamento, identificazione e caratterizzazione delle specie di *Phytophthora*

Dagli isolamenti effettuati con diverse modalità sono state ottenute complessivamente sei specie di *Phytophthora*.

In particolare, dai sistemi ripari ad ontano nero, sono state isolate nei corsi d'acqua, attraverso la tecnica del *baiting* (Reeser *et al.*, 2007), le specie *P. gonapodyides*, *P. taxon salixsoil* e una specie non ancora identificata riportata *Phytophthora* sp. 1. Dai campioni di suolo e radici prelevati da piante deperenti sono state isolate, oltre *P. taxon salixsoil* e *Phytophthora* sp. 1, anche *P. pseudosyringae*. Infine, dai tessuti corticali necrotici del colletto di una pianta deperente nel sito di Bortigiadas è stata isolata un'altra specie non ancora identificata, indicata come *Phytophthora* sp. 2.

Nei sistemi ripari ad agrifoglio, invece, è stata frequentemente isolata la specie *P. ilicis* sia dalle maculature fogliari che dai cancri presenti sui rametti di piante sintomatiche.

Di seguito si riferisce sulle specie di *Phytophthora* non ancora descritte. Per quanto riguarda i caratteri delle altre specie riscontrate: *P. pseudosyringae* e *P. gonapodyides*, si rimanda alle descrizioni riportate rispettivamente nei paragrafi 4.1.2 e 4.2.2.

Phytophthora taxon salixsoil

Gli isolati appartenenti a questo *taxon*, sviluppano su CA colonie a forma di rosetta (Fig. 21 a), molto simili a quella di *P. gonapodyides*. Tutti gli isolati differenziano sporangi di forma ovale, non-papillati (Fig. 21 b), con abbondanti proliferazioni interne ed esterne (Fig. 21 c). Essi misurano $42,2 \pm 6 \times 32,2 \pm 3,7$ μm (media \pm deviazione standard), intervallo di confidenza al 95% $39,8\text{--}44,6 \times 30,8\text{--}33,7$ μm , con un rapporto lunghezza/larghezza di 1,3. Analogamente a *P. gonapodyides* anche gli isolati di questa specie non differenziano oogoni in coltura duale con i ceppi di *mating type* noto. In relazione alle esigenze termiche è stato osservato un *optimum* di 30°C, e una temperatura massima superiore a 35°C (Fig. 22). L'identificazione degli isolati è stata confermata

dall'analisi delle sequenze delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA di un isolato rappresentativo. L'analisi BLAST mostra il 99% di similarità con le sequenze di *P. taxon salixsoil* depositate in GenBank (numero di accesso: EU240177 e AF266793).

***Phytophthora* sp. 1**

Gli isolati di questa specie su CA formano una colonia cotonosa con micelio aereo (Fig. 21 d), caratterizzato da ife ramificate sulle quali spesso sono presenti *hyphal swelling*. Gli sporangi sono prodotti direttamente in piastra; sono semi-papillati, di forma ovoidale e/o obiforme (Fig. 21 e), occasionalmente decidui con un corto pedicello (<5 μm). Le loro dimensioni sono: $48,4 \pm 6 \times 33,3 \pm 1,7 \mu\text{m}$ (media \pm deviazione standard), intervallo di confidenza al 95% $46\text{--}50,8 \times 32,6\text{--}34 \mu\text{m}$, con rapporto lunghezza/larghezza di 1,5:1. Tutti gli isolati in coltura singola producono su CA oogoni sub-sferici con parete liscia e diametro variabile da 19 a 28 μm , con oospore plerotiche e anteridi paragini (Fig. 21 f). La temperatura ottimale per la crescita è prossima a 20°C, la minima inferiore a 5°C e la massima 26°C (Fig. 22). Su base morfologica non è stato possibile identificare a livello specifico gli isolati di questa specie. Analogamente, anche l'analisi delle sequenze delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA non ha consentito un'identificazione certa. Le sequenze ottenute da un isolato rappresentativo mostrano una similarità pari al 98% con le sequenze di isolati di *P. pseudosyringae* e *P. nemerosa* presenti in GenBank (numero di accesso: EU074793 e DQ275187). Pertanto, si è preferito indicare la specie in esame come *Phytophthora* sp. 1. Attualmente sono in corso ulteriori indagini a livello morfologico, molecolare e patogenetico al fine di stabilire l'esatta natura di questa specie e l'effettivo ruolo che la stessa svolge nella moria dell'ontano.

***Phytophthora* sp. 2**

Questo isolato su CA forma colonie costituite da un micelio uniforme e radente (Fig. 21 g). Gli sporangi prodotti abbondantemente in coltura liquida, non sono papillati e hanno forma ellissoidale (Fig. 21 h). Le loro dimensioni

sono: $54 \pm 9,3 \times 34,1 \pm 5,3 \mu\text{m}$ (media \pm deviazione standard), intervallo di confidenza al 95% $50,2\text{--}57,7 \times 32\text{--}36,2 \mu\text{m}$, con rapporto lunghezza/larghezza di 1,6:1. Dopo circa 6 giorni in piastra producono oogoni ornamentati con anteridi anfigini bicellulari (Fig. 21 i), simili a quelli di *P. cambivora*. Gli oogoni sono molto variabili in forma e dimensioni ($\varnothing 30\text{--}50 \mu\text{m}$). Inoltre un'elevata percentuale di oogoni abortiscono. In relazione alle esigenze termiche, l'*optimum* è intorno a 25°C , e la temperatura massima è circa 30°C (Fig. 22). I dati sui caratteri morfologici e sulle esigenze termiche dell'isolato esaminato concordano con i dati riportati in letteratura per *Phytophthora alni* (Brasier *et al.*, 2004). Tuttavia, vista l'elevata variabilità morfologica di questa specie "ibrida", per la quale sono state descritte tre sub-specie: *P. alni* subsp. *alni*, *P. alni* subsp. *uniformis* e *P. alni* subsp. *multiformis*, si rendono necessarie ulteriori indagini a livello molecolare per una sua corretta identificazione. A tal proposito, recentemente sono stati sviluppati *primers* specifici in grado di discriminare gli isolati appartenenti alle tre sub-specie (Loos *et al.*, 2005).

Phytophthora ilicis

Gli isolati formano su CA colonie leggermente petaloidi (Fig. 21 l) con micelio aereo limitato e ife ramificate. Gli sporangi formati in coltura solida, sono prodotti su ife sporangiofore in modo simpodiale; sono semipapillati, di forma ovoidale (Fig. 21 m) e decidui (pedicelli da 5 a $15 \mu\text{m}$ di lunghezza). Le loro dimensioni sono di $42 \pm 5,2 \times 25,1 \pm 4 \mu\text{m}$ (media \pm deviazione standard), intervallo di confidenza al 95% $40\text{--}44,1 \times 23,5\text{--}26,8 \mu\text{m}$, con rapporto lunghezza/larghezza di 1,7. Gli isolati producono oogoni in coltura singola con anteridi anfigini (Fig. 21 n). Le dimensioni medie degli oogoni sono di $27,5 \mu\text{m}$ e delle oospore di $21,5 \mu\text{m}$. In relazione alle esigenze termiche, l'*optimum* è di 20°C , la temperatura massima di circa 25°C e la minima inferiore a 5°C (Fig. 22). L'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi delle sequenze delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA di un isolato rappresentativo. L'analisi BLAST mostra il 100% di similarità con le sequenze di *P. ilicis* depositate in GenBank (numero di accesso: GU259134 e FJ801947).

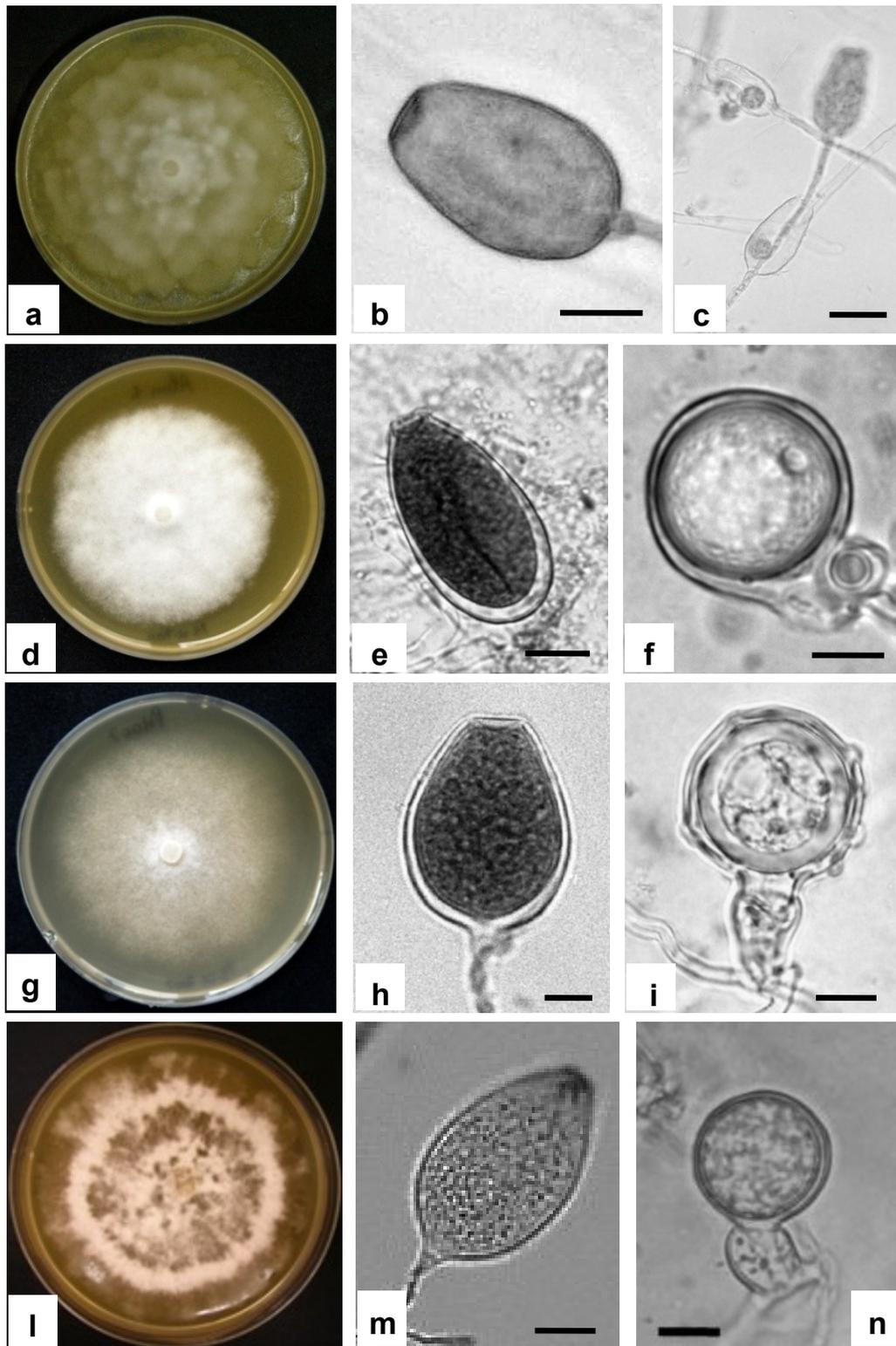


Figura 21. *Phytophthora taxon salixsoil*: colonia su CA (a), sporangio non papillato (b) e proliferazione interna (c); *Phytophthora* sp.1: colonia su CA (d), sporangio semipapillato (e) e oogonio paragino (f); *Phytophthora* sp.2: colonia su CA (g), sporangio non papillato (h) e oogonio ornamentato (i); *Phytophthora ilicis*: colonia su CA (l), sporangio semipapillato (m) e oogonio anfigino (n). Barra = 20 μ m.

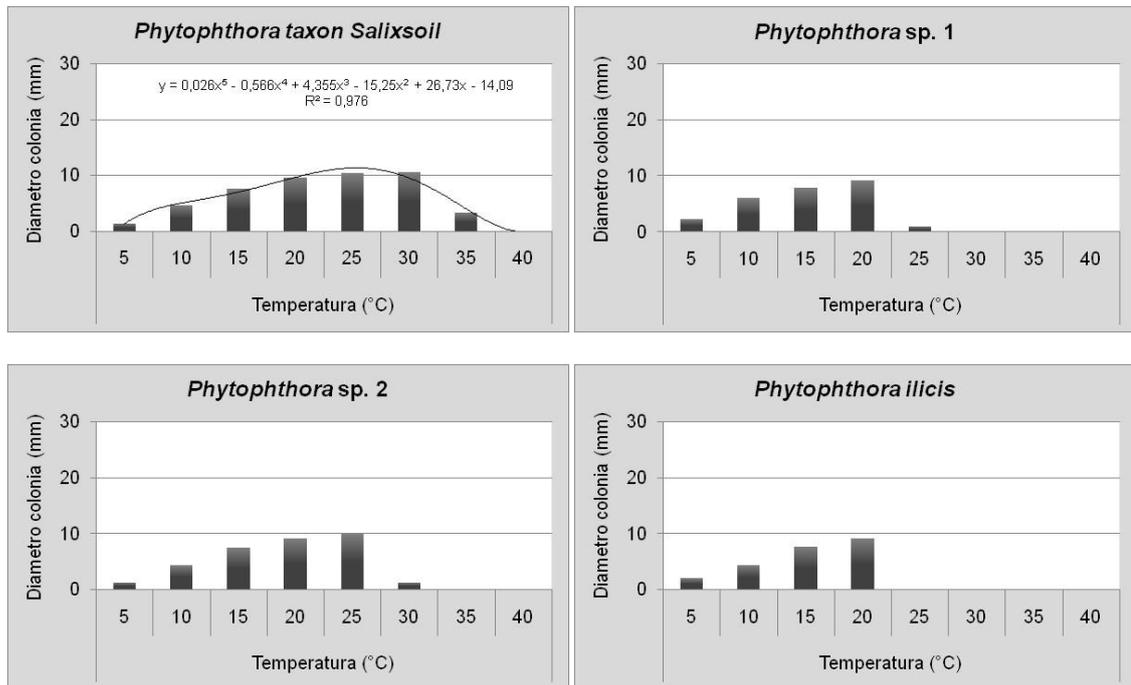


Figura 22. Accrescimento diametrico giornaliero su CA a differenti temperature delle colonie di *Phytophthora taxon salixsoil*, *Phytophthora sp. 1*, *Phytophthora sp. 2* e *Phytophthora ilicis*.

5.4 Vivai forestali

5.4.1 Stato sanitario dei popolamenti

I sopralluoghi effettuati nei due vivai forestali di montagna, in agro di Bono e di Sorgono, e in quello di pianura in agro di Oristano, hanno consentito di rilevare la presenza di gravi problemi sanitari, verosimilmente causati da attacchi di *Phytophthora* spp., su diverse specie vegetali coltivate sia in piena terra sia in vaso.

In particolare, nei vivai di montagna sono stati riscontrati attacchi gravi su castagno (*Castanea sativa*), noce (*Juglans regia*), leccio (*Quercus ilex*), tasso (*Taxus baccata*) e tuia (*Thuja occidentalis*). Tra questi assume rilevanza una moria diffusa di semenzali di tasso in entrambi i vivai (Fig. 23 a): le piante colpite oltre al disseccamento della parte epigea presentavano spesso un'evidente riduzione dell'apparato radicale. Altrettanto gravi sono apparsi i sintomi osservati su castagno e noce, sia a livello di chioma: giallume, microfillia e disseccamenti più o meno estesi (Fig. 23 b, c), sia a livello di colletto e radici per la presenza di estese aree necrotiche e, soprattutto, la perdita completa del capillizio radicale.

Appare importante sottolineare che sintomi tipici di "mal dell'inchiostro" osservati su semenzali di castagno coltivati nel vivaio ubicato in agro di Bono, sono stati riscontrati anche nelle piante di un castagneto confinante al vivaio stesso (Fig. 23 d, e).

Nel vivaio forestale di Oristano sono state osservate numerose piante di specie caratteristiche della macchia mediterranea, quali: corbezzolo (*Arbutus unedo*), lavanda (*Lavandula* sp.), leccio (*Quercus ilex*), lentisco (*Pistacia lentiscus*), mirto (*Myrtus communis*) e rosmarino (*Rosmarinus officinalis*) in condizioni vegetative precarie. Le piante mostravano fenomeni di appassimento, ovvero avvizzimento e disseccamento delle porzioni epigee (Fig. 23 f). Nei casi più gravi si osservava la completa defogliazione delle piante (Fig. 23 g) e la presenza di imbrunimenti e marciumi di varia estensione sulle radici e/o sul colletto (Fig. 23 h).

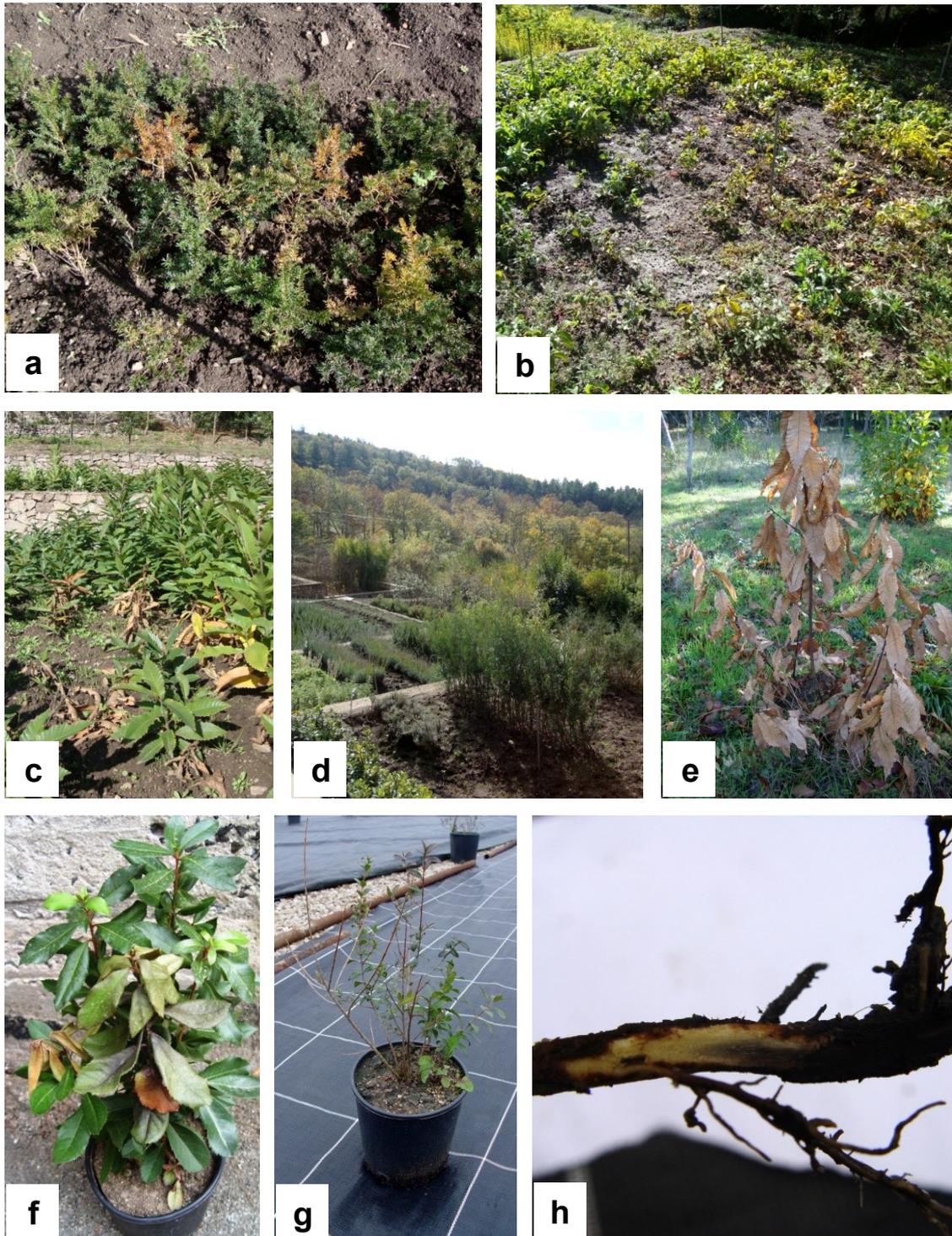


Figura 23. Sintomi riscontrati nei vivai forestali: moria di semenzali di tasso (a) e di noce (b); disseccamenti di piantine di castagno (c); castagneto deperente adiacente al vivaio (d); particolare del castagneto con giovani polloni disseccati (e); pianta di corbezzolo con sintomi di avvizzimento sulla chioma (f); defogliazione (g) e necrosi a livello del colletto (h) di pianta di mirto.

5.4.2 Isolamento, identificazione e caratterizzazione delle specie di *Phytophthora*

Dalle radici e/o dal colletto e dai campioni di suolo prelevati in corrispondenza delle piante sintomatiche sono state isolate diverse specie di *Phytophthora* (Tab. 9).

Sulla base dei caratteri morfologici e di crescita alle diverse temperature (Tab. 10), le specie isolate sono state identificate come: *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. cinnamomi* var. *parvispora*, *P. cryptogea*, *P. nicotianae*, *P. taxon niederhauserii*.

Tabella 9. Specie di *Phytophthora* isolate da differenti piante ospiti nei vivai forestali.

Ospite	Nome comune	Patogeno
<i>Arbutus unedo</i>	Corbezzolo	<i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>
<i>Castanea sativa</i>	Castagno	<i>P. cinnamomi</i> ; <i>P. cambivora</i>
<i>Juglans regia</i>	Noce	<i>P. cinnamomi</i> ; <i>P. cambivora</i>
<i>Lavandula</i> sp.	Lavanda	<i>P. nicotianae</i>
<i>Myrtus communis</i>	Mirto comune	<i>P. nicotianae</i>
<i>Pistacia lentiscus</i>	Lentisco	<i>P. taxon niederhauserii</i>
<i>Quercus ilex</i>	Leccio	<i>P. cinnamomi</i>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosmarino	<i>P. cryptogea</i>
<i>Taxus baccata</i>	Tasso	<i>P. cinnamomi</i>
<i>Thuja occidentalis</i>	Tuia	<i>P. cinnamomi</i>

Tabella 10. Caratteristiche morfo-colturali delle specie di *Phytophthora* isolate.

	Gruppo tassonomico	Sporangi					Anteridi		Oogoni		Temperature cardinali		
		Clamidospore	Omotallia	Eterotallia	Papillati	Semi-papillati	Non papillati	Amfigini	Paragini	Ornati	Lisci	Minima	Ottimale
<i>P. cambivora</i>	VI	-	+			+	+		+		2	22-24	32
<i>P. cinnamomi</i>	VI	+	+			+	+			+	5	28-30	33
<i>P. cinn. var. parvispora</i>	VI	+	+			+	+			+	10	28-30	37
<i>P. cryptogea</i>	VI	-	+			+	+			+	<1	20-25	35
<i>P. nicotianae</i>	II	-	+	+			+			+	5	27-32	37
<i>P. taxon niederhauserii</i>	-	-	+			+	+			+	10	30	37

Phytophthora cambivora

È stata isolata da semenzali di castagno e di noce. La sua descrizione è stata già riportata al paragrafo 4.1.2.

Phytophthora cinnamomi

È la specie più diffusa in vivaio. È stata isolata da semenzali di castagno, noce, leccio, tasso e tuia. Inoltre è stata isolata anche da piante di castagno sintomatiche situate nel castagneto confinante al vivaio. La sua descrizione è stata già riportata al paragrafo 4.2.2.

Phytophthora cryptogea

Anche questa specie è stata già descritta al paragrafo 4.2.2.

Phytophthora cinnamomi* var. *parvispora

P. cinnamomi var. *parvispora* è stata isolata da campioni di suolo e radice di piante di corbezzolo allevate in vaso. Gli isolati di questa specie formano su CA colonie stellate con micelio aereo abbondante (Fig. 24 a). Il micelio è di forma coralloide con numerose *hyphal swelling* in posizione intercalare e terminale (Fig. 24 d). Tutti gli isolati producono abbondanti clamidospore, di forma sferica, a parete liscia, misuranti da 16 a 43 μm (Fig. 24 c). Gli isolati differenziano in coltura liquida sporangi non papillati (Fig. 24 b), di forma ovale, misuranti $33,3 \pm 3,8 \times 23 \pm 2,1 \mu\text{m}$ (media \pm deviazione standard), intervallo di confidenza al 95% $31,8\text{--}34,8 \times 22,1\text{--}23,8 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di 1,4:1. Tutti gli isolati sono di tipo A2 e formano oogoni a parete liscia e anteridi anfigini dopo l'appaiamento in coltura duale con i ceppi tester STEU6265, P904 e P1889 (Tab. 2). In relazione alle esigenze termiche, le migliori condizioni di sviluppo sono osservate tra 25 e 30°C, con *optimum* intorno a 30°C. La temperatura minima di crescita è inferiore a 5°C, mentre la massima superiore a 35°C (Fig. 25). L'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi delle sequenze delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA di un

isolato rappresentativo. L'analisi BLAST mostra il 99-100% di similarità con le sequenze di *P. cinnamomi* var. *parvispora* depositate in GenBank (numero di accesso: GQ388261 e GU191211). Le sequenze delle regioni ITS di un ceppo rappresentativo ottenuto in questo studio è stato depositato in GenBank (numero di accesso: GU460376). I dati morfo-colturali e molecolari di questa specie sono stati comparati sia con isolati di *P. cinnamomi* sia con altri ceppi di *P. cinnamomi* var. *parvispora* isolati in Italia (PCVP SI) e Sud-Africa (PCVP SAF). Dai risultati ottenuti sono emerse differenze sostanziali con *P. cinnamomi*, tanto da far supporre che tale varietà possa essere una specie bene distinta.

Phytophthora nicotianae

Tale specie è stata frequentemente isolata da campioni di suolo e radice di piante di lavanda, mirto e rosmarino allevate in vaso. Gli isolati ottenuti formano su CA colonie a rosetta con micelio aereo abbondante (Fig. 24 l). Tutti gli isolati producono abbondanti clamidospore, di forma sferica, a parete liscia. Gli sporangi formati in piastra si presentano papillati (Fig. 24 m), di forma ovale e misurano $55,4 \pm 4 \times 36,1 \pm 2,8 \mu\text{m}$ (media \pm deviazione standard), intervallo di confidenza al 95% $53,7\text{--}57 \times 34,9\text{--}37,2 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di 1,5:1. Tutti gli isolati sono di tipo A2 e, dopo l'appaiamento in coltura duale con il ceppo tester P537 (Tab. 2), formano oogoni a parete liscia e anteridi anfigini (Fig. 24 n). In relazione alle esigenze termiche, l'*optimum* di crescita è di 30°C, la temperatura minima di 5°C (Fig. 25). Il limite termico superiore è compreso tra 35 e 40°C. A quest'ultima temperatura tale specie rimane vitale e riprende a svilupparsi non appena viene trasferita in termostato a 25°C. L'identificazione degli isolati è stata confermata dall'analisi delle sequenze delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA di un isolato rappresentativo. L'analisi BLAST mostra il 100% di similarità con le sequenze di *P. nicotianae* depositate in GenBank (numero di accesso: FN430681 e GU902246).

Phytophthora taxon niederhauserii

P. taxon niederhauserii è stata isolata da campioni di suolo e radice di piante di lentisco allevate in vaso. Gli isolati di questa specie formano su CA colonie stellate con micelio aereo abbondante (Fig. 24 g). Il micelio si presenta di forma coralloide e con numerose *hyphal swelling*. In tutti gli isolati ottenuti non sono state osservate clamidospore. Gli isolati in coltura liquida differenziano già dopo 12 ore numerosi sporangi. Essi non sono papillati, hanno forma ellissoidale, sono allungati e con un evidente restringimento alla base (Fig. 24 h) possono proliferare sia internamente sia esternamente (Fig. 24 e, f) e misurano: $80,5 \pm 10,1 \times 39,3 \pm 5,7 \mu\text{m}$ (media \pm deviazione standard), intervallo di confidenza al 95% $76,5\text{--}84,6 \times 37\text{--}41,6 \mu\text{m}$, con un rapporto lunghezza/larghezza di 2:1. Tutti gli isolati sono di tipo A2 e, dopo l'appaiamento in coltura duale con i ceppi tester P537, P540, P904 e P1889 (Tab. 2), formano oogoni a parete liscia e anteridi anfigini (Fig. 24 i). In relazione alle esigenze termiche, l'*optimum* di crescita è di 30°C, la temperatura minima di 5°C (Fig. 25). Il limite termico superiore è compreso tra 35 e 40°C. A quest'ultima temperatura tale specie, analogamente a *P. nicotianae*, rimane vitale e riprende a svilupparsi non appena viene trasferita in termostato a 25°C. L'identificazione degli isolati è confermata dall'analisi delle sequenze delle regioni ITS1 e ITS2 dell'rDNA di un isolato rappresentativo. L'analisi BLAST mostra il 100% di similarità con le sequenze di *P. taxon niederhauserii* depositate in GenBank (numero di accesso: GQ848201 e EU244850). Le sequenze delle regioni ITS di un ceppo rappresentativo ottenuto in questo studio è stato depositato in GenBank (numero di accesso: GU119914).

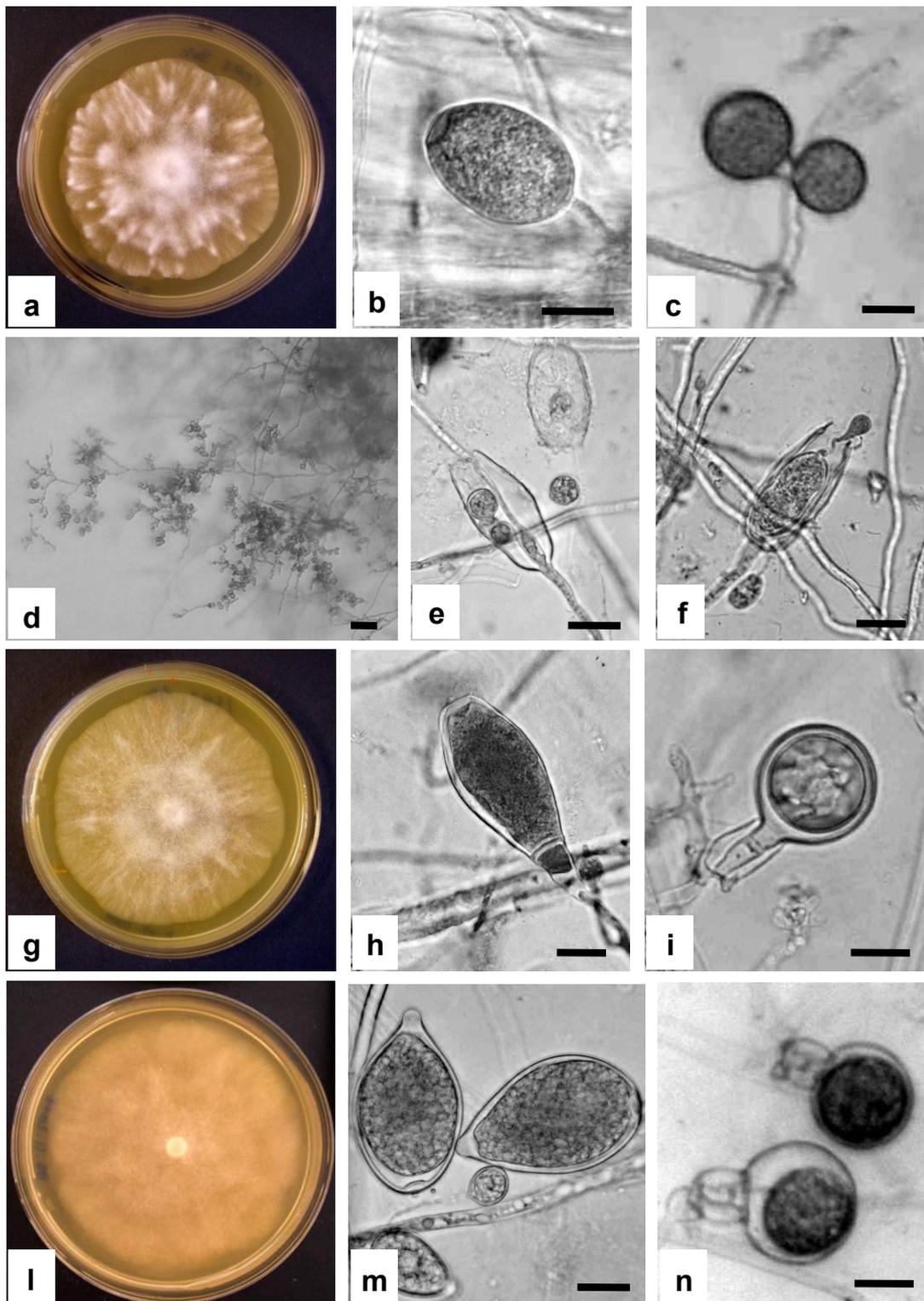


Figura 24. *Phytophthora cinnamomi* var. *parvispora*: colonia su CA (a), sporangio non-papillato (b), clamidospore (c), e micelio coralloide (d); *P. taxon niederhauserii*: proliferazione interna degli sporangia (e), sporangio "nested" con rilascio delle zoospore (f), colonia su CA (g), sporangio non papillato (h) e ogoonio anfigino osservato in coltura duale con l'isolato tester P537 (i); *P. nicotianae*: colonia su CA (l), sporangia papillati (m) e oogoni con anteridi anfigini osservati in coltura duale con l'isolato tester P537 (n). Barra = 20 µm.

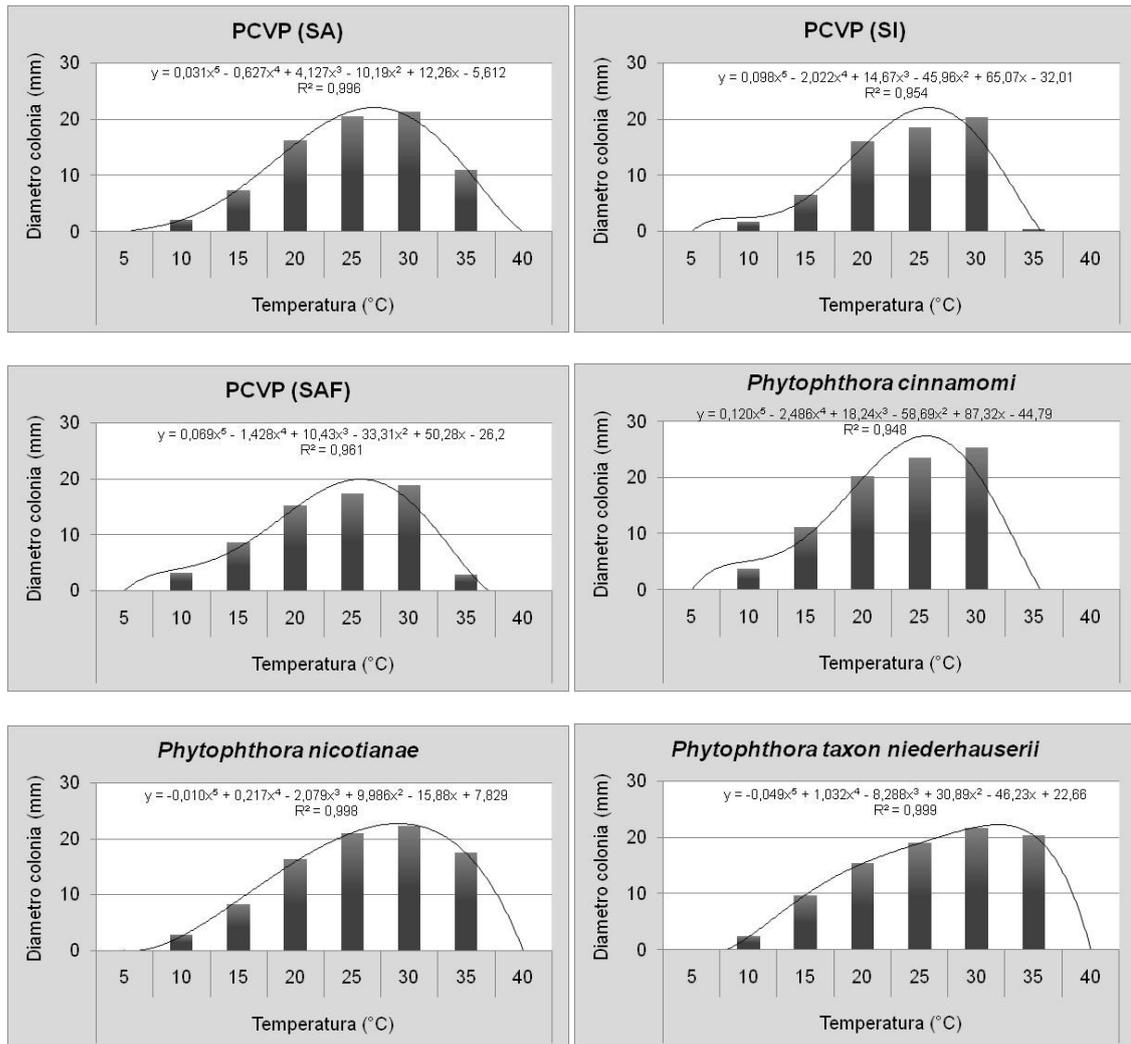


Figura 25. Accrescimento diametrico giornaliero su CA a differenti temperature delle colonie di *Phytophthora cinnamomi* var. *parvispora* (PCVP) (SA = isolato sardo), *P. cinnamomi* var. *parvispora* (PCVP) (SI = isolato siciliano), *P. cinnamomi* var. *parvispora* (PCVP) (SI = isolato sudafricano), *P. cinnamomi*, *P. nicotianae* e *P. taxon niederhauserii*.

5.4.3 Patogenicità delle specie di *Phytophthora* isolate

Tutti i semenzali di corbezzolo e lentisco inoculati nel fusto, rispettivamente con *P. cinnamomi* var. *parvispora* e *P. taxon niederhauserii*, mostravano sintomi un mese dopo l'inoculazione (Fig. 26 a, b). Entrambe le specie hanno causato lesioni necrotiche sul fusto e indotto la morte dei semenzali.

Dall'esame dei risultati ottenuti sono emerse differenze statisticamente significative in merito alla lunghezza delle lesioni necrotiche causate dalle due specie di *Phytophthora* nei semenzali rispetto alle piante testimoni (Fig. 27). Entrambe le specie di *Phytophthora* inoculate sono state re-isolate con successo dai tessuti infettati, soddisfacendo in tal modo i Postulati Koch.

La virulenza dei tre isolati di *P. cinnamomi* var. *parvispora* utilizzati in questo studio: PCVP (SA), PCVP (SI) e PCVP (SAF) è stata saggiata anche attraverso l'inoculazione di astoni di castagno.

Dai risultati ottenuti è emerso che sia l'isolato sardo (SA) sia quello siciliano (SI) causavano lesioni più o meno estese in corrispondenza del punto di inoculazione, ben differenti da quelle osservate nel testimone (Fig. 26 c, d). L'isolato sudafricano (SAF), invece, induceva una lesione simile a quella rilevata nel testimone (Fig. 26 e). Sono emerse differenze statisticamente significative anche tra gli isolati sardo e siciliano in merito alla lunghezza delle lesioni (Fig. 28). Il primo è risultato più aggressivo, causando lesioni mediamente superiori a 100 mm.

Tutti e tre gli isolati di *P. cinnamomi* var. *parvispora* inoculati sono stati re-isolati dal margine delle lesioni da essi causate.



Figura 26. Esito dell'inoculazione di: *Phytophthora cinnamomi* var. *parvispora* su corbezzolo (a); *P. taxon niederhauserii* su lentisco (b). Esito dell'inoculazione di astoni di castagno con l'isolato di *P. cinnamomi* var. *parvispora* sardo (c), siciliano (d), sudafricano (e); testimone (f). Barra = 20 mm.

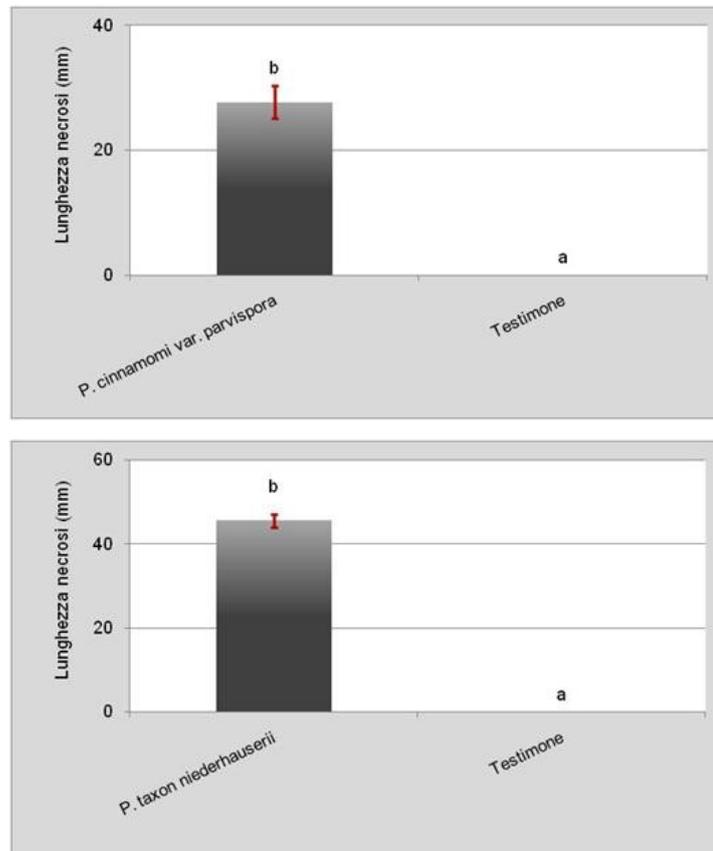


Figura 27. Lunghezza media delle lesioni causate da specie di *Phytophthora cinnamomi* var. *parvispora* e *Phytophthora taxon niederhauserii*, rispettivamente su fusto di semenzali di corbezzolo e lentisco. Le lettere diverse indicano una differenza tra le tesi statisticamente significativa al test LSD per $P \leq 0,05$. La barra verticale rappresenta l'errore standard.

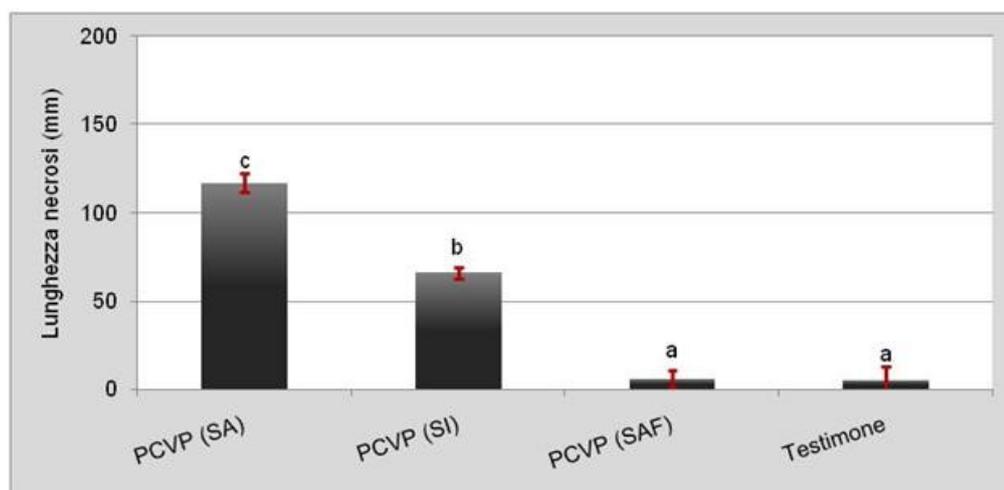


Figura 28. Lunghezza media (mm) delle lesioni necrotiche causati dagli isolati SA, SI e SAF di *Phytophthora cinnamomi* var. *parvispora* (PCVP) su astoni di castagno. Istogrammi con lettere uguali non differiscono in modo statisticamente significativo al test LSD per $P \leq 0,05$. La barra verticale rappresenta l'errore standard.

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le ricerche effettuate in questo lavoro di tesi hanno consentito di ottenere risultati che soddisfano compiutamente gli obiettivi prefissati, volti essenzialmente, a verificare l'incidenza di affezioni ascrivibili a *Phytophthora* spp. in ambienti forestali della Sardegna a rischio di degrado. Ciò anche con l'intento di colmare una lacuna di conoscenze riguardo all'effettiva presenza di questi patogeni in ecosistemi naturali e semi-naturali dell'Isola, vista l'importanza crescente che gli stessi stanno assumendo come patogeni invasivi sia in ambito agrario che forestale.

L'attività di monitoraggio svolta, seppure limitata alla parte centro-settentrionale dell'Isola, ha comunque consentito di individuare l'esistenza di gravi criticità legate agli attacchi di questi patogeni in importanti realtà forestali, come quelle rappresentate dai castagneti, dalle estese formazioni quercine, dai sistemi ripari e dai vivai forestali.

In particolare nei castagneti è emersa l'elevata incidenza, intesa come diffusione e intensità, di una malattia, il "mal dell'inchiostro" da *Phytophthora* spp., che seppure conosciuta da tempo, finora non aveva mai destato eccessive preoccupazioni. Ciò probabilmente perché le piante colpite, spesso in mancanza di specifiche evidenze sintomatologiche, venivano comunemente ascritte all'altra malattia grave del castagno, il "cancro della corteccia" causato da *Cryphonectria parasitica*, ampiamente diffusa nei castagneti sardi.

Attualmente, però, mentre quest'ultima malattia è in fase di regressione grazie alla crescente diffusione naturale di ceppi ipovirulenti del patogeno, si assiste ad una preoccupante recrudescenza del "mal dell'inchiostro" dalle conseguenze ben più gravi. Infatti, le piante infette da tale malattia sono destinate a soccombere anche nell'arco di una stessa stagione vegetativa. Inoltre, essendo attaccate dal patogeno direttamente all'apparato radicale, non sono in grado di rigenerarsi con la produzione di nuovi polloni; possibilità che invece sussiste nelle piante colpite da *C. parasitica*.

Il dato più preoccupante che emerge dalle indagini effettuate nei castagneti esaminati è che accanto a un'alta incidenza del "mal dell'inchiostro" si unisce anche un'elevata diffusione dell'inoculo dei potenziali agenti causali. Ben 80 sono stati gli isolati ottenuti, appartenenti a tre differenti specie di *Phytophthora*. Tra queste, oltre a *P. cambivora* e *P. gonapodyides*, specie comunemente associate alla malattia, è stata riscontrata sovente anche *P. pseudosyringae*.

L'alta frequenza (50,7%) con cui è stata mediamente isolata quest'ultima specie – lungo i corsi d'acqua si è avuto il 100% di isolamenti positivi – sicuramente deriva dal fatto che nel sito indagato sussistono condizioni microclimatiche più favorevoli per la sua crescita e diffusione (Jung *et al.*, 2000, 2003). In ogni caso, il rinvenimento assume particolare rilevanza perché rappresenta la prima segnalazione nel mondo di questa specie nei castagneti. Finora, infatti, *P. pseudosyringae* è stata riscontrata solamente su semenzali di castagno in un vivaio forestale della Spagna (Pintos Varela *et al.*, 2007).

Inoltre, dai saggi di patogenicità effettuati su semenzali e astoni di castagno con gli isolati delle tre specie di *Phytophthora* riscontrate, è emerso che *P. cambivora* è la specie più aggressiva, a conferma del ruolo primario svolto nell'eziologia della malattia, ma anche che *P. pseudosyringae* possiede spiccate capacità patogenetiche, tali da suggerire un suo coinvolgimento attivo nella patogenesi del "mal dell'inchiostro" del castagno.

A sostegno di tale ipotesi concorrono i risultati ottenuti in merito alla indubbia capacità di *P. pseudosyringae* di produrre metaboliti secondari fitotossici. Capacità che, sebbene per il momento sia stato possibile accertare solo in coltura, finora non era stata mai dimostrata per questa specie.

A tale proposito è opportuno rilevare che i risultati dei saggi effettuati con i filtrati colturali, ma soprattutto con gli esausti acquosi, delle specie di *Phytophthora* isolate da castagno, trovano riscontro con quanto finora noto circa la produzione da parte di *Phytophthora* spp. di metaboliti fitotossici idrosolubili di natura sia proteica (Breiman e Barash, 1981; Dubery *et al.*, 1994; Mezzetti *et al.* 1994; Capasso *et al.*, 1997; Shylaja *et al.*, 1997; Orsomando *et*

al., 2001), sia polisaccaridica (Keen *et al.*, 1975; Woodward *et al.*, 1980). Del tutto inattesi sono stati, invece, gli effetti fitotossici osservati con gli estratti organici degli isolati saggiati. Infatti, in letteratura non figura alcun lavoro sulla produzione di metaboliti secondari lipofili da parte di specie di *Phytophthora*. Pertanto, le informazioni acquisite in questa ricerca, seppure non esaustive, costituiscono comunque uno spunto interessante per proseguire gli studi volti a isolare, purificare e caratterizzare sia i metaboliti idrosolubili sia, soprattutto, quelli di natura lipofila.

L'assenza nelle aree castanicole monitorate di *P. cinnamomi* – l'altra specie comunemente associata al "mal dell'inchiostro" del castagno – molto probabilmente deve essere messa in relazione alle basse temperature invernali che normalmente si registrano in queste aree. Tale ipotesi è supportata dalla scarsa capacità di *P. cinnamomi* di sopravvivere a temperature intorno allo zero termico (Shearer e Tippett, 1989). Tuttavia, il rischio di attacchi epidemici da parte di questo pericoloso patogeno resta comunque elevato anche in queste aree, considerando che il graduale incremento della temperatura registrato negli ultimi decenni in seguito ai mutamenti climatici in atto, potrebbe favorire l'ampliamento progressivo del suo areale di distribuzione (Brasier e Scott, 1994). In ciò favorito anche dalla sua elevata polifagia e dalla facilità con cui può diffondersi attraverso la movimentazione di materiale vegetale infetto. Un esempio evidente si è avuto rilevandone la presenza in piante sintomatiche situate nel castagneto adiacente ad uno dei tre vivai indagati.

Non meraviglia pertanto aver riscontrato questo patogeno nell'area boschiva deperente situata nel parco naturale dell'Isola di Caprera, soprattutto in siti caratterizzati da un'alta percentuale di mortalità di piante di leccio. Tale rinvenimento, oltre a rappresentare una novità fitopatologica – si tratta della prima segnalazione di questo pericoloso patogeno su *Quercus ilex* e *Q. suber* in Italia – costituisce sicuramente motivo di allarme per il rischio di una sua eventuale diffusione negli estesi popolamenti quercini della Sardegna. *P. cinnamomi* è ritenuto il principale responsabile della distruzione di boschi di querce sia in Europa, in particolare nella penisola iberica (Brasier, 1992;

Sanchez *et al.*, 2002), sia nel continente americano, soprattutto in Messico (Tainter *et al.*, 2000) e in California (Garbelotto *et al.*, 2006).

Gli attacchi di *P. cinnamomi* nel bosco di Caprera hanno assunto in breve tempo una dimensione epidemica, interessando una vasta area di notevole valore naturalistico, intensamente popolata da lecci e da specie della macchia mediterranea. Essi si sono manifestati con un'intensità tale da compromettere la sopravvivenza di numerosi individui. Ciò anche perché, molto spesso, le infezioni di *P. cinnamomi* agli apparati radicali delle piante si sono sommate a quelle causate da altri patogeni altrettanto virulenti sulla parte aerea delle stesse. In particolare sono stati rilevati attacchi gravi di *Diplodia corticola*, agente di "cancri" e disseccamenti della chioma; un endofita patogeno che, come già detto, è frequentemente coinvolto nell'eziologia dei deleteri fenomeni di "deperimento" che colpiscono le querce in Sardegna (Franceschini *et al.*, 1999; Linaldeddu *et al.*, 2009). Proprio in considerazione dell'ampia distribuzione della *Diplodia* nei querceti sardi, l'eventuale introduzione e diffusione di *P. cinnamomi* negli stessi avrebbe conseguenze devastanti. Pertanto, accanto ai necessari interventi per circoscrivere ed eradicare i focolai d'infezione di *P. cinnamomi* nell'area boschiva di Caprera, anche per evitare la diffusione delle infezioni alle altre specie della macchia mediterranea ugualmente suscettibili al patogeno, appare prioritaria l'adozione di vere e proprie misure di quarantena per impedire la fuoriuscita dall'isola di materiale vegetale infetto.

Di minore importanza come estensione di fenomeno, ma di sicuro altrettanto preoccupanti sotto il profilo naturalistico appaiono le morie osservate nei sistemi ripari ad ontano nero e, soprattutto, ad agrifoglio che, com'è noto, è specie protetta. Ma i risultati delle indagini effettuate in questi ambienti assumono rilevanza anche perché sono state isolate quattro specie di *Phytophthora* mai segnalate in ambienti ripari su ontano in Italia. Tra queste *P. taxon salixsoil*, una specie non ancora formalmente descritta. Essa sotto il profilo morfologico e molecolare è stata inquadrata all'interno del *clade* 6, costituito da 11 *taxa* fenotipici diversi (Cooke *et al.*, 2000) (Fig. 29).

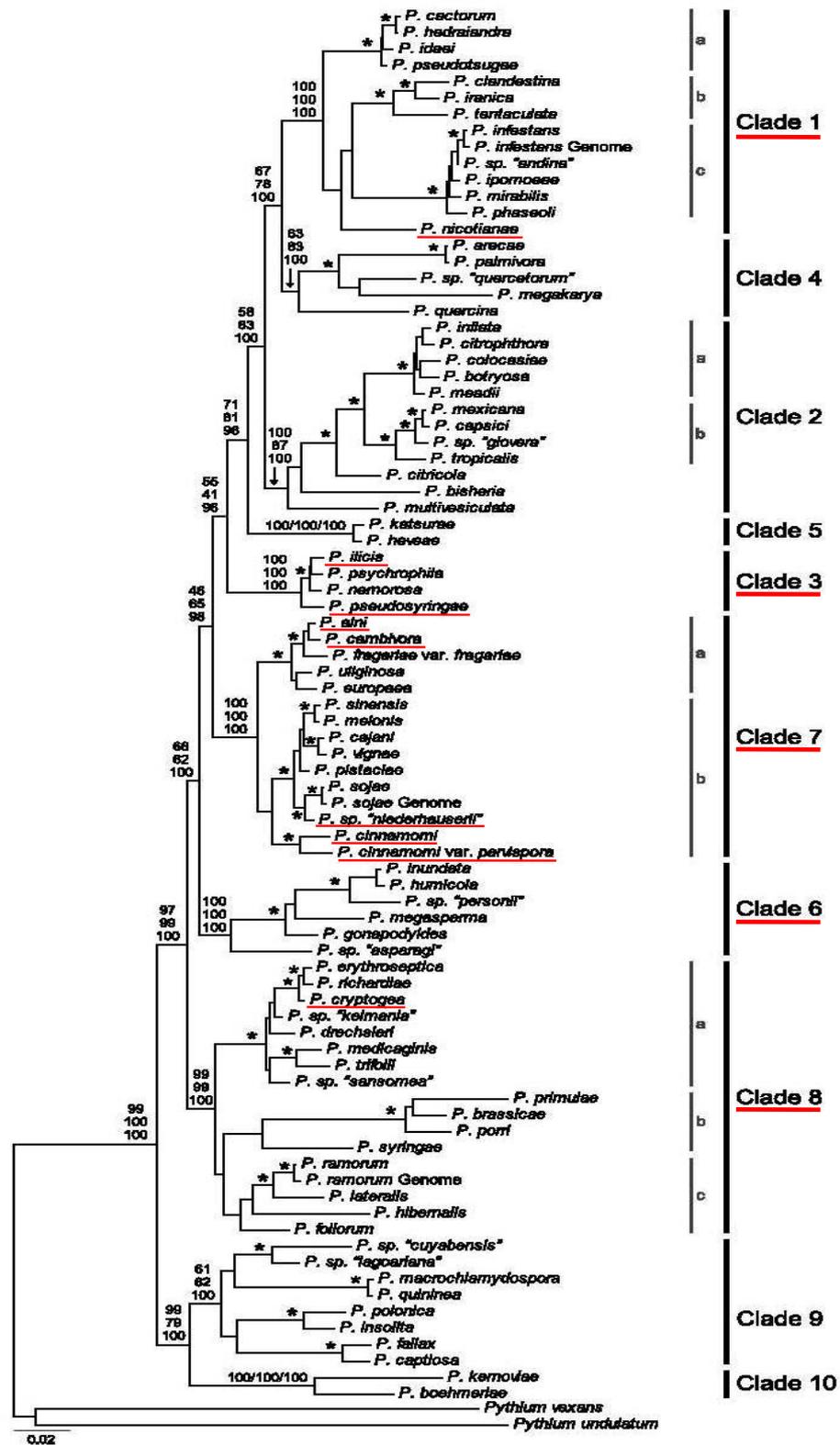


Figura 29. Filogenesi del genere *Phytophthora* (Blair et al., 2008). Sono sottolineati in rosso le specie isolate in questa ricerca e i rispettivi clades di appartenenza.

Finora tale specie è stata riportata su ontano e salice solo in Gran Bretagna (Brasier *et al.*, 2003) e in Germania (Nechwatal e Mendgen, 2006).

Di rilievo appare anche il rinvenimento della specie indicata come *Phytophthora* sp. 2, che dall'esame dei caratteri morfologici risulterebbe molto vicina a *P. alni* (Brasier *et al.*, 1999). Quest'ultima è, come già detto, una specie "ibrida" che si sta diffondendo rapidamente in Europa, provocando estese morie nei sistemi ripari ad ontano (Jung e Blaschke, 2004). Ulteriori e più approfondite indagini estese anche a livello molecolare saranno pertanto necessarie per chiarire l'esatta identità di questa specie.

Altre due specie isolate dalla rizosfera di piante di ontano deperenti sono risultate morfologicamente vicine: *P. pseudosyringae* e *Phytophthora* sp. 1. La prima è stata segnalata per la prima volta su querce e faggio in Germania (Jung *et al.*, 2003) e successivamente, solo su faggio, in Gran Bretagna e in Italia (Cacciola *et al.*, 2005; Denman *et al.*, 2007). Di recente tale specie è stata segnalata su *Nothofagus procera* (Webber, 2009, com. pers.) e su *Vaccinium myrtillus* (Beales *et al.*, 2009). In California e in Oregon essa causa danni molto simili a quelli provocati da *P. ramorum*, ma senza determinare la morte delle piante colpite. Ciò lascia supporre che l'origine di *P. pseudosyringae* sia proprio in queste regioni (Wickland *et al.*, 2008).

La capacità di *P. ramorum* e *P. pseudosyringae* di infettare la parte aerea delle piante è dovuta al fatto che entrambe queste specie differenziano sporangi decidui che vengono diffusi dalle gocce d'acqua o dal vento, liberando nell'aria le zoospore (Strouts e Winter, 2000). Questo carattere è tipico delle specie di *Phytophthora* inquadrare all'interno del *clade* 3 (Fig. 29).

Nello stesso raggruppamento è compresa anche *P. ilicis*, agente causale di cancri e necrosi su rami e foglie di agrifoglio. Tale specie è stata descritta nel 1957 in Oregon (Buddenhagen e Young, 1957) e successivamente segnalata in parchi e giardini dell'Inghilterra. Pertanto il rinvenimento di *P. ilicis* su agrifoglio in Sardegna, assume particolare rilevanza in quanto rappresenta la prima segnalazione del patogeno su tale ospite in un ambiente forestale mediterraneo.

Le indagini effettuate nei tre vivai forestali hanno evidenziato che sia i due di montagna, sia quello di pianura versano in precarie condizioni sanitarie. Tale situazione appare ancora più critica se si considera che le piantine di ben 10 specie vegetali diverse, verosimilmente in gran parte destinate a rimboschimenti o imboschimenti, sono risultate infette da *Phytophthora* spp., la più temibile delle quali, *P. cinnamomi*, è anche quella che è stata isolata più frequentemente. Di non minore importanza per la dannosità dei loro attacchi sono comunque anche *P. cambivora* e *P. cryptogea*. Pertanto, è appena il caso di rimarcare l'importanza e la necessità di prevedere in questi ambienti un attento controllo fitosanitario volto ad evitare la diffusione dei patogeni con materiale propagativo infetto.

Sotto il profilo scientifico assume rilevanza il fatto che due delle cinque specie di *Phytophthora* isolate: *P. cinnamomi* var. *parvispora* e *P. taxon niederhauserii*, segnalate di recente in vivaio in Italia – la prima su *Dipladenia* sp. (Pane *et al.*, 2010); la seconda su *Callistemon citrinus*, *Cistus salvifolius* e *Banksia* spp. (Cacciola *et al.*, 2009a, b) – siano state rinvenute su due nuovi ospiti, rispettivamente corbezzolo e lentisco. Nelle prove di allevamento a temperature diverse, queste due specie esotiche di *Phytophthora* hanno dimostrato una spiccata termofilia che, sicuramente, accresce la loro pericolosità in ambiente mediterraneo anche nei mesi estivi. Da sottolineare, infine, che *P. taxon niederhauserii*, specie non ancora formalmente descritta, si sta diffondendo molto rapidamente in Europa. Oltre che in vivaio, essa è stata segnalata di recente in Spagna anche in ambienti al di fuori del vivaio, in particolare in un mandorleto (Pérez Sierra *et al.*, 2010).

In conclusione, in questo studio complessivamente sono state isolate, identificate e caratterizzate 12 specie di *Phytophthora*. Di queste, 6 sono state riscontrate in vivaio su 10 ospiti diversi e 9 in bosco su 5 ospiti differenti.

In riferimento al raggruppamento tassonomico proposto da Blair e coll. (2008), le specie di *Phytophthora* rinvenute in Sardegna ricadono all'interno di cinque *clades* differenti, a dimostrazione della loro diversità come origini filogenetiche e caratteristiche morfo-fisiologiche (Fig. 29). A tale proposito, è

importante sottolineare che in ambienti forestali di montagna sono state riscontrate prevalentemente specie psicrofile quali: *P. cambivora*, *P. ilicis*, *P. pseudosyringae* e *Phytophthora* sp. 1, mentre nel vivaio forestale ubicato a livello del mare e nei querceti dell'isola di Caprera specie decisamente più termofile, quali: *P. cinnamomi*, *P. cinnamomi* var. *parvispora*, *P. nicotianae* e *P. niederhauserii*.

7. BIBLIOGRAFIA

- Anagnostakis S.A. 2000. Revitalisation of the majestic Chestnut: chestnut blight disease. <http://www.apsnet.org/online/feature/chestnut>.
- Agrios G. 2005. Plant Pathology. 5th Ed., Elsevier Academic Press, Burlington, MA01803, USA, 922 pp.
- Anselmi N. 1992. Agenti patogeni di piante forestali osservati in Nord America. Quale rischio per l'Italia? *Annali dell'Accademia Italiana di Scienze forestali* 73: 343-370.
- Anselmi N., Vettrano A.M., Franco S., Chiarot E., Vannini A. 1999. Recrudescenze del Mal dell'Inchiostro del castagno in Italia: nuove acquisizioni e suggerimenti di lotta. *Linea Ecologica* 28: 53-58.
- Anselmi N., Franceschini A. 2007. Patosistemi e strategie di difesa integrate nei popolamenti forestali in Italia. *Notiziario sulla Protezione delle Piante* 21: 135-170.
- Beales P.A., Giltrap P.M., Webb K.M., Ozolina A. 2009. A further threat to UK heath land bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by *Phytophthora pseudosyringae*. *New Disease Reports* 19: 56.
- Benson D.M., Magnano di San Lio G. 2008. Emerging problems in soilborne diseases of ornamental plants. *Journal of Plant Pathology* 90 (2, S2): 45.
- 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).
- Blair J.E., Coffey M.D., Park S.Y., Geiser D.M., Kang S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45: 266-277.
- Bohlen P.J. 2006. Biological invasions: linking the above ground and below ground consequences. *Applied Soil Ecology* 32: 1-5.
- Bonants P., Verstappen E., Wiejachna K., deVries I., Ivors K. 2007. Molecular identification and detection of *Phytophthora ramorum*. Proceedings of the sudden oak death, second science symposium January 19-21, 2005. Pacific Southwest Research Station, Forest Service, USDA.
- Brasier C.M. 1967. Physiology of reproduction in *Phytophthora*. PhD. Thesis, University of Hull.
- Brasier C.M., Sansome E. 1975. Diploidy and gametangial meiosis in *Phytophthora cinnamomi*, *P. infestans* and *P. drechsleri*. *Transactions of the British Mycological Society* 65: 49-65.
- Brasier C.M. 1992. Oak tree mortality in Iberia. *Nature* 360: 539.

- Brasier C.M., Hamm P.B., Hansen E.M. 1993. Cultural characters, protein patterns and unusual mating behaviour of *Phytophthora gonapodyides* isolates from Britain and North America. *Mycological Research* 97: 1287-1298.
- Brasier C.M., Scott J.K. 1994. European oak declines and global warming: a theoretical assessment with special reference to the activity of *Phytophthora cinnamomi*. *EPPO Bulletin* 24: 221-232.
- Brasier C.M., Rose J., Gibbs J.N. 1995. An unusual *Phytophthora* associated with alder mortality in Britain. *Plant Pathology* 44: 999-1007.
- 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. 2000. The rise of the hybrid fungi. *Nature* 405: 134-135.
- Brasier C.M., Delcan J. 2001. Oospore viability and variation in zoospore and hyphal tip derivatives of the hybrid alder *Phytophthoras*. *Forest Pathology* 31: 65-83.
- Brasier C.M., Kirk S.A. 2001a. Comparative aggressiveness of standard and variant hybrid alder *Phytophthoras*, *Phytophthora cambivora* and other *Phytophthora* species on bark of *Alnus*, *Quercus*, and other woody hosts. *Plant Pathology* 50: 218-219.
- Brasier C.M., Kirk S.A. 2001b. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. *Mycological Research* 105: 547-554.
- Brasier C.M., Cooke D.E.L., Duncan J.M., Hansen E.M. 2003. Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides* - *P. megasperma* ITS clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. *Mycological Research* 107: 277-290.
- Brasier C.M., Kirk S.A. 2004. Production of gametangia by *Phytophthora ramorum* *in vitro*. *Mycological Research* 108: 823-827.
- Brasier C.M., Kirk S.A., Declan J., Cooke D.E.L., Jung T., Man In't Veld W.A. 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycological Research* 108: 1172-1184.
- Brasier C.M., Beales P.A., Kirk S.A., Denman S., Rose J. 2005. *Phytophthora kernoviae* sp. nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK. *Mycological Research* 109: 853-859.
- Brasier C.M., Jung T. 2006. Recent developments in *Phytophthora* diseases of trees and natural ecosystems in Europe. In: Brasier C.M., Jung T., Oswald W., eds. *Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees*. Farnham, UK: Forest Research: 5-16.

- Brasier C.M., Rose J., Kirk S.A., Denman S., Webber J.F. 2007. Comparative host range and aggressiveness of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* sp. nov., (Ptc) on North American and European trees. Proceedings of the sudden oak death, second science symposium. January 19-21, 2005. Pacific Southwest Research Station, Forest Service, USDA.
- Brasier C.M. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathology* 57: 792-808.
- Brasier C.M., Webber J.F. 2010. Sudden larch death. *Nature* 466: 824-825.
- Breiman A., Barash I. 1981. Partial characterization of phytotoxic compounds in culture filtrates of *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathologische Zeitschrift* 102:1-9.
- Buddenhagen I.W., Young R.A. 1956. Leaf and twig disease of English holly caused by *Phytophthora ilicis* n. sp. *Phytopathology* 47(2): 95-100.
- 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.
- Cacciola S.O., Diana G., Pane A., Chimento A., Raudino F. 2005. Un focolaio di cancro basale gommoso causato da *Phytophthora pseudosyringae* nel Parco Nazionale dell'Abruzzo. *Informatore Fitopatologico* 4: 52-57.
- Cacciola S.O., Scibetta S., Martini P., Rizza C., Pane A. 2009a. *Phytophthora taxon niederhauserii*, a new root and crown rot pathogen of *Banksia* spp. in Italy. *Plant Disease* 93(11): 1216.
- Cacciola S.O., Scibetta S., Pane A., Faedda R., Rizza C. 2009b. *Callistemon citrinus* and *Cistus salvifolius* two new hosts of *Phytophthora taxon niederhauserii* in Italy. *Plant Disease* 93: 1075.
- Capasso R., Cristinzio G., Evidente A., Visca C., Parente A. 1997. Phytophlorin, a phytotoxic peptide, and its phytotoxic aggregates from *Phytophthora nicotianae*. *Phytopathologia Mediterranea* 36: 67-73.
- Černý K., Strnadová V. 2010. *Phytophthora* alder decline: disease symptoms, causal agent and its distribution in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 46: 12-18.
- Chen D.W., Zentmyer G.A. 1970. Production of sporangia of *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture: *Mycologia* 62: 397-402.
- Clare B.G., Zentmyer G.A. 1966. Starch-gel electrophoresis of proteins from species of *Phytophthora*. *Phytopathology* 56: 1334-1335.
- Cooke D.E.L., Drenth A., Duncan J.M., Wagels G., Brasier C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30: 17-32.
- Cortesi P., Milgroom M.G. 1998. Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2988-2994.

- Crandall B.S., Gravatt G.F., Ryan M.M. 1945. Root disease of *Castanea* species and some coniferous and broadleaf nursery stocks, caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 35: 162-180.
- Cristinzio G., Capasso R., Evidente A., 1992. Isolamento di una fitotossina da una *Phytophthora nicotianae* patogena del pomodoro. *La difesa delle Piante* 15: 3-12.
- Cushman J.H., Meentemeyer R.K. 2008. Multi-scale patterns of human activity and the incidence of an exotic forest pathogen. *Journal of Ecology* 96: 766-776.
- Damsteegt V.D. 1999. New and emerging plant viruses. APSnet, August 1 to 31.
- Davidson J.M., Wickland A.C., Patterson H.A., Falk K.R., Rizzo D.M. 2005. Transmission of *Phytophthora ramorum* in mixed-evergreen forest in California. *Phytopathology* 95: 587-596.
- Denman S., Rose J., Slippers B. 2007. *Phytophthora pseudosyringae* on European beech and hornbeam in the UK. Poster presented at the 4th International IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting on *Phytophthora* in Forests and Natural Ecosystems, Monterrey, California, 26th – 31st August, 2007, http://nature.berkeley.edu/IUFRO2007/Phytophthora/tnp/denman_poster.pdf.
- 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.
- Donahoo R., Blomquist C.L., Thomas S.L., Moulton J.K., Cooke D.E.L., Lamour K.H. 2006. *Phytophthora foliorum* sp. nov., a new species causing leaf blight of azalea. *Mycological Research* 110: 1309-1322.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Dubery I.A., Meyer D., Bothma C. 1994. Purification and characterization of cactorein, a phytotoxin secreted by *Phytophthora cactorum*. *Phytochemistry* 35: 307-312.
- Dunstan W.A., Rudman T., Shearer B.L., Moore N.A., Paap T., Calver M.C., Dell B., Hardy G.E. St. J. 2010. Containment and spot eradication of a highly destructive, invasive plant pathogen (*Phytophthora cinnamomi*) in natural ecosystems. *Biological Invasions* 12: 913-925.
- Duran A., Gryzenhout M., Slippers B., Ahumada R., Rotella A., Flores F., Wingfield B.D., Wingfield M.J., 2008. *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. *Plant Pathology* 57: 715-727.

- EPPO 1951. Convention for the establishment of the European and Mediterranean Plant Protection Organization of 18 April 1951. EPPO, Paris (France).
- Erwin D.C., Katznelson H. 1961. Studies on the nutrition of *Phytophthora cryptogea*. Canadian Journal Microbiology 7: 15-25.
- Erwin D.C., Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, Stati Uniti, 562 pp.
- 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 *Biscogniauxia mediterranea*, a fungus pathogen of cork oak. Journal of Natural Products 68: 568-571.
- 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 *Biscogniauxia mediterranea* in cork oak trees. Journal of Plant Pathology 86(4): 319-320.
- Fry W.E., Goodwin S.B., Matuszak J.M., Spelman L.J., Milgroom M.G. 1992. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. Annual Review of Phytopathology 30: 107-130.
- Garbelotto M., Huberli D., Shaw D. 2006. First report on an infestation of *Phytophthora cinnamomi* in natural oak woodlands of California and its differential impact on two native oak species. Plant Disease 90: 685-685.
- Goheen E.M., Kubisiak T.L., Zhao W. 2007. The search for the origin of *Phytophthora ramorum*: A First Look in Yunnan Province, People's Republic of China. http://www.fs.fed.us/psw/publications/documents/psw_gtr196/psw_gtr196_002_029Goheen.pdf.
- Gonthier P., Gennaro M., Nicolotti G. 2006. Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. Fungal Diversity 21: 69-80.
- Groth J.V., Ozmon E.A., Bush R.H. 1999. Repeatability and relationship of incidence and severity measures of scab of wheat caused by *Fusarium graminearum* in inoculated nurseries. Plant Disease 83: 1033-1038.
- Heiniger V., Rigling D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. Annual review of Phytopathology 32: 581-599.

- Ioos R., Husson C., Andrieux A., Frey P. 2005. SCAR-based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 112: 323-335.
- Judelson H.S., Blanco F.A. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology* 3: 47-58.
- 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.
- Jung T., Cooke D.E.L., Blaschke H., Duncan J.M., Oßwald W. 1999. *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycological Research* 103(7): 785-798.
- Jung T., Blaschke H., Oßwald W. 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology* 49(6): 706-718.
- Jung T., Nechwatal J., Cooke D.E.L., Hartmann G., Blaschke M., Obwald W., Duncan J.M., Delatour C. 2003. *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. *Mycological Research* 107: 772-789.
- Jung T., Blaschke M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* 53: 197-208.
- Jung T., Blaschke M. 2006. Management strategies for the *Phytophthora* root and collar rot epidemic of alders in Bavaria. *Progress in research on Phytophthora diseases of forest trees* (eds. Brasier C.M., Jung T. and Oßwald W.), Forest Research, Farnham: pp 61-68.
- Jurc D., Ogris N. 2006. First reported outbreak of charcoal disease caused by *Biscogniauxia mediterranea* on Turkey oak in Slovenia. *Plant Pathology* 55: 299.
- Kamoun S. 2003. Molecular genetics of pathogenic *Oomycetes*. *Eukaryotic Cell* 2: 191-199.
- Keen N.T., Wang M.C., Bartnicki-Garcia S., Zentmyer G.A. 1975. Phytotoxicity of mycolaminarans- β -1,3-glucans from *Phytophthora* spp. *Physiological Plant Pathology* 7(1): 91-92.
- Kowalski T. 2006. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology* 36: 264-270.
- 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.

- Linaldeddu B.T., Maddau L., Franceschini A. 2006. 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., Franceschini A., Luque J., Phillips A.J.L. 2007. First report of canker disease caused by *Botryosphaeria parva* on cork oak trees in Italy. *Plant Disease* 91(3): 324.
- Linaldeddu B.T., Sirca C., Spano D., Franceschini A. 2009. 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., Scanu B., Franceschini A. 2010a. 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., Sirca C., Spano D., Franceschini A. 2010b. Variation of endophytic cork oak-associated fungal communities in relation to plant health and water stress. *Forest Pathology* (doi: 10.1111/j.1439-0329.2010.00652.x).
- MacLeod A., Pautasso M., Jeger M.J., Haines-Young R. 2010. Evolution of the international regulation of plant pests and challenges for future plant health. *Food Security* 2: 49-70.
- Maddau L., Perrone C., Andolfi A., Spanu E., Linaldeddu B.T., Evidente A. 2010. Phytotoxins produced by the oak pathogen *Discula quercina*. *Forest Pathology* (doi: 10.1111/j.1439-0329.2009.00633.x).
- Manion P.D. 1991. *Tree disease concepts*. 2nd edition. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey, 402 pp.
- Matta A., Pennazio S. 1984. *Elementi di fisiopatologia vegetale*. Pitagora Editrice, Bologna.
- Mezzetti B., Capasso R., Evidente A., Hammerschlag F.A., Zimmerman R.M., Cristinzio G., Rosati P. 1994. Interaction of partially purified phytotoxins from *Phytophthora cactorum* on apple cell plasma membrane. *Phytopathologische Zeitschrift* 142: 219-226.
- Milgroom M.G. 1995. Population biology of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Canadian Journal of Botany* 73 (Suppl. 1): S311-319.
- Mooney H.A., Cleland E.E. 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 5446-5451.
- Moralejo E., Perez-Sierra A.M., Alvarez L.A., Belbahri L., Lefort F., Descals E. 2009. Multiple alien *Phytophthora taxa* discovered on diseased ornamental plants in Spain. *Plant Pathology* 58: 100-110.
- Moricca S., Panconesi A. 2000. Canker stain of planetrees: a serious threat to North-European urban plantations. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fuer Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 370: 97-100.

- Nechwatal J., Mendgen K. 2006. Widespread detection of *Phytophthora taxon Salixsoil* in the littoral zone of Lake Constance, Germany. *European Journal of Plant Pathology* 114: 261-264.
- Newhook F.J., Waterhouse G.M., Stamps D.J. 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Paper* 143: 20 pp.
- 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.
- Orsomando G., Lorenzi M., Raffaelli N., Dalla Rizza M., Mezzetti B., Ruggieri S. 2001. Phytotoxic protein PcF, purification, characterization, and cDNA sequencing of a novel hydroxyproline-containing factor secreted by the strawberry pathogen *Phytophthora cactorum*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 21578-21584.
- Pane A., Cacciola S.O., Badalà F., Martini P., Magnano di San Lio G. 2006. Il marciume radicale da *Phytophthora* nei vivai di piante ornamentali. *Terra e Vita* 18, Supplemento Anno XLVII: 24-28.
- Pane A., Faedda R., Cacciola S.O., Rizza C. Scibetta S., Magnano di San Lio G. 2010. Root and basal stem rot of mandevillas caused by *Phytophthora* spp. in Eastern Sicily. *Plant Disease* 94(11): 1374.
- Pérez-Sierra A., León M., Álvarez L.A., Alaniz S., Berbegal M., García-Jiménez, J., Abad-Campos P. 2010. Outbreak of a new *Phytophthora* sp. associated with severe decline of almond trees in eastern Spain. *Plant Disease* 94: 534-541.
- Perlerou C., Tziros G., Vetraino A.M., Diamandis S. 2010. *Phytophthora cryptogea* causing ink disease of *Castanea sativa* newly reported in Greece. *Plant Pathology* 59: 799.
- Pintos Varela C., Mansilla Vázquez J.P., Aguín Casal O., Rial Martínez C. 2007. First report of *Phytophthora pseudosyringae* on chestnut nursery stock in Spain. *Plant Disease* 91(11): 1517.
- Pittis J.E., Colhoun J. 1984. Isolation and identification of pythiaceous fungi from irrigation water and their pathogenicity to *Antirrhinum*, tomato and *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytopathologische Zeitschrift* 110: 301-318.
- Reeser P.W., Hansen E.M., Sutton W. 2007. *Phytophthora siskiyouensis*, a new species from soil, water, myrtlewood (*Umbellularia californica*) and tanoak (*Lithocarpus densiflorus*) in southwestern Oregon. *Mycologia* 99: 639-643.
- Rhoades C.C., Brosi S.L., Dattilo A.J., Vincelli P. 2003: Effect of soil compaction and moisture on incidence of *Phytophthora* root rot on American chestnut (*Castanea dentata*) seedlings. *Forest Ecology and Management* 184: 47-54.
- Ribeiro O.K. 1978. A Source Book of the Genus *Phytophthora*. Vaduz, Germany: J. Cramer.

- Rizzo D.M., Garbelotto M., Davidson J.M., Slaughter G.W., Koike S.T. 2002. *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease* 86: 205-214.
- Sanchez M.E., Caetano P., Ferraz J., Trapero A. 2002. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. *Forest Pathology* 32: 5-18.
- Shearer B.L., Tippet J.T. 1989. Jarrah dieback: the dynamics and management of *Phytophthora cinnamomi* in the jarrah (*Eucalyptus marginata*) forest of south-western Australia. *Research Bulletin* 3. Perth: Department of Conservation and Land Management.
- Shylaja M.R., Nair G.S., Augustine A., Mathew J. 1997. *In vitro* production of toxic metabolites by *Phytophthora capsici* and partial purification of the metabolites. *Journal of Tropical Agriculture* 35: 10-15.
- Slippers B., Wingfield M.J. 2007. *Botryosphaeriaceae* species as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Review* 2(1): 90-106.
- Smart C.D., Fry W.E. 2001. Invasions by the late blight pathogen: renewed sex and enhanced fitness. *Biological Invasions* 3: 235-243.
- Strouts R.G., Winter T.G. 2000. *Diagnosis of Ill-health in Trees*. The Stationery Office, Norwich, UK: 332 pp.
- Tainter F.H., O'Brien J.E., Hernandez A., Orozco F., Rebolledo O. 2000. *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the state of Colima, Mexico. *Plant Disease* 84: 394-398.
- Tucker C.M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. *Res. Bull.* 153. Missouri Agric. Exp. Sta., Missouri, U.S.A.: 208 pp.
- Vannini A., Lucero G., Anselmi N., Vettrano A.M. 2009. Response of endophytic *Biscogniauxia mediterranea* to variation in leaf water potential of *Quercus cerris*. *Forest Pathology* 39: 8-14.
- Vettrano A.M., Natili G., Anselmi N., Vannini A. 2001. Recovery and pathogenicity of *Phytophthora* species associated with a resurgence of ink disease in *Castanea sativa* in Italy. *Plant Pathology* 50: 90-96.
- Vettrano A.M., Barzanti G.P., Bianco M.C., Ragazzi A., Caretti P., Paoletti E., Luisi N., Anselmi N., Vannini A. 2002. Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. *Forest Pathology* 32(1): 19-28.
- Vettrano A.M., Morel O., Perlerou C., Robin C., Diamandis S., Vannini A. 2005. Occurrence and distribution of *Phytophthora* species in European chestnut stands, and their association with Ink Disease and crown decline. *European Journal Plant Pathology* 111: 169-180.

- Werres S., Marwitz R., Man in't Veld W.A., de Cock A.W.A.M., Bonants P.J.M., de Weerd M., Themann K., Ilieva E., Baayen R.P. 2001. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. Mycological Research 105: 1166-1175.
- Waterhouse G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Common. Mycol. Inst., Mycological Papers 92: 22 pp.
- Webber J.F., Rose J. 2008. Dissemination of aerial and root infecting Phytophthoras by human vectors. In: Proceedings of the Sudden Oak Death Third Science Symposium (eds Frankel SJ, Kliejunas JT & Palmieri KM), pp. 195–198. Gen. Tech Rep. PSW-GTR-214, Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, USDA. 491p.
- 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* (Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds). Academic Press, San Diego: 315-322.
- Wickland A.C., Jensen C.E., Rizzo D.M. 2008. Geographic distribution, disease symptoms and pathogenicity of *Phytophthora nemorosa* and *P. pseudosyringae* in California, USA. Forest Pathology 38: 288-298.
- Woodward J.R., Keane P.J., Stone B.A. 1980. Structures and properties of wilt-inducing polysaccharides from *Phytophthora* species. Physiological Plant Pathology 16(3): 439-454.

RIASSUNTO

Il genere *Phytophthora* include circa un centinaio di specie, alcune delle quali in grado di causare danni economicamente rilevanti su diversi ospiti vegetali di interesse sia agrario sia forestale. Nell'ultimo decennio il numero di segnalazioni di specie nuove e/o esotiche di *Phytophthora* è aumentato considerevolmente su scala mondiale.

In questa tesi di Dottorato, considerata la mancanza di informazioni sulla presenza e sulla diffusione di questi patogeni in Sardegna, è stata svolta una ricerca finalizzata all'isolamento e alla caratterizzazione sotto il profilo morfologico, fisiologico e biomolecolare delle specie di *Phytophthora* presenti nell'Isola.

A tal fine, sono stati individuati 8 siti di indagine: due castagneti, un bosco di querce, due sistemi ripari e tre vivai forestali, in cui è stata rilevata la presenza di piante con sintomi tipici causati da attacchi di *Phytophthora* spp. Nei castagneti e nel querceto è stata valutata l'incidenza delle principali malattie, rispettivamente, "mal dell'inchiostro" e "deperimento" nelle quali sono coinvolte specie patogene di *Phytophthora*. Nei sistemi ripari sono state riscontrate aree con deperimenti diffusi e moria di piante di ontano e agrifoglio. Infine, nei vivai forestali è stata rilevata una moria di semenzali di castagno, noce, leccio, tasso, tuia e di varie specie caratteristiche della macchia mediterranea.

In bosco, sono stati prelevati sia campioni di tessuto corticale da piante sintomatiche, sia campioni di suolo in prossimità delle stesse. In vivaio, invece, sono state esaminate tutte le piantine che mostravano sintomi di marciume radicale e del colletto. Gli isolamenti sono stati effettuati mediante due tecniche di *baiting* utilizzando foglie di rododendro e/o mele Granny Smith come trappola. Tutti gli isolati di *Phytophthora* ottenuti in coltura pura sono stati identificati sia su base morfologico-culturale che mediante l'analisi delle sequenze delle regioni ITS del rDNA.

Dalle indagini effettuate nei castagneti è emersa la presenza di 3 specie di *Phytophthora*: *P. cambivora*, *P. gonapodyides* e *P. pseudosyringae*. Quest'ultima, isolata per la prima volta su castagno in Italia, è stata la specie più frequentemente isolata (50,7%), soprattutto lungo i corsi d'acqua. Tuttavia, *P. cambivora* è stata riscontrata con una frequenza maggiore (58,8%) in piante sintomatiche dislocate in bosco. Dai saggi di patogenicità effettuati su semenzali e astoni di castagno è emerso che *P. cambivora* è quella più aggressiva confermando il suo ruolo primario nell'eziologia della malattia; tuttavia, anche, per *P. pseudosyringae* è emersa una spiccata capacità patogenetica tale da suggerire un suo coinvolgimento attivo nella patogenesi del "mal dell'inchiostro" del castagno. A sostegno di questa ipotesi concorrono i risultati ottenuti sulla capacità di queste 3 specie di produrre *in vitro* metaboliti secondari fitotossici sia lipofili che idrosolubili.

I risultati degli isolamenti effettuati nel querceto hanno evidenziato la presenza di 3 specie di *Phytophthora*: *P. cinnamomi*, *P. cryptogea* e *P. gonapodyides*. Di particolare rilievo è il rinvenimento di *P. cinnamomi* in quanto si tratta della prima segnalazione di questo pericoloso patogeno su *Q. ilex* e *Q. suber* in Italia. Ciò costituisce un serio motivo di allarme in quanto tale specie è ritenuta responsabile della distruzione dei boschi di querce in diverse parti del mondo.

Nei sistemi ripari sono state rinvenute 2 specie di *Phytophthora* mai segnalate in tali ambienti su ontano in Italia: *P. taxon salixsoil* e *P. pseudosyringae*. *P. ilicis*, isolata da agrifoglio, è stata rinvenuta per la prima volta in un ecosistema naturale in ambiente mediterraneo.

Infine, in vivaio sono state isolate 6 specie di *Phytophthora*: *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. nicotianae*, *P. cinnamomi* var. *parvispora* e *P. taxon niederhauserii*. Queste ultime due sono state isolate per la prima volta rispettivamente su corbezzolo e lentisco.

Complessivamente, i risultati ottenuti hanno permesso di ampliare le conoscenze sulla presenza di specie di *Phytophthora* in ambienti naturali e forestali in Sardegna, e di evidenziare il diretto coinvolgimento di questi

patogeni nell'eziologia delle malattie riscontrate nelle aree di studio. Da segnalare, inoltre, la preoccupante incidenza di queste specie nei vivai forestali e, soprattutto, il rischio derivante dalla diffusione di questi patogeni attraverso il materiale infetto, che potrebbe contribuire a pregiudicare irreversibilmente lo stato sanitario dei soprassuoli forestali.

ABSTRACT

Phytophthora spp. are devastating plant pathogens in both agricultural and natural environments. Since little is known about the occurrence and spread of *Phytophthora* spp. in Sardinia, a survey was carried out in various forest ecosystems. Overall two chestnut groves, one oak stand, two riparian ecosystems and three forest nurseries were surveyed. Isolations were made directly from symptomatic plant tissues and using *Rhododendron* leaves and apples as bait. Molecular and morphological characterizations were used to identify the isolates. Aggressiveness of the *Phytophthora* isolates was assayed by different methods: soil infestation and stem inoculation of seedlings and by inoculating living logs. It was also evaluated the ability of some species to produce *in vitro* phytotoxic metabolites. The survey revealed the presence of 12 species of *Phytophthora*: *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. cinnamomi* var. *parvispora*, *P. cryptogea*, *P. gonapodyides*, *P. ilicis*, *P. nicotianae*, *P. pseudosyringae*, *P. taxon niederhauserii*, *P. taxon salixsoil*, *Phytophthora* sp. 1 e *Phytophthora* sp. 2. In particular: *P. cinnamomi* var. *parvispora*, *P. pseudosyringae* and *P. taxon niederhauserii* were recorded in a new association host-pathogen in Italy. Another species, *P. ilicis* is here reported for the first time in a natural ecosystem in the Mediterranean basin.