



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI PROTEZIONE DELLE PIANTE

DOTTORATO DI RICERCA IN PROTEZIONE DELLE PIANTE

- XVIII CICLO -

Curriculum: Malattie complesse

“Indagini sugli endofiti fungini, patogeni e non, riscontrati su *Quercus* spp. e sulle reciproche relazioni antagonistiche”

SETTORE SCIENTIFICO – DISCIPLINARE AGR. 12

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Naldo Anselmi

Tutore:

Chiar.mo Prof. Naldo Anselmi

Co-tutore:

Dott. Marco Nasini

Dottoranda:

Immacolata Librandi

INDICE

1. Introduzione.....	1
1.1. Il deperimento del bosco.....	1
1.1.1. Generalità.....	1
1.1.2. Eziologia del deperimento.....	3
1.1.3. Il deperimento in delle querce.....	4
1.1.3.1. Il fenomeno in Italia.....	7
1.1.3.2. Patogeni fungini della chioma isolati da querce deperienti in Italia.....	9
1.1.4. Il monitoraggio dei deperimenti.....	10
1.2. L'endofitismo dei patogeni coinvolti nel deperimento delle piante forestali.....	12
1.2.1. Generalità.....	12
1.2.2. Gli "endofiti patogeni".....	14
1.2.3. Endofiti patogeni e deperimento delle piante.....	18
1.2.4. L'endofitismo dei patogeni coinvolti nel deperimento delle querce.....	19
1.3 L'Antagonismo tra organismi fungini.....	19
1.3.1. Premessa.....	20
1.3.2. Ipotesi di antagonismo tra endofiti.....	22
2. Scopi delle ricerche.....	24
3. Materiali e metodi.....	27
3.1 Studi sull'incidenza e sulle associazioni degli endofiti.....	27
3.1.1. Endofiti fungini in diverse situazioni ambientali.....	27
3.1.2. Endofiti patogeni nel tempo.....	29
3.1.3. Endofiti fungini su specie diverse di <i>Quercus</i>	34
3.1.4. Metodologia di isolamento e di identificazione specifica.....	34
3.1.5 Rilievo dati climatici.....	37
3.1.6 Analisi dei dati.....	37
3.2 Studi <i>in vitro</i> sull'antagonismo tra endofiti fungini, patogeni e non.....	39
3.2.1. Funghi esaminati.....	39
3.2.2. Metodologia.....	40
3.2.2.1. Substrati utilizzati.....	40
3.2.3.2. Modalità.....	40
3.2.3.2.1 Colture duali.....	40
3.2.3.2.2. Filtrati colturali.....	41
3.2.3. Osservazioni al microscopio elettronico a scansione (SEM).....	41

4. Risultati.....	43
4.1 Studi sull'incidenza e sulle associazioni di endofiti.....	43
4.1.1. Endofiti fungini in diverse situazioni ambientali.....	43
Specie endofite riscontrate.....	43
Influenza degli organi.....	44
Influenza dell'altitudine.....	44
Relazioni tra deperimenti ed endofiti fungini.....	45
4.1.2. Endofiti patogeni nel tempo.....	59
4.1.3. Endofiti fungini su specie diverse di <i>Quercus</i>	63
4.2. Studi sull'antagonismo in vitro tra endofiti fungini, patogeni e non.....	71
4.2.1. Antagonismo tra endofiti patogeni.....	71
4.2.2. Antagonismo tra endofiti non patogeni e patogeni.....	71
A) <i>Acremonium</i> sp.	71
<i>Acremonium</i> sp. – <i>Biscogniauxia mediterranea</i>	71
<i>Acremonium</i> sp. – <i>Coryneum quercinum</i>	72
<i>Acremonium</i> sp. – <i>Pleurophoma cava</i>	73
B) <i>Aureobasidium pullulans</i>	73
<i>Aureobasidium pullulans</i> – <i>Biscogniauxia mediterranea</i>	73
<i>Aureobasidium pullulans</i> – <i>Coryneum quercinum</i>	75
<i>Aureobasidium pullulans</i> – <i>Pleurophoma cava</i>	76
C) <i>Cladosporium cladosporioides</i>	77
<i>Cladosporium cladosporioides</i> – <i>Biscogniauxia mediterranea</i>	77
<i>Cladosporium cladosporioides</i> – <i>Coryneum quercinum</i>	78
<i>Cladosporium cladosporioides</i> – <i>Pleurophoma cava</i>	79
D) <i>Epicoccum nigrum</i>	79
<i>Epicoccum nigrum</i> – <i>Biscogniauxia mediterranea</i>	79
<i>Epicoccum nigrum</i> – <i>Coryneum quercinum</i>	82
<i>Epicoccum nigrum</i> – <i>Pleurophoma cava</i>	84
E) <i>Gliocladium roseum</i>	87
<i>Gliocladium roseum</i> – <i>Biscogniauxia mediterranea</i>	87
<i>Gliocladium roseum</i> – <i>Coryneum quercinum</i>	89
<i>Gliocladium roseum</i> – <i>Pleurophoma cava</i>	92
F) <i>Penicillium</i> sp.....	94
<i>Penicillium</i> sp. – <i>Biscogniauxia mediterranea</i>	94

<i>Penicillium</i> sp. – <i>Coryneum quercinum</i>	95
<i>Penicillium</i> sp. – <i>Pleurophoma cava</i>	96
G) <i>Trichoderma viride</i>	98
<i>Trichoderma viride</i> – <i>Biscogniauxia mediterranea</i>	98
<i>Trichoderma viride</i> – <i>Coryneum quercinum</i>	102
<i>Trichoderma viride</i> – <i>Pleurophoma cava</i>	103
H) <i>Verticillium lecanii</i>	105
<i>Verticillium lecanii</i> – <i>Biscogniauxia mediterranea</i>	105
<i>Verticillium lecanii</i> – <i>Coryneum quercinum</i>	108
<i>Verticillium lecanii</i> – <i>Pleurophoma cava</i>	110
4.2.2. Valutazione delle interazioni con l'Indice di Badalyan.....	113
4.2.3. Osservazioni al microscopio elettronico a scansione.	115
5. Considerazioni.....	118
Numerosità e ricorrenza degli endofiti fungini, patogeni e non.....	118
Influenza degli organi	119
Influenza della specie di <i>Quercus</i>	119
Influenza della stazione.....	120
Relazioni tra deperimenti ed endofiti fungini.....	121
Indagini multistazionali su <i>Quercus cerris</i>	121
Confronti tra specie diverse di <i>Quercus</i> a Castel Porziano.....	122
Andamento dell'incidenza di <i>Biscogniauxia mediterranea</i> e <i>Discula quercina</i>	127
Antagonismo in vitro tra endofiti fungini, patogeni e non.....	127
Meccanismi dell'antagonismo.....	129
6. CONCLUSIONI.....	131
7. Bibliografia consultata.....	133
Allegato 1.....	141
Allegato 2.....	149

“Indagini sugli endofiti fungini, patogeni e non, riscontrati su *Quercus* spp. e sulle reciproche relazioni antagonistiche”

1. INTRODUZIONE

Le ricerche relative a questa Tesi di Dottorato si inseriscono in una serie di studi che il Dipartimento di Protezione delle Piante porta avanti sull'endofitismo dei patogeni di debolezza implicati nel deperimento delle piante forestali.

Più in particolare esse sono state svolte nel quadro di un Progetto PRIN – COFIN su “Endofitismo e controllo biologico naturale di patogeni coinvolti nel deperimento della quercia”, Coordinato dal Prof. Alessandro Ragazzi dell'Università di Firenze, in cui il Dipartimento di Protezione delle Piante partecipava come Unità di Ricerca di cui era responsabile il Prof. Naldo Anselmi.

Poiché detta Tesi (vedi scopi), partendo dal fenomeno “deperimento delle querce”, va ad approfondire aspetti sugli endofiti fungini che risulterebbero ad esso connessi e sui relativi presumibili fenomeni di antagonismo, riteniamo opportuno far precedere i lavori da una breve introduzione sui tre fenomeni: deperimento del bosco, endofitismo fungino ed antagonismo tra microrganismi.

1.1. IL DEPERIMENTO DEL BOSCO

1.1.1. Generalità

Il deperimento del bosco (“*Forest decline*”, in inglese; “*Waldesterben*”, in tedesco) si è posto all'attenzione dell'opinione pubblica, sin dai primi anni settanta, come una delle principali cause del progressivo degrado dei boschi, in relazione a danni di nuovo tipo osservati in tutto l'emisfero boreale, ma soprattutto nell'Europa centro – settentrionale e mediterranea, Italia compresa.

Esso rappresenta uno dei più gravi problemi in campo fitopatologico cui sono soggetti attualmente i popolamenti forestali.

In realtà, fenomeni di moria dei boschi furono segnalati anche nella prima metà del XX secolo a carico di specie differenti, quali betulla (Spaulding e Macaloney, 1931), acero (Westing, 1966), frassino (Ross, 1966), ecc.

La morte di alcuni o anche di un gran numero di alberi in una foresta non deve tuttavia essere necessariamente considerato un fenomeno eccezionale, potendo rientrare nell'indispensabile avvicinarsi delle generazioni all'interno del soprassuolo.

Intorno agli anni '80, però, quando l'intensificazione e l'espansione di morie nei boschi coinvolse numerose specie arboree, determinando perdite ingenti sia in senso economico che ecologico, la maggior parte degli studiosi fu spinta a focalizzare la propria attenzione sullo studio del problema.

Inizialmente il fenomeno, che si conclamò con particolare gravità in una grande area dell'Europa continentale (Cecoslovacchia, Polonia e Germania), definita "triangolo nero", fu messo in relazione con l'inquinamento atmosferico e fu denominato "moria del bosco da piogge acide" (Schütt e Cowling, 1985; Gellini, 1989). Il "*forest decline*" sembrò sostanzialmente provocato dalla ricaduta di deposizioni atmosferiche particolarmente acide, ricche in acido nitrico e/o in acido solforico e/o in acido cloridrico, originate prevalentemente da composti azotati, solforati, clorurati, immessi in atmosfera in elevate quantità da fonti antropiche diverse: per reazione con l'acqua di condensazione presente nell'aria, si originano le cosiddette "piogge acide". Nelle aree soggette a frequenti e persistenti nebbie, il pericolo per boschi e piante arboree risultò ancora più evidente.

Un altro gruppo di sostanze fitotossiche secondarie dannose alle piante è stato più recentemente attribuito alla fotossidazione di composti azotati (quali quelli, ad esempio, immessi nell'atmosfera dal traffico veicolare) e di elementi organici volatili (quali taluni idrocarburi aromatici emessi da varie piante) che, alla presenza d'intensa radiazione ultravioletta, possono dare origine a composti (O_3 , PANs) molto reattivi e pericolosi per la vegetazione, ancora più che per l'uomo.

Anche se l'inquinamento atmosferico, con i suoi danni diretti e indiretti per le piante arboree, rappresenta uno dei fattori globalmente più implicato nel deperimento del bosco, il fenomeno in realtà risulta assai più complesso e difficilmente attribuibile ad un unico fattore causale. Ciò dipende dal fatto che gli ecosistemi forestali sono caratterizzati da una notevole complessità di relazioni tra le componenti biotiche (specie arboree, arbustive erbacee, specie animali, microflora e microfauna del terreno) e le componenti abiotiche (clima, matrice geologica, esposizione, posizione geografica) (Guilden e Hoiland, 1985). Su tale equilibrio naturale di tipo dinamico, interviene fortemente l'intervento antropico sia in termini d'utilizzo del bosco, sia di modifiche

strutturali e/o ambientali apportate all'ambiente e al territorio circostante (viabilità, insediamenti industriali, attività agricole).

D'altra parte negli ultimi decenni i deperimenti sono andati ad interessare anche numerose altre specie, sia conifere (*Abies*, *Picea*, *Pinus*) che latifoglie (*Fagus*, *Populus*, *Quercus*), anche in zone dove l'inquinamento poteva essere pressoché escluso.

1.1.2. Eziologia del deperimento

Alla luce delle suddette considerazioni, l'eziologia del deperimento del bosco è stata ampiamente dibattuta nel tempo, nel tentativo di offrire una significativa interpretazione, scientificamente e tecnicamente corretta.

Per molti autori il deperimento del bosco va inquadrato in quelle che vengono definite malattie ad "eziologia complessa", che scaturiscono dall'azione di tutta una serie di fattori, interagenti e concatenati tra loro, sia abiotici che biotici.

Esistono vari modelli, elaborati da autori diversi, che tentano di definire e coordinare schematicamente gli interventi di tali fattori e le caratteristiche del processo evolutivo del deperimento.

Una prima significativa schematizzazione si deve a Sinclair (1965), che raggruppò i fattori maggiormente coinvolti nella sindrome del "forest decline" in tre tipologie:

1. *predisponenti* (*predisposing factors* o *long terms factors*), comprendenti il potenziale genetico, l'età delle piante, la fittezza del bosco, il substrato pedologico, l'inquinamento;
2. *scatenanti* (*inducing factors*), che alterano (in genere) in tempi brevi (*short terms factors*) i meccanismi fisiologici e metabolici della pianta, innescando i processi patologici e la conclamazione dei fenomeni di sofferenza. Spesso essi si evidenziano con la formazione di rami epicormici, filloptosi, microfillia e casi di "dieback" (morte rapida della pianta). Rientrano in questa categoria: siccità, insetti defogliatori, gelate tardive, salinizzazione del suolo, inquinamento (Jakucs, 1985; AA.VV., 1990; Miller *et al.*, 1989);
3. *concomitanti* (*contributing factors – long terms factors*), che consistono soprattutto nell'intervento di fattori biotici, prevalentemente parassiti di debolezza, quali insetti xilofagi, agenti di cancri, marciumi radicali, carie. Tra gli agenti di marciumi radicali, ricordiamo *Armillaria* spp., *Collybia fusipes* (Bulliard:Fries) Quélet, *Pholiota* spp., nonché (taluni includono) *Phytophthora* spp. (Brasier *et al.*, 1993; Dreyer e Aussennac,

1996); tra gli agenti di necrosi corticali e tracheomicosi da debolezza (AA.VV., 1990), si annoverano *Colpoma quercinum* (Pers.) Wallroth, *Pezicula cinnamomea* (Pers.:Fr.) Saccardo, *Cytospora* spp., *Botryosphaeria* spp., *Phomopsis* spp., *Biscognauxia* spp., *Nectria* spp., *Ophiostoma* spp. Tra gli insetti vengono indicati i generi *Scolytus*, *Agrilus* (Vannini *et al.*, 1996) e *Coroebus*.

Nel 1991 il suddetto inquadramento venne rielaborato da Manion (1991), che lo raffigurò come una spirale a tre reparti (Fig. 1) in cui sono ripartiti, dall'esterno verso l'interno, i fattori predisponenti, scatenanti e concomitanti. I fattori indicati nella spirale sono tra loro intercambiabili ed è sufficiente la presenza di uno per ogni categoria affinché il deperimento si manifesti.

In Italia il deperimento del bosco è in genere tipico in popolamenti forestali adulti od invecchiati per abbandono delle pratiche selvicolturali, soprattutto a livello di piano dominante; i fattori climatici e stazionali sono tra i più influenti.

1.1.3. Il deperimento delle querce

Nel contesto “deperimento del bosco”, quello relativo alle querce (oak decline) merita qui una sottolineatura particolare, sia per la gravità e l'estensione del fenomeno nell'areale mediterraneo, sia per l'importanza dei querceti nel nostro paese, sia infine perché questa tesi di dottorato si inserisce nel quadro di tale argomento.

La manifestazione sintomatologica della malattia su querce è comune a molti altri generi forestali: alterazioni a carico della chioma, che diviene più rarefatta e mostra disseccamenti apicali; morte di rami e branche con contemporanea emissione di getti epicormici, come tentativo di reazione della pianta; comparsa di essudati bruni da fessurazioni della corteccia; zone necrotiche in corrispondenza delle lesioni, sia sulle cerchie più esterne che interne (Vannini, 1987; Ragazzi *et al.*, 1989; Cellerino *et al.*, 1990). La morte può sopraggiungere entro 2-3 anni dalla comparsa dei primi sintomi ma, a volte, anche nell'arco di una singola stagione vegetativa.

Il fenomeno dell'“oak decline” rappresenta una delle malattie dalla sintomatologia ed eziologia più complesse e diffuse in Europa e nel mondo (Oak and Tainter, 1988). Cicli di deperimento di questo genere sono riportati sin dall'inizio del secolo sia in Europa sia negli Stati Uniti su un alto numero di specie quercine.

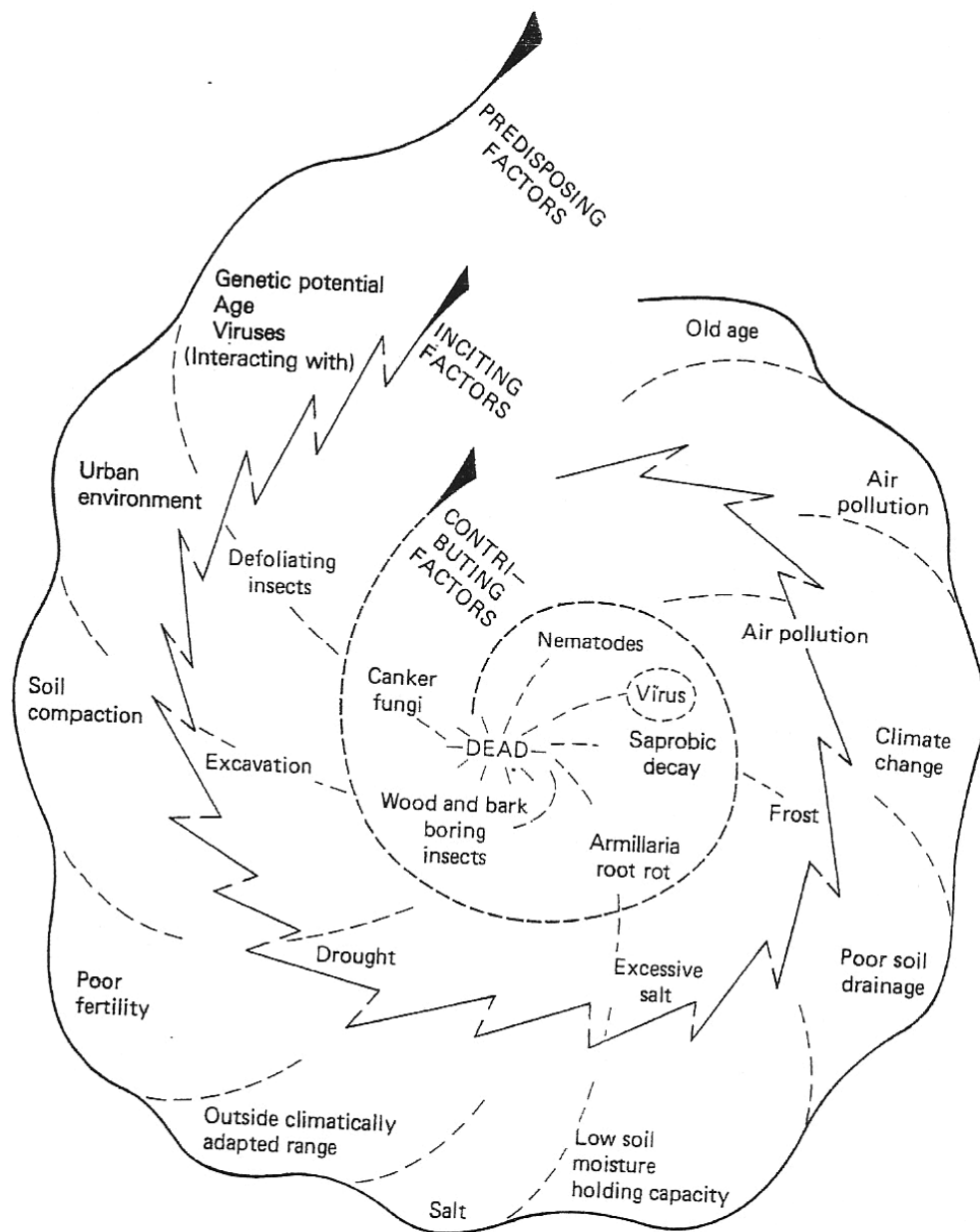


Figura 1. Spirale del deperimento delle piante forestali secondo Manion (1991).

Nell'America settentrionale, nel 1989, Miller *et al.* hanno riportato 57 casi verificatisi tra il 1856 ed il 1989, riconoscendo nella siccità una delle cause principali. Erano individuate tre tipologie di deperimento, caratterizzate da un quadro sintomatologico affine, ma caratterizzate da altrettanti diversi fattori scatenanti: nel Sud – Ovest la siccità; nel Nord – Ovest le defogliazioni del lepidottero *Lymantria dispar* L.; nel Centro Ovest l'avvizzimento delle querce (*Oak Wilt*) causato dal fungo *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) Hunt. In questi ultimi casi, essendo l'avvizzimento provocato da un parassita primario, non si colloca nella spirale del deperimento e conferma la confusione esistente tra i ricercatori nell'utilizzo del termine “*forest decline*”.

Cicli di morie nella prima metà del secolo scorso (intorno al 1921, 1924, 1946) sono stati segnalati anche in Francia, dove interessarono popolamenti di *Quercus robur* L. e furono considerati generalmente un fenomeno di tipo cronico, di carattere endemico ed associato a situazioni stazionali sfavorevoli.

Durante gli anni '80, i fenomeni di deperimento su querce finirono per interessare la maggior parte dei paesi europei.

In Austria rilevamenti del deperimento delle querce si sono avuti tra il 1982 ed il 1983, mentre in Cecoslovacchia le prime osservazioni risalgono al 1979. Qui fu effettuata anche una valutazione della predisposizione delle specie e ne risultò che la tolleranza decresce nell'ordine: *Quercus pubescens* Willd., *Quercus frainetto* Ten., *Quercus pedunculiflora* K. Koch, *Quercus cerris* L., *Quercus virgiliana* Ten., *Q. slavonica* Kit. (Borb.), *Q. robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl., *Q. polycarpa* Schur, *Q. dalechampii* Ten.

La Germania è stata caratterizzata da un crescendo di manifestazioni sintomatiche passando dal 15% del 1983 al 70% del 1988. Intorno al 1978 si è osservato il deperimento su *Q. petraea*, un fenomeno verificato solo al Nord del paese. In Olanda, nel periodo tra il 1984 ed il 1988, si è avuta una mortalità del 40% degli alberi appartenenti alle classi più deperienti. In Polonia la situazione del deperimento è andata peggiorando tra il 1982 ed il 1984 in seguito ad annate molto siccitose. In Gran Bretagna il deperimento non ha recato danni rilevanti su *Q. robur* L. Nell'ex – Jugoslavia, dagli inventari effettuati nel 1985 – 87 è stato visto che la situazione di “oak decline” è più grave in aree caratterizzate da elevato inquinamento atmosferico.

Nell'Europa mediterranea, tra i fattori predisponenti sono riportati frequentemente: l'età delle piante, il tipo di terreno, l'inquinamento (Paoletti, 1998) ed i cambiamenti climatici (Dreyer e Aussennac, 1996). Tra quelli scatenanti si ricordano gli insetti defogliatori, gli eccessi di salinità, l'inquinamento e, soprattutto, la siccità (Jakucs, 1985; Mészáros, 1991; Paoletti, 1998).

Quest'ultima, spiccata in alcuni anni a causa dalle oscillazioni periodiche del clima, viene sempre più spesso considerata il principale elemento scatenante i cicli di deperimento delle querce nei paesi a clima temperato caldo. Tra l'altro nel periodo estivo, lo stress dovuto alla scarsità di precipitazioni e alle alte temperature è accentuato negli ultimi 50 anni dall'aumento della temperatura media, dovuto alla maggiore concentrazione dei gas-serra.

Nelle regioni dell'Europa Centrale non deve essere sottovalutato l'inquinamento, in particolare l'effetto delle deposizioni secche e delle piogge acide.

1.1.3.1. Il fenomeno in Italia

In Italia l'importanza dell'"oak decline" dipende dal fatto che le querce rappresentano una cospicua parte del patrimonio boschivo del Paese, ricoprendo un'area di 1.170.000 ettari, pari a circa il 20 % della superficie boscata italiana (IFNI, 1985).

Dagli anni '80, periodo in cui si verificarono vaste ed intense morie in tutto il Paese, si è registrato un progressivo incremento del fenomeno, soprattutto nelle regioni Lazio, Marche, Toscana, Puglia, Basilicata e Calabria (Ragazzi *et al.*, 1989; Anselmi *et al.*, 2002).

Poiché le querce costituiscono una parte importante del nostro patrimonio boschivo, la rilevanza attribuita al fenomeno deperimento è stata assai rilevante.

Molte delle specie di *Quercus* presenti sul territorio nazionale sono state coinvolte nel deperimento: *Q. cerris*, *Q. robur*, *Q. pubescens*, *Q. frainetto*, e, più di recente, le sempreverdi *Q. ilex* L. e *Q. suber* L. In termini numerici la specie maggiormente colpita dalla sindrome è *Q. cerris* (cerro), una delle essenze più rappresentative dei soprassuoli quercini italiani (circa 500.000 ha).

I sintomi tipici di deperimento dei soprassuoli quercini in Italia sono la rarefazione della chioma, l'abbondante emissione di rami epicormici e le essudazioni brunastre da cancri sul fusto (Fig. 2).

In Italia, tra i fattori predisponenti il fenomeno, spicca soprattutto l'invecchiamento delle piante e le ostili condizioni del suolo. Alle nostre latitudini, ed in particolare nelle regioni centro – meridionali, il fattore scatenante più rilevante è certamente lo stress idrico, conseguente ai prolungati e ripetuti periodi di siccità che hanno caratterizzato l'ultimo ventennio, con l'indebolimento degli individui ed una maggiore predisposizione agli attacchi di numerosi fattori concomitanti (Valentini *et al.*, 1993; Vannini *et al.*, 1993a; Vannini *et al.*, 1993b).

In tali areali, tra i parassiti di debolezza da considerare come fattori concomitanti, che determinano poi la morte della pianta, spiccano *Scolytus intricatus* Rtz. e *Agrilus biguttatus* F. (Vannini *et al.*, 1996) tra gli insetti; *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kumm, *A. bulbosa* (Barla) Velen., *A. tabescens* (Scop.) Emel., *Collybia* spp., *Pholiota* spp., tra i patogeni dell'apparato radicale, *Phomopsis quercina* (Sacc.) Höhn., *Diplodia corticola* A.J.L. Phillips Alves & Luque, *Cytospora* spp., e, soprattutto, *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze, tra gli agenti di necrosi corticali (Fig. 3).

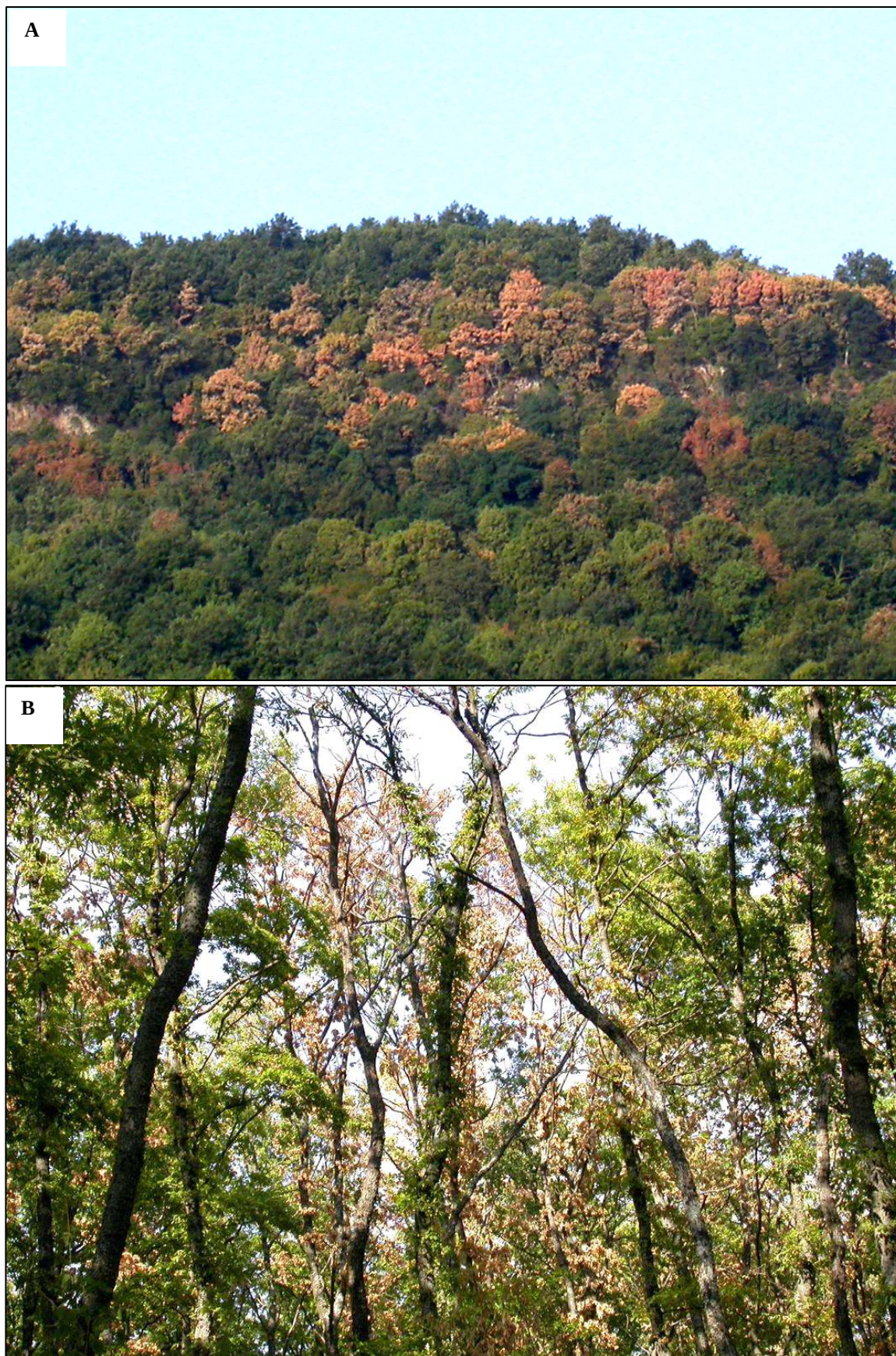


Figura 2. a) Bosco di *Q. cerris* con fenomeni di deperimento; b) gruppo di piante deperienti.

Quanto agli interventi utili a prevenire o limitare i danni provocati da cicli di deperimento, ricordiamo le pratiche selvicolturali finalizzate a ridurre la competizione tra le piante per l'approvvigionamento idrico e nutrizionale, i tagli fitosanitari con l'eliminazione delle piante morte o molto deperienti, la sostituzione graduale delle specie più sofferenti favorendo le specie più tolleranti gli stress ambientali e adatte all'ambiente in esame (Cellerino *et al.*, 1990, 1993; Manicone *et al.*, 1993; Giordano E., 1993; Luisi e Lerario, 2000; Mazzaglia *et al.*, 2004).

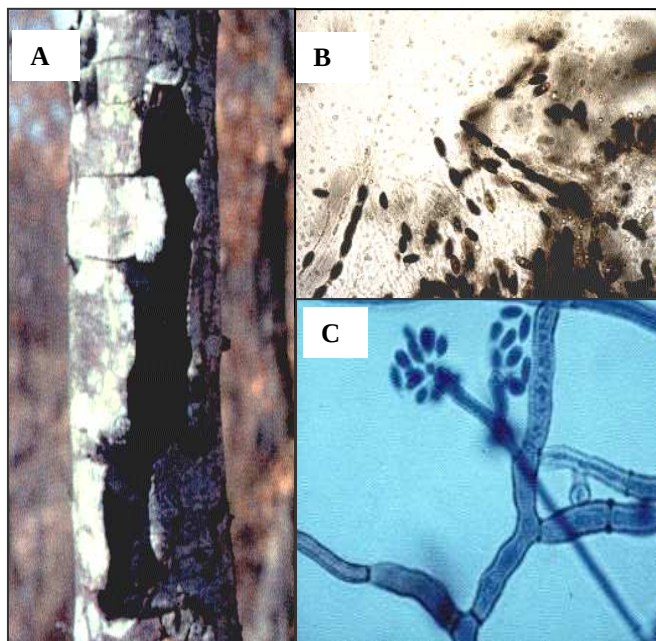


Figura 3. Stroma carbonaceo (a) di *Biscogniauxia mediterranea* sul fusto di *Q. cerris*. In (b) gruppo di aschi del fungo, (c) conidi della forma imperfetta *Periconiella musae*.

1.1.3.2. Patogeni fungini della chioma isolati da querce deperienti in Italia

In Italia, gli isolamenti effettuati su piante colpite dalla sindrome di deperimento hanno permesso l'individuazione di un consistente numero di miceti, annoverabili tra i fattori concomitanti, generalmente patogeni di debolezza, tra cui numerosi agenti di necrosi corticali e di alterazioni cromatiche del legno: *Armillaria* spp., *B. mediterranea*, *Ceratocystis coerulescens* (Munch) Bakshi, *Diplodia corticola* A.J.L. Phillips Alves & Luque, *Fusarium eumartii* Carp., *Graphium penniciloides* Cor., *Ophiostoma picea* (Münch) Syd. & P. Syd., *Phomopsis quercina*, *Pleurophoma cava* (Schulzer) Boerema, Loer. & Hamers, *Pyrenochaeta quercina* Kabát & Bubak, *Sporotrix* spp., (Frisullo *et al.*, 1989; Ragazzi *et al.*, 1989; Anselmi, 1990; Cellerino *et al.*, 1990; Ragazzi, 1990, 1993; Anselmi e Invernizzi, 1992; Luisi *et al.*, 1993). Tra tutti, *B. mediterranea*, noto

come l'agente del cancro carbonioso delle querce, è risultato tra i parassiti di debolezza maggiormente diffusi nei boschi di quercia deperienti dell'ambiente mediterraneo ed in particolare nell'Italia centro – meridionale (Vannini, 1987; Cellerino *et al.*, 1990; Luisi e Manicone, 1990; Agosteo e Granata, 1993), in Marocco (Graf *et al.*, 1993), in Spagna e Sud del Portogallo (Sousa Santos e Moura Martins, 1993).

1.1.4. Il monitoraggio dei deperimenti

In Europa l'analisi dell'evoluzione dei deperimenti ed in generale dello stato di salute dei boschi è stato ed è oggetto di ricorrenti monitoraggi.

In Italia tali ricerche hanno avuto inizio con l'INDEFO (Indagine sul Deperimento delle Foreste), negli anni '80, e sono poi proseguite attraverso l'attuazione di una serie di regolamenti coordinati in ambito europeo, tra cui le più articolate sono da attribuire al progetto Con.Eco.For (Controllo Ecosistemi Forestali) ed al programma Forest Focus.

La Convenzione di Ginevra sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero a lungo raggio (LRTAP), ratificata dall'Italia con L. 27/04/1982 n. 289, avviava nel 1979 un vasto programma europeo di controllo degli inquinanti atmosferici, sotto l'egida UN/ECE. Il programma INDEFO, basato su circa 9.600 punti (rete 3 x 3 km), è stato annualmente svolto nel periodo 1985 – 1995.

Dal 1987 è stata avviata una nuova indagine coordinata con tutti gli altri Paesi Europei (Reg. CE n. 1696/87, Rete UE), basata su circa 200 punti posti su di una rete molto meno fitta (16 x 16 km). A seguito delle Risoluzioni approvate dalle Conferenze dei Ministri per la Protezione delle Foreste in Europa (Ris. n. 1, Strasburgo, 1990; Ris. n. 4, Helsinki, 1993), alcuni Paesi europei hanno avviato ambiziosi programmi nazionali di controllo dello stato degli ecosistemi forestali basati su reti d'aree permanenti appositamente scelte (Germania 70 aree, Francia 20 aree, Spagna 50 aree). Nel 1994, con l'emanazione del Reg. UE n. 1091/94, l'Unione Europea (d'intesa con l'UN/ECE ICP-Forests) ha promosso la realizzazione di una Rete Europea di aree permanenti per la sorveglianza intensiva e continua degli ecosistemi forestali della durata di almeno 20 anni. L'Italia ha elaborato un programma nazionale basato su di una Rete Nazionale Integrata per il Controllo degli Ecosistemi Forestali (CON.ECO.FOR.), avviato gradualmente dal 1995. Il Programma CONECOFOR è basato su di una rete di 20 aree permanenti (circa un decimo del numero d'aree della Rete UE) comprendenti le principali biocenosi forestali. In queste aree si effettuano diverse indagini scientifiche,

per studiare i cambiamenti a livello strutturale e funzionale degli ecosistemi, in relazione a possibili fonti d'inquinamento atmosferico o fattori di perturbazione su larga scala. Tali fenomeni sono analizzati utilizzando le indagini di 2° livello previste dal Reg. UE n. 1091/94 (già attivate tra il 1995 e 1997). Le biocenosi forestali rappresentate nella Rete sono quelle più diffuse sul territorio italiano (boschi a *Fagus sylvatica* L., 7 aree; a *Quercus cerris*, 5 aree; a *Picea abies* (L.) Karst., 4 aree; a *Quercus ilex*, 2 aree; a *Quercus petraea*, un'area; a *Quercus robur*, un'area). Scopo del progetto era quello di fornire un quadro esaustivo dello stato delle foreste del territorio nazionale mediante indagini di tipo diacronico e sincronico ad elevato grado di approfondimento, attraverso l'utilizzazione di metodologie standard messe a punto in ambito nazionale ed internazionale.

La creazione della rete nazionale è stata finalizzata all'unificazione ed integrazione in un unico progetto coordinato degli sforzi di singole amministrazioni regionali/provinciali e di singoli enti pubblici di ricerca che hanno promosso od eseguito direttamente, già da qualche tempo, indagini di diverso tipo volte alla conoscenza dello stato delle foreste italiane. Il quadro di riferimento normativo entro il quale si inserisce il progetto, oltre al menzionato Reg. UE n. 1091/94, è costituito dai precedenti Regolamenti della Commissione Europea in materia di protezione delle foreste dall'inquinamento atmosferico: n. 3528/86, 2157/92, 923/93, 836/94 e 307/97.

Le ricerche vengono svolte sotto il controllo e l'indirizzo scientifico di Enti di ricerca di rilevanza nazionale altamente qualificati nei diversi settori di indagine, con i quali sono state stipulate apposite convenzioni. Le indagini e le analisi sono materialmente effettuate nelle singole aree dal personale dipendente dal Ministero per le Politiche Agricole Alimentari e Forestali (in particolare da quello del Corpo Forestale dello Stato) o da enti convenzionati con esso, tra i quali Amministrazioni Regionali e Province Autonome.

L'ultima novità nel campo del monitoraggio delle foreste a livello europeo è costituita dal Regolamento (CE) n. 1737/2006 della Commissione, del 7 novembre 2006, che riporta le modalità applicative del Regolamento (CE) n. 2152/2003 ("Forest Focus") del Parlamento europeo e del Consiglio relativo al monitoraggio delle foreste e delle interazioni ambientali nella Comunità.

Esso codifica sia il tipo di indagini (stato delle chiome, accrescimenti, composizione delle deposizioni, eventuale valutazione della qualità dell'aria, ecc.) che le modalità di svolgimento delle stesse. Ogni Stato, insieme alla trasmissione dei dati, deve

annualmente trasmettere una relazione recante informazioni generali sulle metodologie seguite, secondo appositi schemi.

Tutto ciò ha come scopo fondamentale una ricerca il più possibile integrata a livello europeo, soprattutto per la possibilità che offre di effettuare comparazioni tra le diverse aree oggetto di studio.

Inoltre, studi specifici, finanziati con progetti a livello nazionale (IPRA, ex-40%, MAF ecc.) e della Unione Europea (STEP, AIR, FAIR, ecc.), hanno permesso di seguirne l'evoluzione e di raggiungere validi progressi nella sua comprensione (Luisi *et al.*, 1993; Bussotti e Grossoni, 1996; Dreyer and Ausenac, 1996; Paoletti, 1998).

1.2. L'ENDOFITISMO DEI PATOGENI COINVOLTI NEL DEPERIMENTO DELLE PIANTE FORESTALI

1.2.1. Generalità

Ad accrescere la complessità del fenomeno “deperimento del bosco” è intervenuta recentemente la constatazione che molti dei patogeni di debolezza agenti di necrosi corticali implicati nel fenomeno possono infettare le piante sane e rimanere allo stato asintomatico anche per lunghissimi periodi.

Molti autori hanno indicato dette specie fungine, isolate da piante sane, sotto la denominazione di “endofiti patogeni”, inserendola sotto il più ampio concetto dell’“endofitismo dei microrganismi”.

La parola “endofita” è utilizzata in generale per descrivere un organismo localizzato all'interno dei tessuti di una pianta, in contrapposizione al termine “epifita”, che invece indica un organismo che vive all'esterno dei tessuti (De Bary, 1866; Ragazzi *et al.*, 2004). Rimanendo fedeli a questo concetto, nel passato, buona parte degli studi sugli endofiti ha riguardato prevalentemente microrganismi che vivevano nei tessuti delle piante senza provocare alterazioni patologiche evidenti.

In questa simbiosi, i vantaggi maggiori sono generalmente tratti dal fungo endofita, poiché la pianta gli garantisce l'accesso alle sostanze nutritive ed al rifornimento idrico e gli permette di sfuggire alle condizioni avverse dell'ambiente esterno.

Per quanto riguarda la pianta, sebbene la condizione più frequente è quella di subire la colonizzazione dell'endofita senza alcun vantaggio diretto, in molti casi essa trae benefici indiretti.

La presenza di questi funghi può essere infatti vantaggiosa per la pianta, offrendo ad essa una maggior resistenza al morso degli animali (effetto antifeeding), una maggiore resistenza agli insetti (Funk *et al.*, 1983; Barker *et al.*, 1984; Ahmad *et al.*, 1985; Hardy *et al.*, 1985; Cheplick e Clay, 1988; Prestidge e Gallagher, 1988), una probabile maggiore resistenza a funghi patogeni (White e Cole, 1985; Christensen e Latch, 1991), e nel complesso, talora, un miglior accrescimento ed un miglioramento generale della vita (Siegel *et al.*, 1984; Claydon e Pole, 1985; Clay, 1987, 1988; Siegel e Schardl, 1991). Non si esclude però che le ife del fungo possano perdere vitalità nel tempo (Wilson e Carroll, 1994).

Diverse sono le piante dalle quali sono stati isolati funghi endofiti, sia erbacee, quali graminacee e altre specie agrarie (Clay, 1988; 1989), ma anche monocotiledoni e dicotiledoni spontanee (Rodolfi *et al.*, 2004), nonché felci e muschi (Petrini, 1986), sia arboree, prevalentemente forestali, vuoi conifere (Carroll *et al.*, 1977; Carroll G.C. e Carroll F.E., 1978; Sieber, 1988, 1989), vuoi latifoglie (Petrini e Fisher, 1988, 1990; Sieber *et al.*, 1991).

Gli endofiti erano noti fin dall'ottocento come organismi interni ai tessuti vegetali; tuttavia studi più approfonditi, atti a descriverne o ad ipotizzarne il ciclo biologico, risalgono agli anni '80 (Boddy e Griffith, 1989; Carroll *et al.*, 1977; Petrini, 1986).

Petrini, nel 1991, con il termine endofita, indica un organismo che passa almeno una parte del suo ciclo vitale in modo asintomatico all'interno dei tessuti dell'ospite.

Tassonomicamente i funghi endofiti segnalati dalla letteratura appartengono ai funghi Ascomycota, Basidiomycota, funghi Mitosporici, nonché ai Chromista. I vari gruppi fungini riscontrati sono stati ampiamente descritti da Petrini (1986). Lo sviluppo delle colonie di endofiti è influenzato da numerosi fattori, come le condizioni geografiche e microclimatiche (Johnson e Whitney, 1989; Rollinger e Langenheim, 1993; Fisher *et al.*, 1994; Rodrigues, 1994; Kowalsky e Kehr, 1997; Collado *et al.*, 1996, 1999; Fröhlich *et al.*, 2000), l'età dei tessuti colonizzati (Petrini, 1991; Fröhlich *et al.*, 2000) e l'intervento antropico (Barklund e Rowe, 1983; Ahmad *et al.*, 1985; Riesen e Close, 1987; Heliövaara *et al.*, 1989; Sieber, 1989; Helander *et al.*, 1993).

Le piante dalle quali sono stati isolati funghi endofiti appartengono a famiglie anche molto diverse tra loro. In ordine cronologico di studio, esse comprendono: conifere (Carroll G.C. e Carroll F.E., 1978; Sieber, 1988; Sieber *et al.*, 1991), graminacee e altre specie agrarie (Clay, 1988, 1989; Cheplick e Clay, 1988), felci e muschi (Petrini,

1986), palme ed altre monocotiledoni arboree, alghe (Cubit, 1974), varie latifoglie (Petrini e Fisher, 1988, 1990; Halmschlager, 1993; Sieber *et al.*, 1991).

Riguardo agli organi e tessuti, gli endofiti sono stati isolati da semi, radici, tessuti verdi (foglie) e legnosi.

È probabile che in tutte le piante alberghino funghi endofiti: l'isolamento di miceti dai tessuti interni di una pianta previa disinfezione superficiale porta quasi sempre alla coltura di un certo numero di specie fungine, la cui identificazione non è sempre agevole.

Gli endofiti rappresentano una grande riserva di biodiversità e una sorgente di specie non ancora conosciute, così come costituiscono una potenziale ed inesauribile riserva di sostanze metaboliche biologicamente attive, contribuendo in tal modo ad assicurare una futura disponibilità di nuovi composti chimici utili all'agricoltura, all'industria, alla medicina, in genere alle attività umane. In effetti, gli endofiti sono l'oggetto di alcuni settori d'avanguardia della ricerca biologica ed ecologica, sia fondamentale, sia applicata. Di fatto, essi sono divenuti altrettanti modelli per lo studio delle interazioni pianta – microrganismo e dell'evoluzione dei sistemi naturali.

1.2.2. Gli “endofiti patogeni”

In una prima fase, gli studi sugli endofiti avevano lo scopo di identificare tassonomicamente i funghi isolati; in seguito, per alcuni di questi, sono stati approfonditi anche gli aspetti biologici ed ecologici. Oggi, ambedue gli aspetti vengono portati avanti parallelamente nelle ricerche, affiancando allo studio delle tipologie delle specie fungine isolate quello della loro biologia, su cui rimangono, però, molti aspetti da chiarire.

C'è stata una evoluzione del concetto di endofitismo, da quello per così dire topografico, a quello biologico, in riferimento alla natura dell'interazione ed al tipo di associazione dell'endofita con l'ospite (Stone *et al.*, 2000).

Sembrerebbe che gli endofiti presentino un ciclo biologico comune, suscettibile però di notevoli variazioni quando si considerano le singole specie fungine nei rispettivi ospiti in ambienti diversi. Detto ciclo può essere così schematizzato: gli endofiti, dopo aver raggiunto l'ospite per mezzo di vettori (vento, acqua, insetti, ecc.), penetrano nei tessuti attraverso aperture naturali (stomi, lenticelle, ecc.), ferite o microferite, nonché (sugli organi verdi) anche direttamente (Paoletti, 2006), rimanendo al loro interno per un

periodo indeterminato, più o meno lungo, che viene definito “periodo di latenza”, che in alcuni casi potrebbe essere illimitato. Durante questo periodo il fungo instaura con l’ospite un rapporto trofico, in genere minio ma talora anche cospicuo, che comunque non danneggia significativamente la pianta. Solo con il viraggio a colonizzazioni patogenetiche, esso finisce per risultare dannoso, se non addirittura letale (Petrini, 1991).

Petrini (1991) ha messo in evidenza come gli endofiti, durante la loro vita, passino attraverso più stadi di convivenza simbiotica, comportandosi così da organismi mutualistici, indifferenti o antagonisti, virando da uno stadio ad un altro in base agli stimoli ambientali esterni ed interni all’ospite.

Esistono infatti funghi che passano l’intera esistenza all’interno della pianta ospite senza mai crearle danni o manifestare all’esterno sintomi particolari ed altri che, al verificarsi di determinate condizioni fisiologiche della pianta ospite, come l’insorgere di stress o il raggiungimento della senescenza, ne colonizzano i tessuti comportandosi come patogeni (Petrini, 1991; Vannini e Valentini, 1994).

Per tali motivi, Petrini nel 1991, “allarga” il significato del concetto di endofitismo, indicando con il termine endofita” un organismo che passa almeno una parte del suo ciclo vitale in modo asintomatico (senza sintomi visibili) all’interno dei tessuti dell’ospite. Egli pertanto, oltre agli endofiti classici (non patogeni), include anche endofiti patogeni, che, dopo una fase di latenza, pressoché innocua, di lunghezza indeterminata, che può essere anche molto lunga, si possono trasformare in patogeni.

Sebbene questo concetto non sia da tutti condiviso, in questa tesi si dà al termine “endofita” il significato attribuito da Petrini, intendendo poi per fase asintomatica, una fase di latenza del microrganismo senza sintomi visibili sulla pianta, che però non escludono modeste variazioni fisiologiche della stessa.

Lo sviluppo delle colonie di endofiti è influenzato da diversi fattori, come le condizioni climatiche e microclimatiche (Fisher *et al.*, 1994; Collado *et al.*, 1999), l’età dei tessuti colonizzati (Petrini 1991) e l’intervento antropico (Sieber, 1989; Helander *et al.*, 1993).

Non si esclude, comunque, e specialmente negli endofiti delle specie arboree o legnose, che le ife del fungo possano perdere vitalità nel tempo (Wilson e Carroll, 1994).

Tra i fattori più importanti che possono favorire il passaggio di un organismo fungino dalla fase endofitica a quella patogenetica vi sono, oltre alla specie fungina:

- l’ospite e le sue caratteristiche ecologiche nonché genetiche. È intuitivo come la capacità di adattamento fenotipico della specie ospite ai cambiamenti climatici e agli

- eventuali stress ambientali (Vannini e Valentini, 1994) è di grande importanza nel determinare il passaggio da un rapporto simbiotico indifferente o mutualistico ad uno chiaramente parassitario. In tali condizioni, sono importanti anche le caratteristiche morfologiche ed ultrastrutturali della pianta ospite, perché le dimensioni delle cellule, lo spessore della parete cellulare, o ancora lo spessore della corteccia possono essere degli elementi discriminatori nei confronti degli endofiti fungini che tentano la colonizzazione;
- il tempo, inteso come spazio temporale in cui si colloca la vita dell'intero ospite o parte di esso, è fondamentale nel determinare l'andamento della simbiosi. In alcune fasi della vita dell'ospite il rapporto simbiotico si trova nello stadio mutualistico, mentre in altre nello stadio antagonistico, come accade spesso nella fase di senescenza della pianta. Il tempo influenza la simbiosi mutualistica o indifferente anche sotto l'aspetto quantitativo; infatti da alcune ricerche effettuate, ad esempio, su foglie di conifere e latifoglie (Suske e Acker, 1990; Magan e McLeod, 1991; Wilson e Carroll, 1994; Fagioli, 1998) si è osservato un aumento del tasso di infezione all'aumentare dell'età della foglia;
- l'ambiente, inteso sia come luogo in cui i simbionti si trovano che come condizioni ambientali sotto le quali gli organismi vivono. Vari fattori ambientali, influenzando direttamente le condizioni fisiologiche della pianta, incidono inevitabilmente sull'andamento del rapporto mutualistico, nonché sul tipo e sulla frequenza dei funghi isolati. Tali influenze risultano maggiori passando da un sito di studio ad un altro. Osservando le frequenze dei funghi isolati, si è notata una variazione delle stesse all'aumentare della quota di campionamento, al diminuire dell'umidità ambientale (Sieber, 1988; Fagioli, 1998; Anselmi *et al.*, 2001) e/o al diminuire della densità della chioma, che favorisce maggiori escursioni termiche ed una più veloce eliminazione dell'umidità che si forma intorno alla chioma (Petrini e Carroll, 1981; Legault *et al.*, 1989; Rollinger e Langenheim, 1993; Rodrigues, 1994).

In conclusione si ritiene opportuno riportare in figura 3 un interessante schema di Schulz *et al.* (1999) in cui si tenta di spiegare le modalità con le quali un fungo penetrato nella pianta può comportarsi come endofita (non patogeno) o come patogeno.

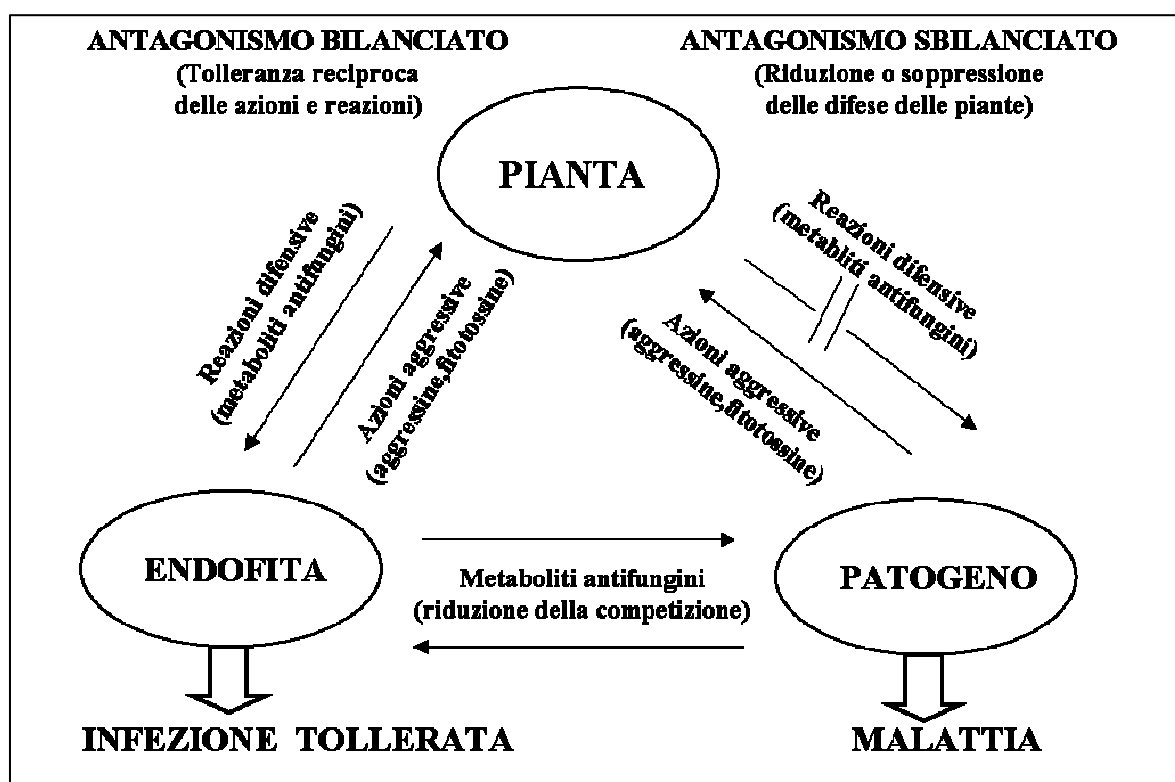


Figura 3. Antagonismo sbilanciato (adattato da Schulz *et al.*, 1999).

È un'ipotesi secondo la quale il patogeno neutralizza o comunque supera le reazioni difensive della pianta fino al punto in cui si sviluppa la malattia, mentre l'endofita tollera le reazioni della pianta fino al punto in cui esso può infettare e colonizzare i tessuti (infezione tollerata).

Se l'antagonismo tra fungo e pianta fosse sbilanciato a favore del fungo l'endofita diverrebbe un patogeno. Qualora altri funghi fossero presenti nella stessa pianta, l'endofita potrebbe potenzialmente limitarne lo sviluppo con metaboliti antifungini. Si tratta tuttavia di una ipotesi. Molto resta da comprendere e chiarire.

Graniti (2002) conclude infatti un suo articolo su "L'endofitismo dei funghi: un adattamento ecologico o un modo di vita?" con l'affermazione "Chiarire le complesse interazioni tra pianta e funghi endofiti ed i meccanismi biochimici e fisiologici che le determinano, così come è avvenuto per i funghi fitopatogeni negli ultimi decenni, rimane uno dei principali obiettivi della ricerca in questo campo".

1.2.3. Endofiti patogeni e deperimento delle piante

Nel fenomeno del deperimento, come abbiamo visto, rivestono un ruolo assai importante, soprattutto nelle fasi finali della manifestazione patologica, alcuni organismi fungini definiti come “patogeni di debolezza”, che possono a buon titolo essere considerati gli agenti causali che determinano la morte delle piante.

Questi devono tale denominazione alla capacità di estrinsecare la loro attitudine parassitaria solo su piante indebolite da stress di diversa natura. Molti di questi sono agenti di cancro corticali.

Soprattutto per molti di questi ultimi patogeni è stato dimostrato come spesso essi siano in grado di vivere, anche per lungo tempo, all'interno dei tessuti delle piante sane senza determinare alcuna manifestazione visibile della malattia (fase di latenza). Soltanto in seguito a particolari stress procedono a colonizzazioni patologiche. Questa caratteristica ha fatto sì che, nella loro fase di latenza (asintomatica), essi siano stati denominati come “endofiti patogeni”.

Una fase di latenza di indeterminata lunghezza (endofitismo) potrebbe rappresentare per essi una vera e propria strategia di sopravvivenza; questo tipo di patogeni, infatti, ricorrendo all'endofitismo avrebbe la possibilità di superare condizioni sfavorevoli allo sviluppo patogenetico quando gli ospiti si trovano in buono stato fisiologico. Inoltre, la presenza endofitica nei tessuti sani renderebbe tali patogeni pronti alla colonizzazione qualora si presentassero condizioni tali da rendere la pianta soggetta al loro attacco.

Fin dai primi studi condotti su questi aspetti è stato notato come gli endofiti patogeni variassero con le aree geografiche e con la natura del bosco. Ad esempio, *Colpoma quercinum* (Pers.) Wallr. e *Amphiorte leiphamia*, pur essendo tra i più comuni endofiti della *Q. robur*, non sono stati tuttavia mai trovati in Inghilterra (Kowalski e Kehr, 1997). Anche *Asterosporium asterospermum*, che è una delle più frequenti specie isolate da *Fagus sylvatica*, non è stato mai riscontrato nelle faggete della Svizzera da Petrini e Fisher (1988), così come *Agyriellopsis caeruleo – atra* v. Höhn, uno dei più frequenti negli isolamenti di Sieber (1988) su *Abies alba* Mill., non è stato affatto osservato da Kowalski e Kehr. Da uno studio effettuato sugli endofiti isolati da tessuti di *Q. ilex* L. (Fisher *et al.*, 1994) di provenienze diverse, è emerso che su individui cresciuti all'interno del proprio areale naturale si trovava una flora endofitica più ospite – specifica di quella presente negli alberi cresciuti fuori areale. Precedentemente (Fisher

et al., 1993) era stata notata una differenza di questo tipo tra gli endofiti isolati da *Eucalyptus nitens* (Deane Maid.) Maid. in Australia e quelli di provenienza inglese, isolati dalla stessa specie. Gli alberi, crescendo fuori dal loro areale naturale, tendono ad essere colonizzati da funghi indigeni e non dai loro simbionti ospite – specifici. Vari studi (Fisher *et al.*, 1994; Collado *et al.*, 1999) confermano che le colonie endofitiche di alberi piantati fuori dal loro areale naturale sono impoverite e costituite da specie diverse da quelle che si trovano negli alberi cresciuti nel loro habitat naturale. Poche sono tuttavia le specie forestali che sono state oggetto di studi specifici sugli endofiti fungini, in particolare sugli endofiti patogeni.

1.2.4. L'endofitismo dei patogeni coinvolti nel deperimento delle querce

Uno dei settori più studiati relativamente agli endofiti patogeni coinvolti nel deperimento delle piante è quello delle querce, in particolare ad opera di studiosi italiani.

Grazie ad un pluriennale Progetto COFIN, del Ministero dell'Università e della Ricerca scientifica, i principali gruppi di ricerca in patologia forestale del nostro Paese hanno affrontato l'argomento, mettendo in particolare in evidenza che:

- numerosi patogeni di debolezza agenti di necrosi corticali coinvolti nel deperimento delle querce si riscontrano anche nei tessuti di piante sane;
- le loro associazioni risultano variare notevolmente con le aree geografiche;
- nel passaggio dalla fase endofitica a quella patogenetica sembrerebbero avere un forte peso gli stress connessi alle prolungate e ripetute siccità, nonché all'inquinamento atmosferico;
- accanto ad endofiti fungini patogeni ne esistono molti a carattere non patogeno, taluni noti antagonisti.

Questa tesi si inserisce proprio nel contesto di questi studi, cercando di contribuire a chiarire alcuni aspetti.

1.3 L'ANTAGONISMO TRA ORGANISMI FUNGINI

Come precedentemente detto, nei tessuti delle piante si trovano svariate specie fungine, di cui solo una parte presenta intrinseco carattere patogeno e può virare dalla fase endofitica a quella patogenetica. Anche tra gli stessi endofiti patogeni il passaggio dalla fase endofitica a quella patogenetica riguarda solo una parte delle infezioni latenti. Ne è

dimostrazione la minore variabilità genetica nelle popolazioni in fase patogenetica riscontrata, ad esempio, per *Biscogniauxia mediterranea* su *Quercus cerris* (Librandi, 2001).

Non è escluso che tra gli endofiti si possano instaurare fenomeni di competizione e di sinergismo che condizionino il concludersi di fenomeni patogenetici. Alla diversificazione comportamentale intraspecifica, con conseguente prevalenza di alcuni genotipi su altri, potrebbero associarsi infatti anche fenomeni di competizione interspecifica, che possono riguardare sia la fase latente che quella patogenetica.

Con questa Tesi si è voluto affrontare anche questo ultimo argomento. Riteniamo pertanto opportuno, in questa introduzione, fare alcuni accenni sui concetti di antagonismo tra gli organismi fungini.

1.3.1. Premessa

Nelle prime fasi della colonizzazione il micelio fungino può svilupparsi in assenza di altri organismi. Con l'espansione del micelio all'interno dei tessuti si ha comunemente una interazione di tipo competitivo.

Keddy (1989) definisce in generale la competizione dal punto di vista ecologico come "l'effetto negativo che un organismo ha su un altro limitando o controllando l'accesso alla disponibilità di risorse".

La competizione è distinta dai macro – ecologisti in "competizione di interferenza" e "competizione di sfruttamento", a seconda della situazione in cui un organismo inibisce un altro. La prima riguarda, di solito, i disturbi tra organismi per lo spazio, come avviene, ad esempio, nell'aduggiamento che subiscono le piante che crescono più lentamente, da parte di quelle dominanti. La competizione di sfruttamento avviene invece quando, ad esempio, un organismo usa una risorsa riducendone di conseguenza la disponibilità per gli altri.

Anche la competizione tra i funghi può essere discussa in questi termini (Lockwood, 1992; Wicklow, 1992), sebbene in alcune occasioni la distinzione non sia molto chiara. Infatti, nel caso dei funghi, l'accesso ai nutrienti va di pari passo con la competizione per il territorio, ed è pertanto difficile separare la competizione di interferenza da quella di sfruttamento.

L'unica situazione in cui la distinzione può essere possibile è quando i funghi non sono legati alla scarsità di risorse e sono liberi di crescere in cerca di nuove risorse organiche (Boddy, 1993; 1999). La competizione fungina può comunque essere suddivisa in due

aspetti: accesso primario alle risorse e difesa da potenziali invasori (Cooke and Rayner, 1984). Il successo nella colonizzazione primaria è determinato da vari fattori: buona dispersione, rapida germinazione delle spore, rapido accrescimento miceliare ed efficiente utilizzo delle risorse disponibili.

In ogni caso le interazioni competitive dipendono dai meccanismi di antagonismo.

Le interazioni antagonistiche si possono manifestare per contatto oppure a distanza, con l'azione di composti volatili, di antibiotici o di prodotti di rifiuto.

L'antagonismo a distanza è attribuito alla presenza di composti volatili o diffusibili (Sonnenbichler *et al.*, 1994).

L'antagonismo per contatto si manifesta ovviamente sia a livello di singola ifa che di micelio. Si possono distinguere due principali tipi di interazione interspecifica: l'interferenza ed il parassitismo (Boddy, 2000).

Le ife di un fungo degenerano e sono rimpiazzate dal micelio dell'altro; su substrato agarizzato c'è una mutua inibizione. Poiché le reazioni variano in dipendenza delle specie, si può supporre uno scambio reciproco di segnali chimici ed un riconoscimento a distanza (Rayner and Webber, 1984).

Le interferenze ifali si manifestano quando un'ifa viene a contatto con un'altra ifa o con una spora e si concludono con la morte (o la degenerazione) dei tessuti venuti a contatto, in seguito ad una sequenza programmata di distruzione citoplasmatica.

Ciò è comune per i basidiomiceti, dove l'esempio più studiato è il binomio *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. e *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jul. (Rayner and Boddy, 1988; Jeffries, 1997), per i risvolti applicativi sul controllo biologico del patogeno.

Il micoparassitismo è il parassitismo di un'ifa nei confronti di un'altra, preceduto solitamente da contatto e riconoscimento dell'ospite tramite interazione di alcune lectine o agglutinin-carboidrati (Jeffries, 1997; Chet *et al.*, 1997).

Questo meccanismo è seguito da penetrazione o appressione e continuo accrescimento sull'ifa dell'ospite o al suo interno.

Le interazioni miceliari fanno variare la morfologia della coltura. Su substrati agarizzati esse formano spesso dei "barrages" stabili resistenti all'invasione, fronti miceliari invasivi, miceli a ventaglio e organi lineari come strutture rizomorfe. In una sola interazione possiamo trovare anche più di un tipo di morfologia delle colonie (Rayner *et al.*, 1995).

Dopo questa fase di cambiamento si ha una ridistribuzione del micelio: distalmente alla zona di interazione si ha una riduzione della densità miceliare, rendendo la colonia più suscettibile all'invasione se la zona di interazione dovesse essere interrotta. Le interazioni in coltura sono spesso accompagnate da produzione di pigmenti inter- ed intracellulari e cambiamenti nell'attività fenolo-ossidasi (Griffith *et al.*, 1994a; White and Boddy, 1992). È apparsa anche una relazione reciproca tra l'attività enzimatica della tironasi e della laccasi associata alla formazione o meno di micelio aereo e marcate differenze nel rilascio di metaboliti idrofobici in estratti provenienti da colture interagenti a differenti stadi di sviluppo (Griffith *et al.*, 1994b; 1994c; 1994d).

L'esposizione di colture di singole specie al composto 2,4-dinitrofenolo comporta profili metabolici e morfologie simili a quelli osservati nelle colture in interazione, quindi l'aggiunta di un inibitore della fenolossidasi nel mezzo di coltura induce un rilascio di metaboliti (Griffith *et al.*, 1994a; Griffith *et al.*, 1994b; Griffith *et al.*, 1994c).

Gli esiti delle *interazioni competitive* possono tradursi sia in una *sostituzione*, quando un fungo conquista il territorio dell'altro, sia in uno stato di *equilibrio*, quando i due funghi rimangono bloccati. A volte si può verificare una parziale sostituzione, inizialmente un fungo conquista il territorio dell'altro ma successivamente segue un blocco, oppure quando entrano l'uno nel territorio dell'altro (Boddy and Rayner, 1983), dando luogo per esempio alle morfologie a ventaglio. A volte si osserva un cambiamento: da una iniziale prevalenza di un fungo si passa alla completa sostituzione da parte dell'altro, spesso in assenza di cambiamenti delle condizioni ambientali.

1.3.2. Ipotesi di antagonismo tra endofiti

Come si ripete, da studi sugli endofiti fungini effettuati nei tessuti di piante arboree, è emerso come molti di questi siano notoriamente patogeni, in genere patogeni di debolezza agenti di necrosi corticali, mentre altri apparirebbero innocui per le piante.

In più casi è emersa peraltro una certa interrelazione (es. incidenza inversamente proporzionale, ecc.) tra i vari endofiti, in particolare tra alcuni apparentemente non patogeni (su piante forestali) e taluni di quelli potenzialmente patogeni (Peng *et al.*, 1992; Gennaro, 1993; Ippolito e Nigro, 1999; Rispoli e Nicoletti, 1999).

Ciò ha fatto pensare a qualche tipo di antagonismo tra i due gruppi di endofiti o perlomeno tra alcune delle specie consociate.

D'altra parte è dimostrato che *Trichoderma viride* Pers. ex Fr., noto antagonista di molte specie patogene, può vivere allo stato endofitico nella corteccia di numerose piante.

Studi condotti a Castelfusano (Anselmi e Mazzaglia, 2005), su piante di leccio diversamente danneggiate dal fuoco, hanno mostrato che la densità di isolamento (% di isolati di una determinata specie fungina rispetto agli isolati totali) dei vari endofiti fungini, patogeni e non, sia piuttosto diversificata da un gruppo di piante all'altro. In tutte le tipologie di piante prese in esame (sane e danneggiate) e in tutti i tessuti esaminati è presente una grande varietà di tipologie fungine a carattere endofitico. Molte di queste sono a carattere non patogeno, quali *Trichoderma viide* Pers. ex Fr., *Cladosporium cladosporioides* (Fresenius) G. A. de Vries, *Acremonium* spp. e *Gliocladium roseum* Bainer, ma molte altre sono notoriamente patogene, tra cui *B. mediterranea*, *Phomopsis quercina* (Sacc.) Höhn., *Pleurophoma cava* (Schulzer) Boerema e *Discula quercina* (Westl.) Arx. Questi ultimi sono tipici agenti di necrosi corticale, di cui le prime notoriamente implicate nel deperimento delle piante.

Biscogniauxia mediterranea, che è il fungo con maggiore incidenza nonché *Phomopsis quercina*, hanno mostrato, ad esempio, una significativa crescente incidenza passando dalle piante sane a quelle danneggiate dall'incendio.

I funghi non patogeni, per contro, sono notevolmente diminuiti passando dalle piante sane a quelle danneggiate. È da sottolineare la riduzione di *Trichoderma viride*, noto antagonista di molti patogeni fungini, che tuttavia risulta aumentare nuovamente nelle piante molto danneggiate. È probabile che l'elevata presenza sulle piante sane di specie fungine non patogene sia biologicamente finalizzata ad una azione antagonista verso gli endofiti patogeni (Ravaioli *et al.*, 2006).

Se questa ipotesi fosse vera, l'endofitismo ed i vari aspetti sopra descritti assumerebbero una grande rilevanza scientifica, biologica e pratica.

Non sarebbe infatti escluso che la latenza di molti endofiti patogeni potrebbe essere condizionata dalla eventuale associazione con taluni endofiti non patogeni, magari a carattere antagonistico.

In futuro si potrebbero intravedere pratiche culturali (es. micorrizazioni artificiali, diradamenti, ecc.) volte a potenziare gli antagonisti a scapito dei patogeni, oppure apporti artificiali diretti di detti endofiti antagonisti.

Quanto detto sopra resta tuttavia al momento una ipotesi: non esistono chiare documentazioni in proposito e gli studi sull'antagonismo sono veramente esigui o nulli.

Con questa tesi intendiamo affrontare, tra l'altro, anche questo argomento.

2. SCOPI DELLE RICERCHE

Come illustrato in premessa, il deperimento del bosco è una malattia ad eziologia complessa dove, su piante indebolite da stress scatenanti di varia natura (siccità, inquinamenti, defogliazioni patologiche), si instaurano attacchi di patogeni di debolezza che aggrediscono progressivamente la pianta fino a portarla a morte. Numerosi di tali patogeni opportunistici sono agenti di necrosi corticali.

Studi recenti hanno dimostrato che molti di questi ultimi patogeni risultano presenti anche in piante sane, allo stato asintomatico, endofitico, e passano allo stato patogenetico solo quando si innescano fenomeni di deperimento o di particolare stress.

Nei tessuti sani degli alberi, tuttavia, insieme a detti endofiti patogeni ne sono stati riscontrati numerosi altri non patogeni, variamente associati tra loro, diversi dei quali rappresentati da specie note per il loro antagonismo verso patogeni.

In qualche caso è sembrato che alcuni di tali endofiti fungini presentassero aspetti di reciproca interdipendenza, nel senso che all'aumentare dell'incidenza di uno o di alcuni corrispondeva una diminuzione di un altro o di altri, in particolare tra specie patogene e specie non patogene.

Di qui l'ipotesi che tra le varie specie fungine che vanno ad associarsi allo stato endofitico nelle piante arboree possano instaurarsi fenomeni di antagonismo, con ripercussioni, in quelli patogeni, sul viraggio dalla fase endofitica a quella patogenetica. Risulta una ipotesi biologicamente affascinante, che deve essere però dimostrata, così come necessitano chiarimenti su vari altri aspetti ancora oscuri che le fanno da contorno. Ci si riferisce, ad esempio, alle tipologie fungine, patogene e non, ed alla loro rispettiva numerosità, che vanno ad associarsi endofiticamente nelle piante ed all'influenza verso gli stessi da parte degli organi, dell'individuo, della specie ospite, della stazione e delle caratteristiche selvicolturali e sanitarie del bosco.

Al fine di apportare chiarimenti su questi aspetti e verificare gli eventuali fenomeni di antagonismo tra le varie specie endofite, nel 2003 è partito un Progetto Nazionale di Ricerca, "Endofitismo e controllo biologico naturale di patogeni coinvolti nel deperimento della quercia", cofinanziato dal Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica, in cui ha collaborato anche l'Unità Operativa del Dipartimento di Protezione delle Piante dell'Università degli Studi della Tuscia, sotto il coordinamento del Prof. Anselmi.

Le osservazioni sul comportamento reciproco dei vari endofiti fungini avrebbero potuto favorire la comprensione di eventuali fenomeni di freno o di stimolo al passaggio dalla fase asintomatica (endofitica) a quella patogenetica, sintomatica, spiegare le fluttuazioni che spesso le varie specie o le loro associazioni sembrano avere nel tempo, offrire spunti per mirati interventi di lotta, in particolare quelli di tipo selvicolturale.

Le ricerche di questo lavoro si inseriscono in tali programmi, con l'intento di andare ad indagare sugli endofiti relativi a zone dell'Italia centrale.

Più precisamente, con questa tesi si è cercato di condurre ricerche sulle diversificazioni che caratterizzano le associazioni endofitiche in piante di quercia al variare della specie ospite o delle condizioni stazionali e sui relativi fattori condizionanti, distinguendo gli endofiti patogeni da quelli non patogeni, e di verificare in laboratorio eventuali fenomeni di antagonismo tra varie specie dei due gruppi. Un particolare riguardo è stato rivolto a *Biscogniauxia mediterranea*, il patogeno di debolezza apparentemente tra i più coinvolti nei deperimenti delle querce negli ambienti mediterranei.

Nello specifico, esaminando piante asintomatiche di *Quercus* spp., con queste indagini si è inteso apportare chiarimenti sui condizionamenti da parte (1) dei vari organi della pianta (gemme, rametti di età diversa), (2) della specie ospite, (3) dello stato sanitario del bosco (senza o con fenomeni di deperimento) e (4) delle condizioni ambientali della stazione (con particolare riferimento a quelle correlate con l'altitudine), nei confronti delle associazioni e dell'incidenza dei diversi endofiti, patogeni e non patogeni, che si vanno ad instaurare nelle piante (5) verificando *in vitro* gli eventuali fenomeni di antagonismo tra alcune delle più rappresentative specie dei due gruppi.

Più in dettaglio, con riferimento alle querce dell'Italia Centrale, considerando piante asintomatiche, scopi delle nostre ricerche erano quelli di:

- a) indagare sull'incidenza e sulle associazioni dei vari endofiti fungini, patogeni e non, in organi diversi delle piante;
- b) rilevare l'influenza delle condizioni ambientali o dello stato di "salute" del bosco sull'incidenza e le associazioni dei vari endofiti fungini, patogeni e non, nelle piante;
- c) studiare in dettaglio l'andamento della reciproca incidenza di qualche importante endofita fungino nel tempo in funzione delle condizioni climatiche;
- d) valutare l'incidenza e le associazioni degli endofiti fungini, patogeni e non, che si vanno ad insediare sulle varie specie di *Quercus*, anche in relazione allo stato di salute del bosco;

- e) valutare *in vitro* eventuali fenomeni di antagonismo tra i vari endofiti, mettendo a confronto le principali specie non patogene riscontrate con alcune patogene scelte tra quelle risultate più frequenti.

3. MATERIALI E METODI

In relazione agli scopi prefissi, questa Tesi di Dottorato è articolata in due linee di ricerca, condotte più o meno in successione o in parallelo tra loro: una sulle associazioni e sull'incidenza degli endofiti, patogeni e non, nella pianta ed una sugli eventuali fenomeni di antagonismo tra gli stessi.

3.1 STUDI SULL'INCIDENZA E SULLE ASSOCIAZIONI DEGLI ENDOFITI

Con questo gruppo di studi, prendendo in esame piante sane di *Quercus* in zone dell'Italia Centrale, si è indagato sulle associazioni e sull'incidenza dei vari endofiti, patogeni e non, in relazione alla dislocazione geografica (condizioni pedoclimatiche) ed ai trattamenti selvicolturali del bosco ed alle specie diverse di *Quercus*. Con uno studio più in dettaglio è stata seguita l'incidenza di alcuni endofiti patogeni nel tempo in relazione alle condizioni climatiche.

3.1.1. Endofiti fungini in diverse situazioni ambientali

Per studiare l'andamento delle associazioni endofitiche in dipendenza di diverse condizioni ambientali, si è deciso di effettuare una serie di campionamenti secondo un gradiente altitudinale.

In particolare, su segnalazione del Corpo Forestale dello Stato, sono state scelte sei stazioni che andassero dal livello del mare e zone di pianura del litorale laziale, fino alle massime altitudini in cui alligna *Q. cerris*, lungo le pendici del Monte Terminillo e (per le quote più alte) delle aree montane del Parco Nazionale, in Abruzzo.

Più precisamente, le stazioni considerate sono: 1) Sabaudia – 17 m. s.l.m. (Latina), 2) Cori – 380 m. s.l.m. (Latina), 3) Monteflavio – 880 m. s.l.m. (Roma), 4) Castro dei Volsci – 96 m. s.l.m. (Roma), 5) S. Gregorio – 942 m. s.l.m. (Roma), 6) Greccio – 1000 m. s.l.m. (Rieti); 7) Ortolano – 1050 m. s.l.m. (L'Aquila), 8) Passo delle Capannelle – 1300 m. s.l.m. (L'Aquila).

Per ogni area, con l'ausilio del Corpo Forestale dello Stato, sono state effettuate ripetute ricognizioni stimando visivamente le condizioni fitosanitarie del bosco tramite l'attribuzione, a ciascuna di 20 piante scelte casualmente nell'area (circa 1 ettaro), di un "indice di deperimento" basato sulla scala di valutazione UE (da 0 = sana a 4 = morta), come riportato nelle tabelle 1 e 2. Poiché le aree considerate comprendevano boschi

Tabella 1. Scale di valutazione indicate dalle norme comunitarie per i rilievi dei parametri fitosanitari su piante forestali (Eichorn *et al.*, 1996 e 2004).

Classe di defogliazione	% di fogliame perso	Grado di defogliazione
0	0 - 10 %	Nessuno
1	> 10 - 25 %	Debole
2	> 25 - 60 %	Moderato
3	> 60 %	Severo
4	100%	Piante morte
Classe di decolorazione fogliare	% di fogliame decolorato	Grado di decolorazione
0	0 - 10 %	Nessuno
1	> 10 - 25 %	Debole
2	> 25 - 60 %	Moderato
3	> 60 %	Severo
4	100%	Piante morte
Classe di danno al tronco ed alle branche	% di tessuto morto	
0	0-10%	
1	11-20%	
2	21-40%	
3	41-60%	
4	61-80%	
5	81-99%	
6	100 (piante morte)	

Tabella 2. Indice di deperimento calcolato combinando i dati di defogliazione e decolorazione della chioma di cui alla tabella 2 (Eichorn *et al.*, 1996 e 2004).

		Decolorazione				
		0	1	2	3	4
Defogliazione	0	0	0	1	2	
	1	1	1	2	2	
	2	2	2	3	3	
	3	3	3	3	3	
	4					4

0 =

Piante senza deperimenti, 1 = deperimento debole,
2 = deperimento consistente, 3 = deperimento forte, 4 = pianta morta.

senza rilevanti fenomeni di deperimento, sono state aggiunte alle osservazioni anche tre stazioni del Lazio, a diversa altitudine, in cui il fenomeno è apparso di una certa rilevanza. Più precisamente, sono state considerate le stazioni di Castel Porziano (Roma), in un bosco di querce caducifoglie a 5 m. s.l.m.; di Tre Croci (Viterbo), in un bosco misto di cerro e roverella a 320 m. s.l.m.; di Monte Rufeno (nelle vicinanze di Acquapendente – Viterbo), ancora in un bosco misto di cerro e roverella a 600 m. s.l.m. (Figura 4).

Le più salienti caratteristiche stazionali, fitosociologiche, selvicolturali dei boschi presi in considerazione sono sintetizzate nella tabella 3, dove, nell’ultima colonna, è indicato altresì l’indice di deperimento del bosco.

Nelle tabelle 4 e 5 sono riportate le caratteristiche stazionali, fitosociologiche e selvicolturali dei boschi rispettivamente senza e con deperimenti. Per snellire e favorire la lettura del testo, le schede più dettagliate di ciascuna stazione, unitamente ad alcuni rappresentativi grafici di Bagnouls – Gaussen, sono riportate in coda alla Tesi, nell’Allegato 1.

3.1.2. Endofiti patogeni nel tempo

Poiché *Biscogniauxia mediterranea* e *Discula quercina* in più casi hanno mostrato un andamento apparentemente inverso, per verificare tale aspetto e comprenderne il significato, sono stati condotti nel tempo studi appositi, integrandoli con dati raccolti anche in anni precedenti.

Dette indagini sono state condotte nei querceti della Riserva Naturale di Monte Rufeno, area forestale sita nel Comune di Acquapendente, in provincia di Viterbo, al confine con la Toscana, da anni sotto osservazioni da parte del Dipartimento di Protezione delle Piante.

Più precisamente, per ogni data, considerando quattro piante asintomatiche di *Quercus cerris* di una trentina d’anni, site nella medesima area (pianoro sui 600 m. s.l.m.), nel mese di Maggio e Novembre, nella zona mediana della chioma, sono stati annualmente prelevati 10 rametti di un anno e 5 rametti di tre anni di età, da cui si è proceduto ad isolamenti *in vitro*.

Di tutti gli anni sono stati raccolti i dati climatici giornalieri relativi alle temperature minime, medie e massime ed alle precipitazioni.

Figura 4. Localizzazione geografica dei boschi oggetto di studio per l'analisi delle associazioni e dell'incidenza di endofiti, patogeni e non, su piante asintomatiche di *Q. cerris*.

LAZIO

a) Deperimenti modesti

1. Sabaudia (LT), m. 17 s.l.m.
2. Castro dei Volsci (RM), m. 96 s.l.m.
3. Cori (LT), m. 380 s.l.m.
4. Monte Flavio (RM), m. 880 s.l.m.
5. S. Gregorio (RM), m. 942 s.l.m.
6. Greccio (RI), m. 1000 s.l.m.
7. Ortolano (AQ), m. 1050 s.l.m.
8. Capannelle (AQ), m. 1300 s.l.m.

b) Deperimenti rilevanti

9. Castel Porziano, m. 5 s.l.m.
10. Tre Croci, m. 320 s.l.m.
11. Monte Rufeno, m. 650 s.l.m.

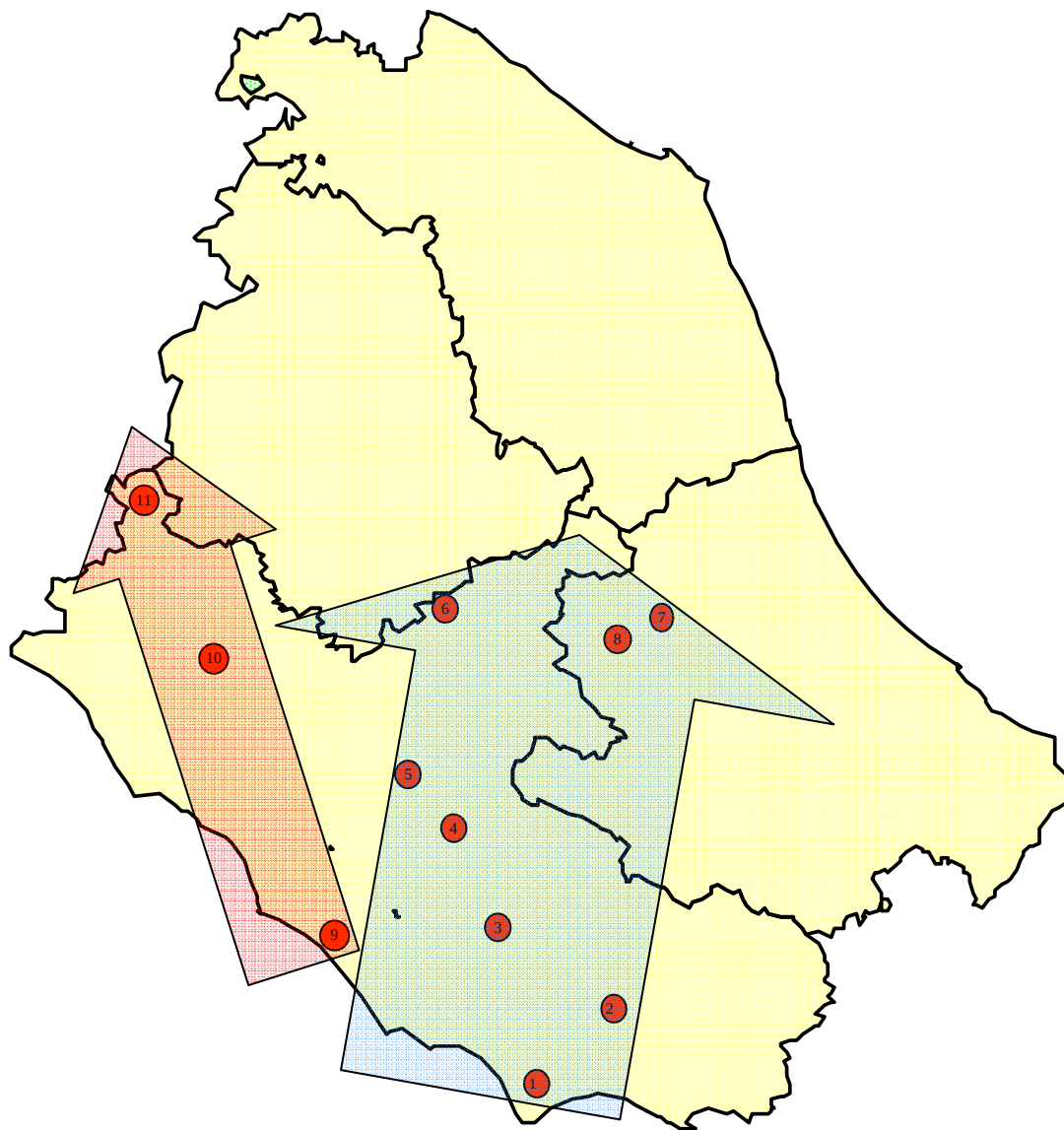


Tabella 3. Localizzazione stazionale, caratteristiche selvicolturali e grado di deperimento dei boschi oggetto di studio per l'analisi delle associazioni e dell'incidenza di endofiti, patogeni e non, su piante asintomatiche di *Q. cerris*.

LOCALIZZAZIONE					CARATTERISTICHE SELVICOLTURALI			DEPERIMENTI	
LOCALITÀ	COMUNE	PROV	QUOTA m. slm	ESPOSIZ.	GOVERNO	SPECIE	ETÀ	INDICE	GRADO
Sabaudia	Sabaudia	LT	17	-	fustaia	cerro, farnia	var.	0,8	TENDENZIALMENTE NULLO
Castro Volsci	Amaseno	FR	96	S-O	ceduo invecchiato	cerro	var.	0,5	
Cori	Cori	LT	380	S	ceduo invecchiato	cerro, roverella	50	0,1	
Monte Flavio	Palombara Sabina	RM	880	N	fustaia	cerro	50	0,2	
S. Gregorio	S. Gregorio	RM	942	S-O	fustaia	cerro, faggio	var.	0,1	
Greccio	Greccio	RI	1000	S-O	fustaia	cerro	25	0,2	
Ortolano	Campotosto	AQ	1050	N-E	avv. alto fusto	faggio, cerro	var.	0,3	
Capannelle	Campotosto	AQ	1300	-	fustaia	faggio, cerro	var.	0	
Castel Porziano	Roma	RM	5	-	ceduo invecchiato	cerro, farnia e roverella	35	2,5	RILEVANTE
Tre Croci	Tre Croci	VT	320	S	ceduo invecch.	cerro, roverel.	var.	3,5	
Monte Rufeno	Acquapendente	VT	650	S-O	ceduo invece.	cerro, roverel.	40	3,6	

Tabella 4. Caratteristiche stazionali, fitosociologiche e selvicolturali dei boschi senza deperimenti.

Parametri stazionali e fitosociologici	Stazione	Sabaudia (LT)	Castro dei Volsci (FR)	Cori (LT)	Monte Flavio (RM)	San Gregorio (RM)	Greccio (RI)	Ortolano (AQ)	Passo delle Capannelle (AQ)
	Altitudine (m. slm)	17	96	380	880	942	1000	1050	1300
	Struttura d'appartenenza	Parco Nazionale del Circeo	Parco Regionale dei Monti Aurunci	Comunità montana dei Monti Lepini	Parco Regionale dei Monti Lucretili	Area Protetta	Com. montana dei Monti Sabini	Parco Nazionale d'Abruzzo	Parco Nazionale d'Abruzzo
	Fascia fitoclimatica	Lauretum	Lauretum	Lauretum	Castanetum freddo	Fagetum	Fagetum	Fagetum	Fagetum freddo
	Suolo	Tendenzialment e argilloso	Tendenzialmente argilloso	Tendenzialmente argilloso	Profondo argilloso	Scheletro affiorante	Tendenzialmente argilloso	Scheletro affiorante su matrice argillosa	Scheletro affiorante
	Fitocenosi	Bosco misto con cerro e farnia	Bosco misto con cerro e leccio sottobosco Prunetalia	Bosco misto roverella e cerro	Cerreta pura con sottobosco di <i>Sorbus</i>	Bosco misto cerro e faggio	Bosco misto roverella e cerro	<i>F. sylvatica</i> – <i>Q. cerris</i> (pochi)	Prati – <i>Q. cerris</i> (qualche pianta)
Parametri selvicolturali	Età (anni)	50	10/15	50	40/ 50	40/50	50	varia	varia
	Altezza (m)	15	15	10	15	10	15	varia	varia
	Diametro (cm)	7	6	8	6/7	7	8	vario	vario
	Governo	fustaia	ceduo	ceduo invecchiato	fustaia	fustaia	fustaia	avv. alto fusto	fustaia
	Densità del soprassuolo	media	rada	media	rada	media	media	media	media

Tabella 5. Caratteristiche stazionali, fitosociologiche e selvicolturali dei boschi con deperimenti.

Parametri stazionali e fitosociologici	Stazione	Castel Porziano (RM)	Tre Croci (VT)	Monte Rufeno (VT)
	Altitudine (m. slm)	5	320	650
	Struttura d'appartenenza	Tenuta Presidente della Repubblica	Comune Vetralla	Riserva Naturale
	Fascia fitoclimatica	Lauretum caldo	Lauretum freddo	Castanetum
	Suolo	Profondo	Scheletro affiorante	Scheletro affiorante
	Fitocenosi	cerro, farnia, leccio, roverella	cerro roverella	cerro roverella
Parametri selvicolturali	Età (anni)	35	var.	40
	Altezza (m)	14	13	15
	Diametro (cm)	10	9	12
	Governo	ceduo invecchiato	ceduo invecchiato	ceduo invecchiato
	Densità del soprassuolo	media	alta	alta

3.1.3. Endofiti fungini su specie diverse di *Quercus*

Le indagini sono state condotte nella primavera del 2005, nella Tenuta Presidenziale di Castel Porziano (RM), in un'area senza manifestazioni di deperimenti, considerando 5 specie del genere *Quercus*, in particolare: *Quercus cerris* L., *Q. ilex* L., *Q. pubescens* Willd., *Q. robur* L. e *Q. suber* L., e in un'area con deperimenti, considerando le quattro specie *Quercus cerris*, *Q. pubescens*, *Q. robur* e *Q. suber* (*Q. ilex* non presentava il fenomeno).

Le specie scelte sono rappresentative di tutte le formazioni quercine dell'Italia centrale. Nello specifico, la stazione è caratterizzata da clima mitigato dalla vicinanza del mare (5 – 10 m. s.l.m.), suoli profondi ma soggetti a variazione del livello di falda. In particolare, nell'area senza deperimenti è stato preso in considerazione un bosco misto di latifoglie, ceduo invecchiato, comprendente miste tra loro le tre specie di querce caducifoglie, una lecceta, recentemente avviata ad alto fusto, ed una sughereta, fustaia, entrambe limitrofe al precedente.

Similmente, nell'area con deperimenti è stato preso in considerazione un bosco misto di querce caducifoglie ed una limitrofa sughereta.

3.1.4. Metodologia di isolamento e di identificazione specifica

Scelta delle piante. In ciascuna stazione è stata individuata una parcella di circa 400 m², in cui sono state individuate, *at random*, le quattro piante di quercia della specie di *Quercus* considerata, possibilmente coetanee (età possibilmente corrispondente a quella media del bosco), tutte asintomatiche (in buono stato vegetativo, chiaramente non senescenti), contrassegnandole attraverso opportune targhette plastificate.

Prelievo dei campioni. Per ogni stazione e per ogni specie, dalla parte medio – basale della chioma di ogni pianta, sono stati prelevati 10 rametti di un anno e 5 rametti di tre anni d'età.

Conservazione dei campioni. La conservazione *ex situ* dei campioni è una delle operazioni più delicate poiché da questa procedura dipende la buona riuscita delle successive fasi. Ogni campione selezionato è stato immediatamente conservato all'interno di sacchetti trasparenti di polietilene, chiusi con nastro adesivo, contenenti un'etichetta cartacea su cui sono state menzionate: nome della località, data di raccolta, numero della pianta.

Tutti i reperti campionati appartenenti ad una medesima stazione sono stati posti successivamente all'interno di buste di maggiori dimensioni. Trasportate nei laboratori del Dipartimento di Protezione delle Piante e poste all'interno di una cella frigo alla temperatura di 4°C. Gli isolamenti sono in genere avvenuti entro 48 ore della raccolta.

Isolamento. Dopo aver eliminato le eventuali foglie ed aver ben lavato il materiale con acqua distillata, ogni campione è stato sterilizzato, sotto cappa a flusso verticale, con immersione successiva (Fröhlich *et al.*, 2000.) in tre soluzioni: un minuto in etanolo (C₂H₅OH) al 75%, tre minuti in ipoclorito di sodio (NaClO₂, 7% di Cloro attivo) al 50% e trenta secondi in etanolo (C₂H₅OH) al 75%. Successivamente i campioni sono stati due volte risciacquati in vaschette con acqua deionizzata, preventivamente sterilizzata in autoclave (121 °C per venti minuti). Attraverso bisturi da laboratorio sono stati allestiti i campioni per l'isolamento *in vitro*: 20 gemme (prelevate dai rametti di un anno), prestando attenzione ad eliminare le perule; 20 frammenti (piccoli cilindretti, a circa 1 cm l'uno dall'altro di 3 mm di lunghezza) dai rami del 1° anno d'età; 20 frammenti di corteccia (5 mm x 3 mm x 2 mm, sempre a distanza di circa 1 cm l'uno dall'altro) dai rami di 3 anni. In totale sono stati considerati 60 campioni per ogni singola pianta della medesima area.

Infine il materiale sterilizzato è stato posto in piastre Petri con substrato di PDA (potato – agar – destrosio) contenente streptomina (0,06 grammi per litro), al fine di inibire lo sviluppo di batteri. Sulle piastre è stato indicato: n° pianta campione, tessuto e numero progressivo del frammento. Ad operazione ultimata, tali campioni sono stati posti, al buio, nel termostato, ad una temperatura di 25 °C, con umidità relativa del 100%.

Identificazione specifica. Dai miceli sviluppati dai singoli frammenti si è proceduto a successivi reisolamenti, fino ad ottenere per ogni tipo di micelio una coltura in purezza. Le varie colonie sono state indi sottoposte ad osservazioni, raggruppandole in tipologie, considerando in un'unica tipologia tutte quelle ritenute tra loro pressoché identiche nelle varie caratteristiche. Le varie osservazioni delle colture pure sono state condotte inizialmente allo stereoscopio e/o al microscopio ottico per trasparenza, spesso previ trattamenti e/o allevamenti in condizioni selettive (sviluppo in alternanza di luce; a temperature differenti; su substrati selettivi, ecc.) per una induzione artificiale delle fruttificazioni.

Tramite le osservazioni allo stereoscopio, si è proceduto al rilievo di:

1. pigmentazione della colonia, rilevata sia dalla parte superiore che dal rovescio della piastra;
2. sviluppo ed aspetto della colonia. Micelio sommerso e/o aereo. Colonie piatte, aderenti al terreno, bombate, ondulate; con superficie regolare, eterogenea, disegni ed ornamenti particolari, come cerchi concentrici, settori circolari crateri e pieghe; aspetto opaco, vischioso, polverulento, vellutato, lanoso, fascicolato, infeltrito, fioccoso. Presenza sulla superficie di gocce d'essudati, limpide o colorate, localizzate nella parte centrale e/o marginalmente;
3. fruttificazioni. Tipo degli apparati di moltiplicazione e loro disposizione sul substrato; colore e caratteristiche dell'apparato conidiogeno, suo modo di ramificarsi, disposizione dei conidi (isolati, in catene, a grappoli). Modo di apparire degli organi di riproduzione: singoli o con crescenti, isolati o raggruppati, ammassati, a catena, sferici, schiacciati, crateriformi, a forma irregolare.

Le osservazioni al microscopio ottico per trasparenza sono state rivolte a frammenti di micelio ed eventuali fruttificazioni, ife conidiogene, spore, conidi, ecc. Nel caso di corpi fruttiferi (es. picnidi), questi sono stati schiacciati sul vetrino portaoggetti per rilevare eventuali strutture ed ife interne e far fuoriuscire conidi o spore.

La determinazione del genere e/o della specie di ciascuna tipologia fungina è stata effettuata confrontando i caratteri macro e microscopici rilevati, con tabelle, disegni e schemi riportati in testi di riferimento (Barnett and Hunter, 1972; Lanier *et al.*, 1976; Carmichael *et al.*, 1980; Arx, 1981; Ellis and Ellis, 1985; Williams Woodward, 2001) o con parametri utilizzati dal Dipartimento di Protezione delle Piante. In alcuni casi dubbi, l'identificazione è stata possibile ricorrendo ad analisi molecolare (sequenziamento del DNA ribosomiale e confronto con sequenze presenti in database internazionali).

Quantificazione delle tipologie fungine. La quantificazione dei singoli generi e specie o (in caso di mancata identificazione sistematica) tipologie fungine è avvenuta considerando due parametri distinti: la frequenza d'isolamento e la densità d'isolamento.

- Per frequenza d'isolamento s'intende la percentuale d'isolati di una determinata tipologia rispetto al numero di campioni totali posti ad incubare. Essa è stata considerata globale o totale, quando riferita alla stazione; relativa, quando riferita ad un organo o ad una pianta.

- Per densità d'isolamento s'intende il numero d'isolati di una tipologia di fungina (genere o specie) rispetto al numero d'isolati totali.

I valori di suddetti parametri sono stati indici mediati, calcolando quando possibile la deviazione standard, facendo riferimento (per singolo organo o per l'insieme mediato degli organi) alla singola pianta, oppure a tutte le piante di un singolo sito.

3.1.5 Rilievo dati climatici

I dati climatici sono stati ottenuti tramite i bollettini metereologici redatti dall'UCEA (Bollettino Agrometereologico nazionale), dall'Arsial (Agenzia Regionale per lo Sviluppo ed Innovazione dell'Agricoltura Lazio) e dall'ARSSA per la regione Abruzzo. Le stazioni metereologiche di riferimento sono: 1 – Borgo San Michele indicativa per le aree esaminate in provincia di Latina; 2 – San Gregorio da Sassola indicativa per le stazioni limitrofe a Roma; 3 – Rieti indicativa per Greccio; 4 – Castel Porziano per la bassa pianura limitrofa a Roma; 5 – Acquapendente per i dati di Acquapendente nell'Alto Lazio. La stazione di riferimento dell'Abruzzo è quella di Isola Gran Sasso (TE).

I dati relativi alla stazione di Monte Rufeno, rilevati nella attigua area Con.Eco.For., sono stati forniti dal Corpo Forestale dello Stato.

Per il periodo dicembre 2005 – novembre 2006, i dati relativi alla zona di Acquapendente sono stati forniti dall'Ufficio Idrografico e Mareografico della Regione Lazio.

3.1.6 Analisi dei dati.

I dati ottenuti nelle varie tipologie di indagine riguardanti le associazioni tra gli endofiti fungini su *Quercus* spp. sono stati sottoposti ad analisi statistica.

Il calcolo della deviazione standard è stato effettuato all'interno delle varie categorie mediate.

Per rilevare la diversità di specie riscontrata nelle varie situazioni si è ricorso all'analisi della ricchezza di specie, della dominanza e del livello di diversità.

L'analisi è stata effettuata impiegando l'indice di Margaleef definito come:

$$d = (S - 1) / \log N$$

dove S è il numero di specie fungine isolate ed N è il numero totale di colonie.

Il valore dell'indice cresce se il numero di specie è grande rispetto al numero di individui. Il valore teorico massimo è 1 ($S = N$).

Per valutare il livello di diversità tra le associazioni è stato utilizzato l'indice di Shannon, calcolato come:

$$H = - \sum P_i \log P_i$$

dove: $P_i = n_i/N$ = probabilità di importanza di ciascuna specie, n_i = dimensione di ciascuna specie, N = dimensione della comunità.

H è solitamente compreso tra 0 e 4 (Magurran, 1988). A parità di numero di specie, il valore cresce al crescere dell'eterogeneità; a parità di eterogeneità, cresce al crescere del numero di specie.

Per evidenziare l'influenza del grado di deperimento dei vari boschi sulla sull'incidenza dei vari endofiti patogeni nelle piante asintomatiche, sono state effettuate opportune correlazioni tra l'indice di deperimento dei singoli boschi ed il numero di colonie di endofiti fungini di volta in volta ricavate.

3.2 STUDI *IN VITRO* SULL'ANTAGONISMO TRA ENDOFITI FUNGINI, PATOGENI E NON

Gli studi sono stati condotti *in vitro*, prendendo in considerazione specie fungine, patogene e non, risultate tra le più ubiquitarie e frequenti nelle sopra menzionate ricerche, tenendo presenti i programmi (ed evitando ripetizioni) del menzionato Progetto PRIN – COFIN (vedi pag. 26) nell'ambito del quale la Tesi era inserita.

3.2.1. FUNGHI ESAMINATI

Per queste prove, ad integrazione delle indagini condotte dalle altre Unità Operative del suddetto Progetto PRIN, sono stati considerati tre dei patogeni che dalle suesposte nostre ricerche sono risultati tra gli endofiti più ricorrenti, e precisamente:

1. *Biscognauxia mediterranea*: fungo mitosporico, delle *Hyphales*; agente di cancro corticali, in grado di colonizzare i tessuti di tutte le cerchie vitali del fusto; ritenuto il patogeno opportunistico più importante nel deperimento delle querce nelle aree mediterranee.
2. *Coryneum quercinum*: caratterizzato da acervuli (*Melanconiaceae*); agente di cancro corticali esterni, rari sul tronco, più frequenti sui rametti; con frutificazioni piuttosto sporadiche.
3. *Pleurophoma cava*: caratterizzata da picnidi (*Sphaeropsidaceae*); con ruolo poco conosciuto nel fenomeno deperimento.

Detti patogeni sono stati messi a confronto con otto endofiti fungini non patogeni, scelti tra i più frequenti nei suddetti monitoraggi. Essi sono: 1) *Acremonium* sp., 2) *Aureobasidium pullulans* (De By.) Arnaud, 3) *Cladosporium cladosporioides* (Fresenius) G. A. de Vries, 4) *Epicoccum nigrum* Link., 5) *Gliocladium roseum* Bainer, 6) *Penicillium* sp., 7) *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. e 8) *Verticillium lecanii* (Zimm.) Végas.

È stato altresì fatto un confronto incrociato, coppia a coppia, per valutare eventuali reciproci antagonismi tra le tre specie patogene, considerando in particolare coppie di specie, quali, ad esempio, *B. mediterranea* e *D. quercina*, la cui incidenza, come si ripete, è sembrata avere un andamento opposto.

Per rendere più scorrevole l'analisi di questa tesi, una succinta descrizione degli organismi utilizzati nelle prove, con maggiori dettagli per le specie ritenute più interessanti, è riportata in appendice, nell'allegato 2.

3.2.2. METODOLOGIA

Le prove di antagonismo sono state condotte ricorrendo sia a colture duali che all'utilizzo di filtrati colturali degli antagonisti, addizionati al substrato.

3.2.2.1. Substrati utilizzati

Nelle colture duali, per la crescita dei funghi sono state utilizzate piastre Petri contenenti PDA (potato dextrose agar), in quantità di 39 grammi per litro.

Per ottenere i filtrati colturali è stato usato Czapek dox liquid medium, un terreno liquido a base azotata, costituito da: Nitrato di sodio, cloruro di potassio, magnesio, solfato di ferro, solfato di potassio e zucchero, il pH è neutro (6.8 ± 0.2). Esso è stato utilizzato in quantità di 33 grammi per litro.

Prima dell'inoculazione, le beute contenenti il terreno liquido sono state sterilizzate in autoclave a 121°C per 15 minuti.

3.2.3.2. Modalità

3.2.3.2.1 Colture duali

I saggi sono stati effettuati in capsule Petri di 15 cm di diametro, nelle quali, ad una distanza di 45 mm tra loro, sono stati inseriti 2 dischetti (4 mm di diametro) di micelio prelevati da una giovane colonia che aveva appena ricoperto la capsula Petri (dei due funghi posti a confronto).

Le capsule così preparate venivano poi inserite nel termostato a 20°C per favorire la crescita dei funghi. Ogni giorno sono state prese le misure di crescita (mm), nelle quattro direzioni, fino al contatto tra i due miceli.

L'inibizione è stata valutata sulla base di un "indice di inibizione" (Ii), calcolato a mezzo della seguente formula:

$$Ii = [(R-r) / R] \times 100$$

Dove:

R: Media degli accrescimenti del patogeno nelle 3 altre direzioni (in alto, in basso e verso la direzione opposta all'antagonista);

r : Media degli accrescimenti del patogeno nella direzione verso l'antagonista.

L'antagonismo dei vari funghi è stato valutato anche attraverso un indice calcolato secondo Badalyan *et al.* 2002 (modificato), che prevede l'attribuzione di valori diversi a seconda del tipo di interazione che si verifica tra le colonie duali saggiate: valore 1 = inibizione per contatto miceliare = interazione di tipo A; 2 = inibizione a distanza (tipo B); 3 = crescita dell'antagonista sulla colonia del patogeno (tipo C). A queste vanno aggiunte le possibili combinazioni fra le interazioni A e C e fra quelle B e C, con valori di: 3,5 = parziale sovracrescita dell' antagonista sul patogeno dopo blocco iniziale per contatto (interazione CA1); 4 = parziale sovracrescita dell'antagonista sul patogeno dopo blocco iniziale per a distanza (CB1); 4,5 = completa sovracrescita della colonia antagonista su quella del patogeno dopo blocco iniziale per contatto (CA2); infine, 5 = completa sovracrescita dell'antagonista sul patogeno dopo blocco iniziale a distanza (CB2). Nel caso delle interazioni di tipo B (valore assegnato pari a 2) si assegnano poi dei valori aggiuntivi: +1 quando la zona di inibizione è compresa fra 5 e 10 millimetri, +2 quando la stessa è superiore a 10 mm.

3.2.3.2.2. Filtrati culturali

Le prove di crescita di ciascun patogeno sono state condotte mescolando al substrato agarizzato il filtrato culturale dell'antagonista in tre diversi rapporti, e precisamente: 1:1; 1:3 e 3:1.

È stato quindi seguito lo sviluppo delle colonie del patogeno, misurandone quotidianamente il diametro e conducendo osservazioni sul loro aspetto e su eventuali alterazioni morfologiche delle ife, in confronto con quelle testimoni.

3.2.3. OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM)

Per le colture duali caratterizzate da evidenti comportamenti antagonistici, al fine di rilevare il tipo di interazione miceliare tra le colonie, sono state effettuate osservazioni al microscopio elettronico a scansione (SEM).

Le osservazioni sono state condotte utilizzando il SEM - Jeol JSM-5200, in dotazione al Centro Interdipartimentale di Microscopia Elettronica (CIME) dell'Università degli studi della Tuscia, con la collaborazione del personale tecnico ad esso preposto.

I campioni utilizzati per le osservazioni sono stati ricavati tenendo conto della necessità che essi non superassero le dimensioni di partenza di 0,5 cm di lato e circa 0,5 di profondità, dalle piastre di riferimento.

Le osservazioni sono state precedute dal processo di metallizzazione con oro, sottovuoto, che prevede una successione di particolari trattamenti.

Il protocollo utilizzato per tale preparazione dei campioni è il seguente:

- 1) fissazione in glutaraldeide (5% glutaraldehyde) diluita in un tampone di fissazione (cacodylate sucrose buffer 0.1 M: 0.1 M sucrose; 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7.2) per 12 ore a 4 °C;
- 2) lavaggio nel tampone di fissazione di cui sopra a 4 °C;
- 3) fissazione in tetrossido di osmio (1% OsO₄ in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2) per 3 ore a 4 °C;
- 4) lavaggio nel suddetto tampone di fissazione per 1 ora a 4 °C;
- 5) disidratazione a temperatura ambiente, con passaggi in successione di 15 minuti in etanolo al 30%, al 50% ed al 70%; infine, passaggio in etanolo al 100% per 1 ora a temperatura ambiente;
- 6) rimozione dei residui di etanolo ed essiccazione del preparato mediante numerosi passaggi in fluido di transizione (CO₂ liquida: Costante Critica = 31,1°C; 1072 P.S.I. = 0,069 bar) (Critical Point Drying);
- 7) montaggio su appositi supporti (stubs) e metallizzazione (sputtering), con sottile (20 nm) strato di oro.

Utilizzando i preparati così metallizzati sono state effettuate le varie osservazioni sulle ife e sui loro contatti, sulla morfologia e sui relativi cambiamenti, al fine di verificare ogni anomalia (deformazioni, strozzamenti, schiacciamenti, ingrossamenti, anastomosi, avvolgimenti, collassi, perforazioni, formazioni particolari) utile per valutare fenomeni di micoparassitismo, di interferenza, di alterazioni morfologiche in genere.

Le osservazioni sono state condotte con ingrandimenti compresi tra 1000x e 5000x (anche 7500). I rilievi più interessanti sono stati registrati attraverso opportune documentazioni fotografiche.

4. RISULTATI

Le ricerche condotte con questa Tesi di Dottorato, incentrate sul genere *Quercus*, hanno portato a risultati molto interessanti, sia per quanto concerne le indagini in bosco, sulla presenza di endofiti fungini, patogeni e non, in piante asintomatiche, sia per quanto concerne quelle in laboratorio sugli antagonismi tra i vari endofiti.

4.1 STUDI SULL'INCIDENZA E SULLE ASSOCIAZIONI DI ENDOFITI

I risultati verranno esposti considerando dapprima l'incidenza e le associazioni di endofiti fungini, patogeni e non, su organi diversi *Q. cerris* in boschi diversificati per zona geografica (soprattutto situazioni altitudinali) e condizioni sanitarie del bosco (con approfondimenti sul reciproco andamento dell'incidenza nel tempo, in un bosco deperiente, dei due endofiti patogeni a più elevata incidenza, *Biscogniauxia mediterranea* e *Discula quercina*), per passare poi ai dati relativi a specie diverse di *Quercus* nella medesima stazione, in aree senza e con fenomeni di deperimento.

4.1.1. Endofiti fungini in diverse situazioni ambientali

Nelle tabelle 6, 7 e 8 si riportano le densità di isolamento dei vari endofiti fungini, patogeni e non, rispettivamente su gemme, rametti di un anno e corteccia di rametti di tre anni prelevati da piante asintomatiche di *Quercus cerris* nelle varie stazioni situate ad altitudini diverse, dal litorale laziale a zone montane del Terminillo e del Parco Nazionale d'Abruzzo.

Nella tabella 9 si riportano i valori medi delle densità di isolamento relative alle tre precedenti tabelle.

Nelle tabelle 10, 11 e 12 sono riportate le densità di isolamento degli endofiti sempre su gemme, rametti di un anno e corteccia di rametti di tre anni di piante asintomatiche di *Quercus cerris*, prelevati in tre boschi del Lazio, ad altitudini diverse, interessati da accentuati fenomeni di deperimento.

Nella tabella 13 sono riportate le medie di tali dati.

SPECIE ENDOFITE RISCONTRATE

Nel complesso, nei boschi senza rilevanti fenomeni di deperimento, sono state isolate diciotto specie di endofiti fungini, di cui dieci sono patogeni, sette delle quali noti agenti di necrosi corticali (*Biscogniauxia mediterranea*, *Coryneum quercinum*, *Cytospora* sp., *Fusarium* sp., *Monochaetia* sp., *Phomopsis quercina*, *Pleurophoma cava*), mentre otto

sono endofiti non patogeni su piante di interesse forestale (*Acremonium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium* sp., *Trichoderma viride*, *Verticillium lecanii*), vari dei quali conosciuti come antagonisti di patogeni.

Nei boschi con rilevanti deperimenti le specie endofitiche sono risultate le stesse riscontrate nei boschi “sani”, salvo aggiungersi l’agente di necrosi corticale, *Diplodia corticola* (Tab. 14).

In ogni caso, le associazioni e le incidenze dei vari endofiti sono risultate variare con l’organo, con la stazione e lo stato fitosanitario del bosco.

INFLUENZA DEGLI ORGANI

Solo qualche endofita è risultato assente in qualcuno dei tre tipi di “organo” utilizzati, mentre la maggior parte, sia pure con incidenza diversa, ha interessato sia gemme, sia rametti di un anno che corteccia di rametti di tre anni (Tab. 15).

Nei boschi senza deperimenti, ad esempio, solo *Botrytis* e *Monochaetia*, peraltro riscontrati solo nella stazione di Sabaudia, erano assenti nelle gemme e nei rametti di un anno rispettivamente; nei boschi con deperimenti *Monochaetia* non è stata mai riscontrata, mentre *Cytospora* esclusivamente su rametti e corteccia, e solo nella stazione di Tre Croci.

Dalla tabella 15 si può notare come l’incidenza di talune specie endofitiche si diversifichi da un organo all’altro.

Tra i patogeni, l’incidenza di *B. mediterranea* aumenta passando dalle gemme ai rametti di un anno alla corteccia dei rametti di tre anni, mentre un andamento inverso viene mostrato da *P. cava*.

Coryneum quercinum e *Cytospora* sp. mostrano maggiore incidenza sui rametti di un anno.

Tra i non patogeni, *Acremonium* sp., *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium* sp. presentano una maggiore presenza sulle gemme rispetto ai rametti, mentre *A. pullulans* presenta una maggiore incidenza nei rametti di un anno rispetto agli altri due “organi”.

INFLUENZA DELL’ALTITUDINE

Nelle nostre condizioni sperimentali e con il numero delle stazioni considerate, non si è riusciti a correlare le associazioni e le incidenze delle varie specie endofitiche con le

condizioni pedologiche della stazione e con le diverse gestioni del bosco. Per contro esse sono risultate molto condizionate dall'altitudine e quindi dal clima, e dallo stato fitosanitario del bosco, in particolare per quanto concerne il peso degli endofiti patogeni rispetto a quelli non patogeni.

Considerando i patogeni, ad esempio, nelle 8 stazioni senza deperimenti (Tab. 9), spicca il comportamento di *B. mediterranea*, la cui incidenza decresce al di sopra degli 800 m. s.l.m. ed è praticamente nulla sopra i 1000 m. s.l.m., così come *P. quercina*, mentre, al contrario *P. cava*, presente in tutte le stazioni, mostra le maggiori incidenze oltre i 1000 m. s.l.m.

D. quercina, anch'essa presente ovunque, pur presentando una notevole variabilità da una stazione all'altra, non ha mostrato una particolare correlazione con i parametri considerati. Quanto agli altri patogeni, è da segnalare come *Cytospora* sia risultata presente in 4 stazioni, *Fusarium* in sei e *C. quercinum* in sette stazioni.

Considerando gli endofiti non patogeni, *Trichoderma*, *Epicoccum*, *Gliocladium* ed *Acremonium* sono risultate le quattro specie presenti in tutte le stazioni senza deperimenti, con variabilità non collegabile con le altitudini, fatta eccezione per *Aureobasidium pullulans*, la cui incidenza sembrerebbe ridursi con la quota e per *Verticillium*, che è apparso assente sopra i 1000 m. s.l.m. .

Il peso degli endofiti patogeni e non patogeni, visti come gruppi separati, non hanno globalmente manifestato una correlazione con l'altitudine. Per contro, i due gruppi sono risultati significativamente correlati con lo stato fitosanitario del bosco.

RELAZIONI TRA DEPERIMENTI ED ENDOFITI FUNGINI

Confrontando globalmente le aree senza deperimenti (Tab. 9) e quelle con fenomeni di deperimento (Tabb. 13 e 15), considerando piante asintomatiche, è stata notata una forte diversificazione nell'incidenza dei vari endofiti, patogeni e non, e nell'incidenza complessiva dei due gruppi.

In entrambi i casi il patogeno più diffuso è apparso *D. quercina* ma con una incidenza molto più elevata nei boschi senza fenomeni di deperimento rispetto a quelli con deperimenti (55,13 % contro 33,23%), dove invece sono risultati aumentare vari agenti di necrosi corticale notoriamente implicati nel fenomeno.

Tra questi aumentano la loro presenza soprattutto *B. mediterranea* (che passa da 1,77% a ben 27,43%), *P. quercina* (da 0,49% a 10,32%), *C. quercinum* (da 0,61% a 2,52%). Nei boschi deperienti compaiono peraltro *Diplodia corticola* e *Monochaetia* sp., mai

riscontrati nelle otto stazioni con boschi sani. Solo *P. cava* è risultata ridursi nei boschi con deperimenti (da 8,42% a 5,66%).

Quanto agli endofiti non patogeni, vari di essi sembrerebbero ridurre la propria incidenza passando dalle aree senza deperimenti a quelle con deperimenti ed in particolare *Acremonium* sp. (da 5,41% a 1,60%), *A. pullulans* (da 3,14% a 1,32%), *C. cladosporioides* (da 7,40% a 1,24%) *G. roseum* (da 1,55% a 1,29%), *Penicillium* sp. (da 6,16% a 1,83%); *E. nigrum* e *V. lecanii* mostrano un leggero aumento nelle aree con deperimenti rilevanti, rispettivamente da 1,07% a 1,28% e da 0,56% a 0,79%)

Complessivamente, considerando l'insieme degli agenti di necrosi corticali e gli endofiti non patogeni, passando dai boschi senza deperimenti a quelli colpiti dal fenomeno, si nota chiaramente come i primi aumentino da 14,01% ad addirittura 50,64%, mentre i secondi scendono da 27,75 a 11,43%.

Merita tuttavia segnalare come, passando dai boschi sani a quelli degradati, si riducano notevolmente anche gli isolamenti muti (da 29,06% a 4,80%), a significare che la presenza di endofiti fungini nei tessuti delle piante in boschi con elevata pressione di inoculo, aumenti in maniera rilevante.

Nella tabella 16 sono riportati i risultati relativi all'applicazione degli indici di Margaleef e Shannon alle specie fungine riscontrate su piante di *Q. cerris* nelle varie stazioni.

Da tale tabella appare evidente come non esistano differenze significative nella ricchezza di specie fungine riscontrate su *Q. cerris* nelle varie stazioni. Quanto alla diversità delle singole specie fungine, sebbene risultata diversa nelle varie stazioni, essa non è apparsa correlata con l'altitudine né sono emerse logiche differenze tra i boschi senza e quelli con deperimenti.

Nella figura 5 è riportato il grafico della regressione lineare del numero complessivo di colonie di endofiti fungini agenti di necrosi corticali, ricavate da piante asintomatiche di *Q. cerris* nelle stazioni esaminate, sull'indice di deperimento dei rispettivi boschi.

Si può notare la buona correlazione ($R^2 = 0,7151$) tra "l'incidenza complessiva" dei patogeni agenti di necrosi corticali e l'indice di deperimento (Fig. 5a). Detta correlazione appare ancor più elevata ($R^2 = 0,9594$) quando si considera solamente il patogeno *B. mediterranea* (Fig. 5b).

Tabella 6. Densità di isolamento media (%) dei vari endofiti fungini nelle gemme di piante asintomatiche di *Q. cerris* nelle otto stazioni distribuite ad altitudini diverse e caratterizzate da assenza di fenomeni di deperimento.

GEMME			Sabaudia (LT) m. 17 slm	Castro dei Volsci (FR) m. 96 slm	Cori (LT) m. 380 slm	Monte Flavio (RM) m. 880 slm	San Gregorio (RM) m. 942 slm	Greccio (RI) m. 1000 slm	Ortolano (AQ) m. 1050 slm	Passo Capannelle (AQ) m. 1300 slm	MEDIA
Generi fungini											
PATOGENI	Agenti di necrosi corticale	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	5,06±0,75	2,30±0,67	1,98±0,54	1,04±0,61	0,12±0,09	0,67±0,08	0,00	0,00	1,40
		<i>Coryneum quercinum</i>	0,38±0,09	0,00	0,13±0,09	0,00	0,12±0,06	0,00	0,00	2,13±0,29	0,35
		<i>Cytospora</i> sp.	0,00	0,00	0,12±0,07	0,00	0,94±0,09	0,00	0,00	0,00	0,13
		<i>Fusarium</i> sp.	0,00	0,61±0,09	2,14±0,25	0,00	0,42±0,07	10,49±1,09	1,85±0.15	0,00	1,94
		<i>Monochaetia</i> sp.	1,58±0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
		<i>Phomopsis quercina</i>	0,27±0,06	0,00	0,12±0,09	0,14±0,09	0,12±0,03	0,00	0,00	0,00	0,08
		<i>Pleurophoma cava</i>	4,01±0,37	0,00	0,14±0,05	17,29±1,96	0,39±0,06	0,00	12,87±1,39	41,43±3,99	9,52
		Totale	11,30	2,91	4,63	18,47	2,11	11,16	14,72	43,56	13,61
	Altri	<i>Alternaria</i> sp.	0,00	0,30±0,011	2,04±0,27	0,00	1,47±0,32	20,57±2,87	1,45±0,32	3,23±0,78	3,63
		<i>Discula quercina</i>	34,84±3,98	85,37±6,43	38,89±3,54	14,97±1,51	86,16±9,12	42,42±4,39	69,84±7,09	37,26±3,97	51,22
		Totale	34,84	85,67	40,93	14,97	87,63	62,99	71,29	40,49	54,85
Totale patogeni			46,14	88,58	45,56	33,44	89,74	74,15	86,01	84,05	68,46
NON PATOGENI	<i>Acremonium</i> sp.	32,23±3,12	3,35±0,41	3,25±0,41	14,18±1,83	0,95±0,03	0,32±0,04	3,86±0,47	1,12±0,26	7,41	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	10,07±1,21	0,25±0,09	0,76±0,11	0,35±0,06	0,21±0,02	0,12±0,06	1,84±0,17	3,35±0,89	2,12	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	7,94±0,67	2,40±0,29	29,74±2,87	28,54±2,76	1,64±0,19	9,54±1,04	0,00	0,79±0,09	10,07	
	<i>Epicoccum nigrum</i>	1,30±0,03	1,25±0,11	1,23±0,17	0,21±0,04	0,35±0,09	0,99±0,09	1,88±0,15	1,76±0,59	1,12	
	<i>Gliocladium roseum</i>	2,32±0,28	1,75±0,19	0,97±0,1	0,49±0,07	0,93±0,05	1,22±0,17	1,03±0,17	1,18±0,27	1,24	
	<i>Penicillium</i> sp.	0,00	0,00	16,18±1,97	21,56±2,34	2,62±0,48	10,41±1,09	3,39±0,78	3,60±0,48	7,22	
	<i>Trichoderma viride</i>	0,00	1,58±0,11	1,99±0,21	1,23±0,21	2,98±0,37	3,03±0,35	1,99±0,17	4,15±0,56	2,12	
	<i>Verticillium lecanii</i>	0,00	0,84±0,09	0,32±0,05	0,00	0,58±0,09	0,22±0,07	0,00	0,00	0,25	
Totale non patogeni			53,86	11,42	54,44	66,56	10,26	25,85	13,99	15,95	31,54
Isolamenti muti (%)			9,97±1,04	0,00	38,75±3,45	78,75±6,99	14,40±1,38	38,75±3,71	28,05±2,34	48,33±5,06	32,13

Tabella 7. Densità di isolamento media (%) dei vari endofiti fungini nei rametti di un anno di piante asintomatiche di *Q. cerris* nelle otto stazioni distribuite ad altitudini diverse e caratterizzate da assenza di fenomeni di deperimento.

RAMETTI DI 1 ANNO			Sabaudia (LT) m. 17 slm	Castro dei Volsci (FR) m. 96 slm	Cori (LT) m. 380 slm	Monte Flavio (RM) m. 880 slm	San Gregorio (RM) m. 942 slm	Greccio (RI) m. 1000 slm	Ortolano (AQ) m. 1050 slm	Passo Capannelle (AQ) m.1300 slm	
Generi fungini											MEDIA
PATOGENI	Agenti di necrosi corticale	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	5,84±0.69	1,30±0,11	2,17±0,23	1,27±0,19	0,52±0,09	0,74±0,09	0,00	0,00	1,48
		<i>Coryneum quercinum</i>	1,84±0,09	0,40±0,09	0,19±0,09	0,37±0,08	0,37±0,08	0,31±0,09	0,00	2,75±0,39	0,78
		<i>Cytospora</i> sp.	0,00	0,32±0,08	0,32±0,08	0,22±0,09	2,60±0,22	0,00	0,00	0,00	0,43
		<i>Fusarium</i> sp.	0,00	0,10±0,09	6,51±0,69	0,00	2,53±0,39	17,07±1,85	2,05±0,27	2,86±0,44	3,89
		<i>Phomopsis quercina</i>	2,29±0,26	0,40±0,07	0,63±0,08	0,24±0,07	0,00	0,45±0,08	0,00	0,00	0,50
		<i>Pleurophoma cava</i>	8,17±0,94	13,90±1,45	1,58±0,19	0,00	1,53±0,19	1,04±0,15	13,23±1,36	32,42±4,98	8,98
		Totale	18,14	16,42	11,40	2,10	7,56	19,61	15,28	38,03	16,07
	Altri	<i>Alternaria</i> sp.	0,00	1,55±0,14	1,43±0,17	0,00	1,53±0,18	16,39±1,79	1,47±0,21	5,71±0,79	3,51
		<i>Botrytis</i> sp.	1,02±0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
		<i>Discula quercina</i>	34,41±3,68	66,32±7,84	47,20±5,04	48,25±5,06	79,17±8,07	50,25±5,93	65,37±6,45	36,58±4,79	53,44
		Totale	35,43	67,87	48,63	48,25	80,71	66,64	66,84	42,29	57,08
Totale patogeni			53,56	84,29	60,03	50,35	88,27	86,25	82,12	80,32	73,15
NON PATOGENI	<i>Acremonium</i> sp.	6,35±0,55	8,45±0,97	2,99±0,34	8,51±0,94	1,01±0,12	1,94±0,28	2,45±0,51	0,35±0,09	4,01	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	28,43±2,57	0,04±0,04	0,75±0,09	1,03±0,18	2,40±0,31	1,05±0,14	2,05±0,36	2,86±0,39	4,83	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	5,08±0,49	1,35±0,15	14,87±1,54	20,34±2,39	1,47±0,25	5,98±0,64	0,00	0,32±0,08	6,18	
	<i>Epicoecum nigrum</i>	1,54±0,17	1,40±0,17	0,75±0,09	0,36±0,09	0,49±0,07	1,04±0,19	2,97±0,45	1,30±0,19	1,23	
	<i>Gliocladium roseum</i>	1,87±0,12	1,69±0,19	1,58±0,06	1,76±0,34	1,60±0,19	1,08±0,11	2,48±0,79	0,57±0,09	1,58	
	<i>Penicillium</i> sp.	0,00	0,00	15,82±1,67	15,45±1,63	0,13±0,07	0,87±0,10	4,48±0,93	9,41±1,15	5,77	
	<i>Trichoderma viride</i>	2,29±0,24	1,98±0,24	2,43±0,29	1,47±0,19	3,65±0,45	1,25±0,21	3,45±0,51	4,86±0,57	2,67	
	<i>Verticillium lecanii</i>	0,88±0,09	0,80±0,09	0,78±0,09	0,73±0,09	0,98±0,12	0,54±0,08	0,00	0,00	0,59	
Totale non patogeni			46,44	15,71	39,97	49,65	11,73	13,75	17,88	19,68	26,85
Isolamenti muti (%)			5,5±0,61	11,25±1,57	70,00±7,65	81,25±8,25	18,50±2,06	23,75±2,69	16,05±1,96	41,67±5,54	33,50

Tabella 8. Densità di isolamento media (%) dei vari endofiti fungini nella corteccia di rami di tre anni di piante asintomatiche di *Q.cerris* nelle otto stazioni distribuite ad altitudini diverse e caratterizzate da assenza di fenomeni di deperimento.

CORTECCIA RAMI DI 3 ANNI			Sabaudia (LT) m. 17 slm	Castro dei Volsci (FR) m. 96 slm	Cori (LT) m. 380 slm	Monte Flavio (RM) m. 880 slm	San Gregorio (RM) m. 942 slm	Greccio (RI) m. 1000 slm	Ortolano (AQ) m. 1050 slm	Passo Capannelle (AQ) m.1300 slm	MEDIA
Generi fungini											
PATOGENI	Agenti di necrosi corticale	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	10,19±1,54	0,00	2,95±0,37	2,97±0,41	2,33±0,34	1,08±0,24	0,00	0,00	2,44
		<i>Coryneum quercinum</i>	1,14±0,29	0,35±0,08	0,22±0,08	0,29±0,09	0,23±0,09	0,53±0,08	0,00	2,84±0,31	0,70
		<i>Cytospora</i> sp.	0,00	0,14±0,08	0,35±0,09	0,09±0,08	2,24±0,31	0,00	0,00	0,00	0,35
		<i>Fusarium</i> sp.	0,00	1,25±0,25	0,00	0,00	0,00	4,08±0,59	2,64±0,32	0,00	1,00
		<i>Monochaetia</i> sp.	1,54±0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19
		<i>Phomopsis quercina</i>	1,26±0,25	0,40±0,07	0,17±0,08	0,35±0,07	4,36±0,68	0,54±0,09	0,00	0,00	0,89
		<i>Pleurophoma cava</i>	1,06±0,18	5,00±0,71	1,94±0,27	2,77±0,39	1,02±0,24	0,97±0,08	16,49±1,78	24,88±3,06	6,77
		Totale	15,19	7,14	5,63	6,47	10,18	7,20	19,13	27,72	12,33
	Altri	<i>Alternaria</i> sp.	0,00	0,90±0,11	3,03±0,41	0,00	1,45±0,21	4,35±0,54	1,23±0,21	6,45±0,97	2,18
		<i>Botrytis</i> sp.	0,26±0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
		<i>Discula quercina</i>	59,97±6,84	73,02±8,94	52,06±6,48	44,90±5,87	75,59±8,07	70,71±6,93	62,33±7,04	47,33±5,13	60,74
		Totale	60,24	73,92	55,09	44,90	77,04	75,06	63,56	53,78	62,95
Totale patogeni			75,43	81,06	60,72	51,37	87,23	82,26	82,69	81,50	75,28
NON PATOGENI	<i>Acremonium</i> sp.	2,38±0,37	11,25±2,14	3,97±0,51	12,20±2,08	3,82±0,41	1,34±0,27	2,58±0,31	0,89±1,13	4,80	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	9,23±1,12	0,53±0,07	0,88±1,12	1,14±0,31	0,37±0,08	0,88±0,11	2,43±0,29	4,23±0,54	2,46	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	5,30±0,64	2,30±0,28	13,54±1,82	17,19±2,43	1,86±0,23	6,90±0,71	0,00	0,59±0,11	5,96	
	<i>Epicoecum nigrum</i>	0,85±1,01	0,80±0,11	0,82±1,13	0,42±0,09	0,58±0,09	1,09±0,29	1,53±0,19	0,87±0,15	0,87	
	<i>Gliocladium roseum</i>	2,23±0,39	1,93±0,28	1,69±0,26	2,03±0,31	2,09±0,34	1,38±0,24	2,05±0,22	1,29±0,36	1,84	
	<i>Penicillium</i> sp.	0,00	0,00	14,17±2,13	11,83±1,85	0,45±0,07	3,84±0,41	3,85±0,41	9,68±1,13	5,48	
	<i>Trichoderma viride</i>	3,12±0,45	1,83±0,24	2,87±0,39	2,97±0,39	2,39±0,38	1,98±0,26	4,87±0,53	0,95±0,13	2,62	
	<i>Verticillium lecanii</i>	1,46±0,25	0,30±0,09	1,35±0,34	0,86±1,11	1,21±0,14	0,33±0,08	0,00	0,00	0,69	
Totale non patogeni			25,97	18,94	39,28	48,63	12,77	17,74	17,31	18,50	24,72
Isolamenti muti (%)			9,38±0,98	0,00	17,50±2,17	48,75±5,97	14,06±1,71	13,75±1,43	20,73±3,04	48,33±5,12	21,56

Tabella 9. Densità di isolamento media (%) dei vari endofiti fungini su piante asintomatiche di *Q. cerris* nelle otto stazioni distribuite ad altitudini diverse e caratterizzate da fenomeni di deperimento pressoché assenti.

INTERA PIANTA			Sabaudia (LT) m. 17 slm	Castro dei Volsci (FR) m. 96 slm	Cori (LT) m. 380 slm	Monte Flavio (RM) m. 880 slm	San Gregorio (RM) m. 942 slm	Greccio (RI) m. 1000 slm	Ortolano (AQ) m. 1050 slm	Passo Capannelle (AQ) m.1300 slm	MEDIA
Generi fungini											
PATOGENI	Agenti di necrosi corticale	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	7,03±0,84	1,20±0,25	2,37±0,31	1,76±0,28	0,99±0,11	0,83±0,11	0,00	0,00	1,77
		<i>Coryneum quercinum</i>	1,12±0,28	0,25±0,08	0,18±0,08	0,22±0,09	0,24±0,08	0,28±0,09	0,00	2,57±0,36	0,61
		<i>Cytospora</i> sp.	0,00	0,15±0,06	0,26±0,07	0,10	1,93±0,49	0,00	0,00	0,00	0,31
		<i>Fusarium</i> sp.	0,00	0,65±0,09	2,88±0,32	0,00	0,98±0,13	10,55±2,04	2,18±0,45	0,95±0,16	2,28
		<i>Monochaetia</i> sp.	1,04±0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
		<i>Phomopsis quercina</i>	1,27±0,34	0,27±0,09	0,31±0,09	0,24±0,08	1,49±0,23	0,33±0,08	0,00	0,00	0,49
		<i>Pleurophoma cava</i>	4,41±0,61	6,30±0,87	1,22±0,24	6,69±1,12	0,98±0,16	0,67±0,09	14,20±2,07	32,91±4,08	8,42
		Totale	14,88	8,82	7,22	9,01	6,62	12,66	16,38	36,43	14,01
	Altri	<i>Alternaria</i> sp.	0,00	0,92±0,14	2,17±0,36	0,00	1,49±0,34	13,77±2,31	1,38±0,39	5,13±0,62	3,11
		<i>Botrytis</i> sp.	0,42±0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
		<i>Discula quercina</i>	43,08±6,09	74,90±8,59	46,05±5,29	36,04±4,07	80,31±8,06	54,46±6,53	65,85±7,14	40,39±4,85	55,13
		Totale	43,50	75,82	48,22	36,04	81,79	68,23	67,23	45,52	58,29
Totale patogeni			58,38	84,64	55,44	45,05	88,41	80,89	83,61	81,96	72,30
NON PATOGENI	<i>Acremonium</i> sp.	13,65±1,79	7,68±1,15	3,40±0,41	11,63±2,16	1,93±0,21	1,20±0,27	2,96±0,41	0,79±0,11	5,41	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	15,91±2,17	0,27±0,09	0,80±0,11	0,84±0,08	0,99±0,13	0,68±0,08	2,11±0,33	3,48±0,47	3,14	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,11±0,83	2,02±0,24	19,38±2,09	22,02±3,04	1,66±0,25	7,47±0,96	0,00	0,57±0,09	7,40	
	<i>Epicoccum nigrum</i>	1,23±0,29	1,15±0,18	0,93±0,12	0,33±0,09	0,47±0,08	1,04±0,15	2,13±0,45	1,31±0,21	1,07	
	<i>Gliocladium roseum</i>	2,14±0,34	1,79±0,35	1,41±0,26	1,43±0,36	1,54±0,20	1,23±0,17	1,85±0,27	1,01±0,12	1,55	
	<i>Penicillium</i> sp.	0,00	0,00	15,39±2,84	16,28±2,07	1,07±0,31	5,04±0,68	3,91±0,44	7,56±1,14	6,16	
	<i>Trichoderma viride</i>	1,80±0,27	1,80±0,27	2,43±0,39	1,89±0,39	3,01±0,45	2,09±0,47	3,44±0,51	3,32±0,49	2,47	
	<i>Verticillium lecanii.</i>	1,17±0,21	0,65±0,09	0,82±0,14	0,53±0,09	0,92±0,11	0,36±0,09	0,00	0,00	0,51	
Totale non patogeni			42,01	15,36	44,56	54,95	11,59	19,11	16,39	18,04	27,70
Isolamenti muti (%)			8,28±1,19	3,75±0,57	42,08±5,78	69,58±7,54	15,65±1,79	25,42±3,04	21,61±3,07	46,11±5,07	29,06

Tabella 10. Densità di isolamento media (%), relativamente alle gemme, dei vari endofiti fungini su piante asintomatiche di *Q. cerris* nelle tre stazioni distribuite ad altitudini diverse e caratterizzate da rilevanti fenomeni di deperimento.

GEMME			Castel Porziano (RM) m. 5 slm	Tre Croci (VT) m. 380 slm	Monte Rufeno (VT) m. 650 slm	MEDIA
Generi fungini						
PATOGENI	Agenti di necrosi corticale	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	20,91±3,07	26,46±2,97	31,66±4,02	26,34
		<i>Coryneum quercinum</i>	4,08±0,61	2,82±0,39	0,00	2,30
		<i>Diplodia corticola</i>	0,00	6,16±1,15	0,00	0,00
		<i>Fusarium</i> sp.	0,00	2,45±0,37	0,00	2,05
		<i>Phomopsis quercina</i>	28,03±3,14	1,17±0,26	0,00	0,82
		<i>Pleurophoma cava</i>	5,03±0,67	4,49±0,81	0,00	0,00
		Totale	58,05	43,55	31,66	44,42
	Altri	<i>Alternaria</i> sp.	3,96±0,41	7,50±0,94	0,12±0,08	3,86
		<i>Botrytis</i> sp.	0,00	4,25±0,83	0,00	1,42
		<i>Discula quercina</i>	26,87±2,96	14,57±1,82	62,25±7,59	34,56
		Totale	30,83	26,32	62,37	39,84
	Totale patogeni			88,88	69,87	94,03
NON PATOGENI	<i>Acremonium</i> sp.	0,00	5,89±0,64	0,30±0,08	2,06	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,00	3,20±0,49	0,00	1,07	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,92±0,31	1,89±0,37	1,20±0,22	1,67	
	<i>Epicoccum nigrum</i>	3,54±0,47	4,58±0,61	1,04±0,19	3,05	
	<i>Gliocladium roseum</i>	0,00	5,78±1,11	0,52±0,07	2,10	
	<i>Penicillium</i> sp.	2,91±0,39	6,45±0,89	0,45±0,09	3,27	
	<i>Trichoderma viride</i>	1,67±0,45	2,34±0,31	1,66±0,24	1,89	
	<i>Verticillium lecanii</i>	1,08±0,36	0,00	0,80±0,10	0,63	
Totale non patogeni			11,12	30,13	5,97	15,74
Isolamenti muti (%)			7,01±0,84	5,30±0,57	0,00	4,10

Tabella 11. Densità di isolamento media (%), relativamente ai rametti di un anno, dei vari endofiti fungini su piante asintomatiche di *Q. cerris* nelle tre stazioni distribuite ad altitudini diverse e caratterizzate da rilevanti fenomeni di deperimento.

RAMETTI DI 1 ANNO			Castel Porziano (RM) m. 5 slm	Tre Croci (VT) m. 380 slm	Monte Rufeno (VT) m. 650 slm	MEDIA
Generi fungini						
PATOGENI	Agenti di necrosi corticale	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	25,83±3,14	29,85±3,01	15,47±1,79	23,72
		<i>Coryneum quercinum</i>	3,52±0,65	6,29±0,74	0,12±0,09	3,31
		<i>Cytospora</i> sp.	0,00	3,73±0,39	0,00	1,24
		<i>Diplodia</i>	6,91±1,19	4,84±0,53	0,00	3,92
		<i>Fusarium</i> sp.	0,00	2,94±0,31	0,00	0,98
		<i>Monochaetia</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
		<i>Phomopsis quercina</i>	22,87±3,15	3,34±0,42	0,23±0,08	8,81
		<i>Pleurophoma cava</i>	6,98±1,13	10,79±1,57	4,44±0,71	7,40
		Totale	66,11	61,78	20,26	49,38
	Altri	<i>Alternaria</i> sp.	2,89±0,41	6,89±1,16	2,21±0,37	4,00
		<i>Botrytis</i>	0,00	3,52±0,41	0,00	1,17
		<i>Discula quercina</i>	23,78±2,54	17,98±2,18	54,48±5,93	32,08
		Totale	26,67	28,39	56,70	37,25
Totale patogeni			92,78	90,17	76,95	86,63
NON PATOGENI	<i>Acremonium</i> sp.	0,00	2,81±0,34	1,59±0,29	1,47	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,76±0,11	0,00	5,61±0,74	2,12	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,00	1,97±0,29	2,87±0,55	1,61	
	<i>Epicoccum nigrum</i>	0,00	0,00	1,45±0,36	0,48	
	<i>Gliocladium roseum</i>	2,34±0,31	0,00	1,48±0,42	1,27	
	<i>Penicillium</i> sp.	1,35±0,22	2,40±1,11	0,90±0,11	1,55	
	<i>Trichoderma viride</i>	0,32±0,08	2,65±0,31	6,67±1,12	3,21	
	<i>Verticillium lecanii</i>	2,45±0,29	0,00	2,48±0,29	1,64	
Totale non patogeni			7,22	9,83	23,04	13,36
Isolamenti muti (%)			7,57±1,12	4,48±1,08	11,76±1,57	12,35

Tabella 12. Densità di isolamento media (%), relativamente alla corteccia di rametti di tre anni, dei vari endofiti fungini su piante asintomatiche di *Q. cerris*, nelle tre stazioni distribuite ad altitudini diverse e caratterizzate da rilevanti fenomeni di deperimento.

CORTECCIA RAMI DI 3 ANNI			Castel Porziano (RM) m. 5 slm	Tre Croci (VT) m. 380 slm	Monte Rufeno (VT) m. 650 slm	MEDIA
Generi fungini						
PATOGENI	Agenti di necrosi corticale	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	32,89±4,07	33,97±4,15	29,82±3,19	32,23
		<i>Coryneum quercinum</i>	0,00	5,86±0,71	0,00	1,95
		<i>Cytospora</i> sp.	0,00	2,98±0,32	0,00	0,99
		<i>Diplodia</i>	3,97±0,41	5,97±0,74	0,45±0,08	3,46
		<i>Fusarium</i> sp.	0,00	2,02±0,31	0,00	0,67
		<i>Monochaetia</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
		<i>Phomopsis quercina</i>	31,98±3,89	5,30±0,71	0,00	12,43
		<i>Pleurophoma cava</i>	7,87	9,63±1,14	1,75±0,29	6,42
		Totale	76,71	65,73	32,02	58,15
		Altri	<i>Alternaria</i> sp.	0,00	6,57±1,11	1,40±0,27
	<i>Botrytis</i> sp.		0,00	3,07±0,89	0,00	1,02
	<i>Discula quercina</i>		23,29±3,15	20,03±2,47	55,78±6,09	33,03
	Totale		23,29	29,67	57,18	36,71
	Totale Patogeni			100	95,40	89,20
NON PATOGENI	<i>Acremonium</i> sp.	0,00	1,98±0,34	1,80±0,29	1,26	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,00	0,00	2,33±0,31	0,78	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,00	0,00	1,27±0,49	0,42	
	<i>Epicoccum nigrum</i>	0,00	0,00	0,94±0,13	0,31	
	<i>Gliocladium roseum</i>	0,00	0,75	0,75±0,11	0,50	
	<i>Penicillium</i> sp.	0,00	1,87±0,45	0,14±0,08	0,67	
	<i>Trichoderma viride</i>	0,00	0,00	3,45±0,79	1,15	
	<i>Verticillium lecanii</i>	0,00	0,00	0,12±0,08	0,04	
	Totale	0	4,60	10,80	5,13	
Isolamenti muti (%)			5,04±0,68	2,07±0,47	0,00	2,37

Tabella 13. Densità di isolamento media (%) dei vari endofiti fungini su piante asintomatiche di *Q. cerris*, nelle tre stazioni distribuite ad altitudini diverse e caratterizzate da rilevanti fenomeni di deperimento.

INTERA PIANTA			Castel Porziano (RM) m. 5 slm	Tre Croci (VT) m. 380 s.lm	Monte Rufeno (VT) m. 650 slm	MEDIA
Generi fungini						
PATOGENI	Agenti di necrosi corticale	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	26,54±4,53	30,09±3,54	25,65±3,07	27,43
		<i>Coryneum quercinum</i>	2,53±0,81	4,99±1,13	0,04±0,04	2,52
		<i>Cytospora</i> sp.	0,00	2,24±0,37	0,00	0,75
		<i>Diplodia</i>	3,63±0,91	5,66±0,67	0,15±0,09	3,14
		<i>Fusarium</i> sp.	0,00	2,47±0,31	0,00	0,82
		<i>Monochaetia</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
		<i>Phomopsis quercina</i>	27,63±3,11	3,27±0,49	0,08±0,08	10,32
		<i>Pleurophoma cava</i>	6,63±0,82	8,30±1,17	2,06±0,31	5,66
		Totale	66,96	57,02	27,98	50,64
	Altri	<i>Alternaria</i> sp.	2,28±0,49	6,99±1,16	1,24±0,28	3,50
		<i>Botrytis</i> sp.	0,00	3,61±0,64	0,00	1,20
		<i>Discula quercina</i>	24,65±3,14	17,53±2,09	57,50±6,09	33,23
		Totale	26,93	28,13	58,75	37,93
Totale Patogeni			93,89	85,15	86,73	88,59
NON PATOGENI	<i>Acremonium</i> sp.	0,00	3,56±0,49	1,23±0,27	1,60	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,25±0,09	1,07±0,21	2,65±0,34	1,32	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,64±0,08	1,29±0,37	1,78±0,29	1,24	
	<i>Epicoccum nigrum</i>	1,18±0,42	1,53±0,21	1,14±0,21	1,28	
	<i>Gliocladium roseum</i>	0,78±0,12	2,18±0,31	0,92±0,11	1,29	
	<i>Penicillium</i> sp.	1,42±0,23	3,57±0,96	0,50±0,09	1,83	
	<i>Trichoderma viride</i>	0,66±0,08	1,66±0,29	3,93±0,44	2,08	
	<i>Verticillium lecanii</i>	1,18±0,86	0,00	1,13±0,31	0,79	
Totale non patogeni			6,11	14,85	13,27	11,43
Isolamenti muti (%)			6,54±1,17	3,95±0,51	3,92±0,48	4,80

Tabella 14. Presenza dei singoli endofiti fungini su piante asintomatiche di *Q. cerris* nelle 8 stazioni con boschi senza deperimenti e nelle 3 colpite da deperimento.

AREE			SENZA DEPERIMENTI							CON DEPERIMENTI			Totale stazioni interessate (numero)				
			1	2	3	4	5	6	7	8	1	2				3	
Quota (m. slm)			17	96	380	880	942	1000	1050	1300	5	380				650	
Endofiti			Stazioni	Sabaudia	Castro dei Volsi	Cori	Monte Flavio	San Gregorio	Greccio	Ortolano	Passo delle Capannelle	Castel Porziano	Tre Croci	Monte Rufeno	Aree sane	Aree deperienti	Totale
PATOGENI	Agenti di necrosi corticali	<i>Biscogniauxia mediterr.</i>	si	si	si	si	si	si	no	no	si	si	si	6	3	9	
		<i>Coryneum quercinum</i>	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	si	7	3	10	
		<i>Cytospora</i> sp.	no	si	si	si	si	no	no	no	no	si	no	4	1	5	
		<i>Diplodia corticola</i>	no	no	no	no	no	no	no	no	si	si	si	0	3	3	
		<i>Fusarium</i> sp.	no	si	si	no	si	si	si	si	no	si	no	6	1	7	
		<i>Monochaetia</i> sp.	si	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	1	0	1	
		<i>Phomopsis quercina</i>	si	si	si	si	si	si	no	no	si	si	si	6	3	9	
		<i>Pleurophoma cava</i>	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	8	3	11	
	Altri	<i>Alternaria</i> sp.	no	si	si	no	si	si	si	si	si	si	si	6	3	9	
		<i>Botrytis</i> sp.	si	no	no	no	no	no	no	no	no	si	no	1	1	2	
<i>Discula quercina</i>		si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	8	3	11		
NON PATOGENI			<i>Acremonium</i> sp.	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	8	3	11	
			<i>Aureobasidium pullul.</i>	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	8	3	11	
			<i>Cladosporium cladosp.</i>	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	7	3	10	
			<i>Epicoccum nigrum</i>	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	8	3	11	
			<i>Gliocladium roseum</i>	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	8	3	11	
			<i>Penicillium</i> sp.	no	no	si	si	si	si	si	si	si	si	6	3	9	
			<i>Trichoderma viride</i>	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	8	3	11	
			<i>Verticillium</i> sp.	si	si	si	si	si	no	no	si	no	si	6	2	8	
Numero endofiti			14	15	16	14	16	15	10	12	15	17	15				
Numero agenti necr. corticali			5	6	6	5	6	5	2	3	5	7	5				
Numero endofiti non patogeni			7	7	6	8	8	8	6	7	8	8	8				

Tabella 15. Densità di isolamento (%) media dei singoli endofiti fungini, riscontrati sui diversi organi di piante asintomatiche di *Q. cerris* relative alle otto stazioni con boschi senza deperimenti (sani) ed alle tre con deperimenti (deper.).

Generi fungini			GEMME		RAMETTI DI UN ANNO		CORTECCIA RAMI DI 3 ANNI		MEDIA INTERA PIANTA	
			Sani	Deperienti	Sani	Deperienti	Sani	Deperienti	Sani	Deperienti
PATOGENI	Agenti di necrosi corticali	<i>Biscogniauxia</i>	1,40	26,34	1,48	23,72	2,44	32,23	1,77	27,43
		<i>Coryneum</i>	0,34	2,30	0,78	3,31	0,70	1,95	0,61	2,52
		<i>Cytospora</i>	0,13	0,00	0,43	1,24	0,35	0,99	0,31	0,75
		<i>Diplodia</i>	0,00	2,05	0,00	3,92	0,00	3,46	0,00	3,14
		<i>Fusarium</i>	1,94	0,82	3,89	0,98	1,00	0,67	2,28	0,82
		<i>Monochaetia</i>	0,20	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,13	0,00
		<i>Phomopsis</i>	0,08	9,73	0,50	8,81	0,89	12,43	0,49	10,32
		<i>Pleurophoma</i>	9,52	3,17	8,98	7,40	6,77	6,42	8,42	5,66
		Totale	13,61	44,42	16,07	49,38	12,33	58,15	14,01	50,64
	Altri	<i>Alternaria</i>	3,63	3,86	3,51	4,00	2,49	2,66	3,11	3,50
		<i>Botrytis</i>	0,00	1,42	0,13	1,17	0,03	1,02	0,05	1,20
		<i>D. quercina</i>	51,22	34,56	53,44	32,08	60,74	33,03	55,13	33,23
		Totale	54,85	39,84	57,08	37,25	63,26	36,71	58,29	37,93
Totale patogeni			68,46	84,26	73,15	76,36	75,59	94,87	72,30	88,57
NONPATOGENI	<i>Acremonium</i>	7,41	2,06	4,74	1,47	4,80	1,26	5,41	1,60	
	<i>Aureobasidium</i>	2,12	1,07	1,59	2,12	2,46	0,78	3,14	1,32	
	<i>Cladosporium</i>	10,07	1,67	5,87	1,61	5,96	0,42	7,40	1,24	
	<i>Epicoccum</i>	1,12	3,05	2,09	0,48	0,87	0,31	1,07	1,28	
	<i>Gliocladium</i>	1,24	2,10	1,67	1,27	1,84	0,50	1,55	1,29	
	<i>Penicillium</i>	7,22	2,47	4,85	1,55	5,48	0,67	6,16	1,83	
	<i>Trichoderma</i>	2,12	1,89	2,00	3,21	2,62	1,15	2,47	2,08	
	<i>Verticilliumlecanii</i>	0,25	0,63	0,44	1,64	0,69	0,04	0,51	0,79	
Totale non patogeni			31,54	14,94	26,85	23,24	24,72	5,13	27,75	11,43
Isolamenti muti (%)			32,13	4,10	33,50	18,11	21,56	2,37	31,76	4,80

Tabella 16. Indici di Margaleef e Shannon applicati alle specie fungine riscontrate in piante di *Q. cerris* nelle varie stazioni di studio.

	Boschi senza fenomeni di deperimento								Boschi con deperimenti		
	Sabaudia	Castro Volsi	Cori	Monte Flavio	S. Gregorio	Greccio	Ortolano	Capannelle	Castel Porziano	Tre Croci	Monte Rufeno
Alt. m slm	17	96	380	880	942	1000	1050	1300	5	380	650
Indice deperimento	0,8	0,5	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0	2,5	3,5	3,6
Margaleef	0,06	0,06	0,09	0,13	0,09	0,09	0,05	0,09	0,06	0,08	0,05
Shannon	1,85	1,03	1,61	1,68	0,91	1,37	1,2	1,49	1,82	2,34	1,32

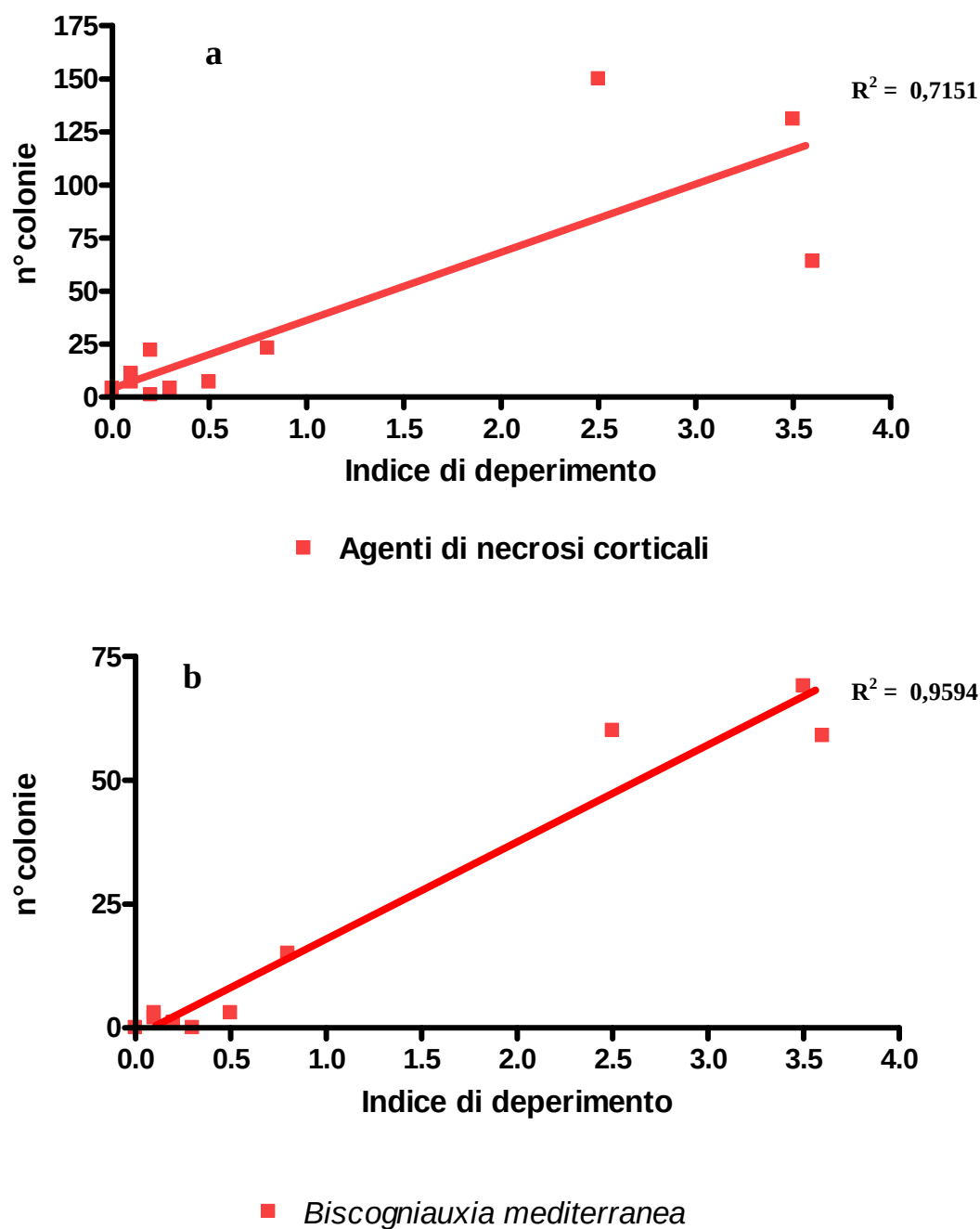


Figura 5. Endofiti fungini presenti su piante asintomatiche di *Quercus cerris* in stazioni interessate da diversi gradi di deperimento. Regressione lineare del numero complessivo di colonie di endofiti fungini agenti di necrosi corticali (a) e di *Biscogniauxia mediterranea* (b) sull'indice di deperimento relativi alle varie stazioni.

4.1.2. Endofiti patogeni nel tempo

Nella figura 6, relativamente al periodo 1998 – 2003, sono riportati gli istogrammi delle frequenze di isolamento di *Biscogniauxia mediterranea* e nella figura 7 (dal 2000 al 2006) di *Biscogniauxia mediterranea* e *Discula quercina*, riscontrate su *Quercus cerris*, nella stazione di Monte Rufeno, nei mesi di maggio e novembre, e quelli delle precipitazioni mensili verificatesi nel medesimo periodo.

Da esse emerge chiaramente come, negli anni precedenti al 2002, *Biscogniauxia mediterranea*, presentasse una incidenza particolarmente elevata nei tessuti sani delle piante.

Negli ultimi quattro anni, tuttavia, la sua incidenza è andata fortemente riducendosi, mentre al contrario è risultata notevolmente incrementata quella di *Discula quercina*.

Questo andamento è peraltro risultato ricorrente in buona parte delle regioni italiane centro – meridionali.

Le scarse precipitazioni dei decenni precedenti il 2002, culminati con una prolungatissima siccità nel 2001, hanno particolarmente incrementato l'incidenza di *B. mediterranea* e delle sue fruttificazioni nel bosco, con forte incremento di inoculo. Ciò ha probabilmente fatto aumentare l'incidenza delle sue infezioni endofitiche su piante sane, mantenendo nel tempo una carica particolarmente elevata, sia pur con oscillazioni da un rilievo all'altro.

Al contrario, le modeste precipitazioni durante suddette stagioni vegetative hanno ostacolato le infezioni di *Discula quercina*, notoriamente favorita dalle piogge. Il 2002, caratterizzato da una forte piovosità anche nei periodi più caldi di luglio e agosto, ha in qualche modo risollevato lo stato idrico delle piante sopravvissute al precedente attacco di *B. mediterranea*. Le forti piogge, che sono continuate per tutta la primavera 2003, da una parte hanno favorito le piante, rendendole particolarmente reattive al suddetto patogeno, dall'altra hanno agevolato l'attacco di *Discula quercina* che ha subito pertanto una forte impennata anche nelle infezioni endofitiche.

La forte siccità estiva ripropostasi nel 2003, ha di nuovo favorito l'aggressione patogenica di *B. mediterranea*, provocando la moria delle piante deperienti rimaste in vita, ma non di *D. quercina*, che è rimasta tuttavia massicciamente presente negli organi considerati.

Il 2004, con precipitazioni elevate, alternate a brevi periodi di secco, ha comunque favorito l'attacco di *D. quercina* sulle poche piante rimaste in vita, che si è pertanto mantenuta altamente presente nei vari organi analizzati.

Biscogniauxia mediterranea ha continuato a mantenersi a livelli bassi, e comunque inversamente proporzionali a quelli di *D. quercina*, almeno nei tessuti esaminati, tutti relativamente giovani.

Lo stesso andamento si è verificato nel 2005 quando, sia a maggio che a novembre, sono stati riscontrati valori di *D. quercina* e *B. mediterranea* inversamente proporzionali tra loro.

Dal 2004 al 2006 le infezioni di *Discula*, pur mantenendosi ad un certo livello, hanno mostrato il valore minimo a novembre 2005, dopo un agosto particolarmente siccitoso. Nel 2006 la sua incidenza è ancora risalita a livelli considerevoli con, ancora una volta, un notevole decremento di *Biscogniauxia*.

Resta tuttavia l'interrogativo se tra i due patogeni si instaurino anche fenomeni di antagonismo o comunque di competizione.

Figura 6. Monte Rufeno (Vt) 2000 – 2006. Piogge mensili e incidenza endofitica di *Biscogniauxia mediterranea* e *Discula quercina* in maggio e novembre.

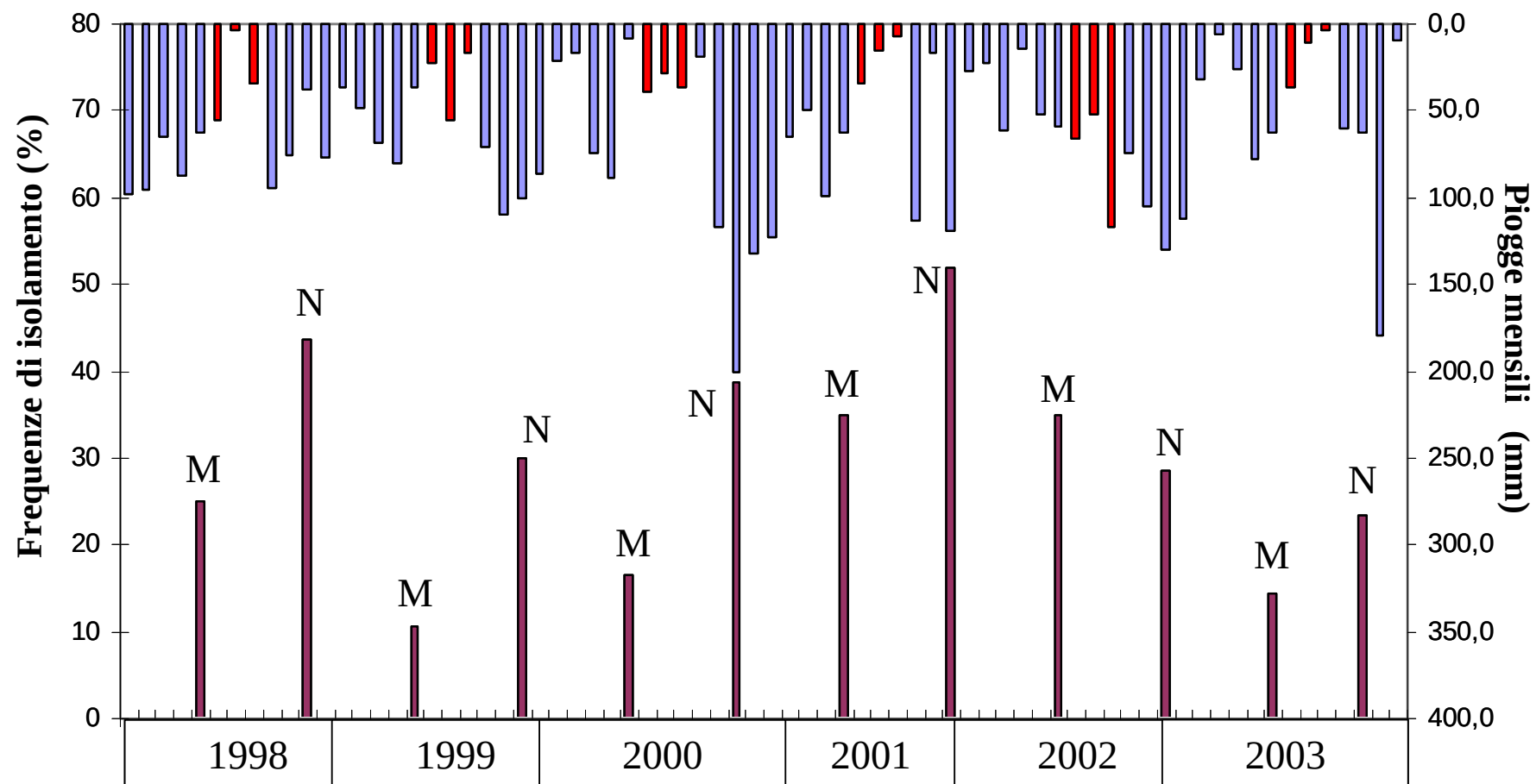
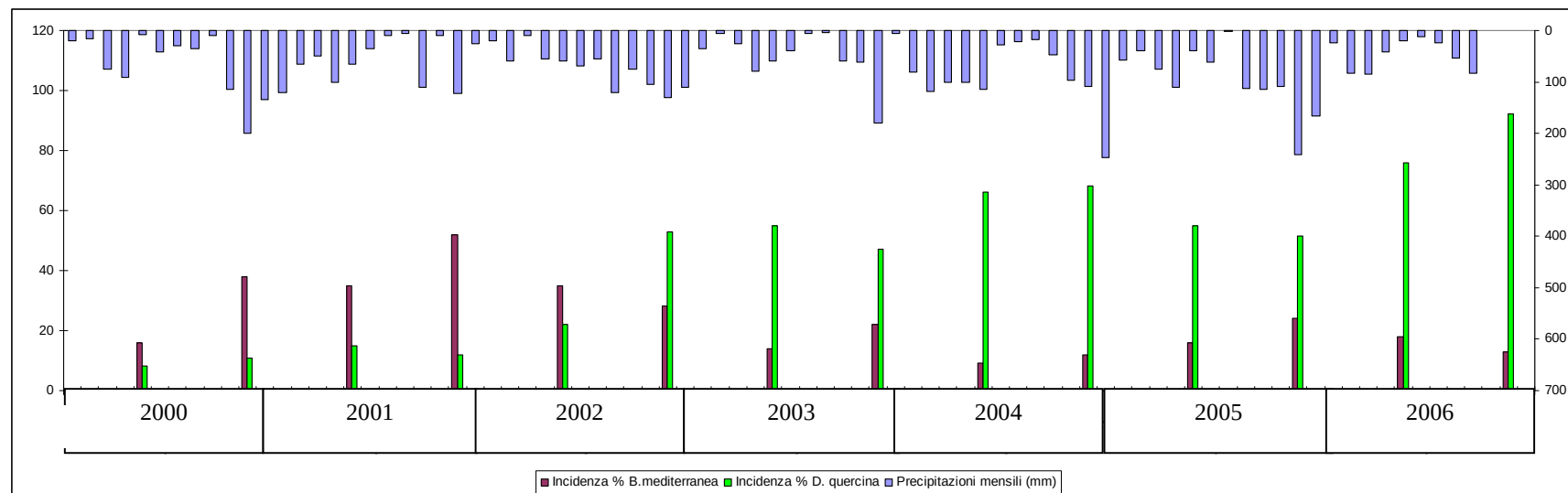


Figura 7. Monte Rufeno (Vt) 2000 – 2006. Piogge mensili e incidenza endofitica di *Biscogniauxia mediterranea* e *Discula quercina* in maggio e novembre.



4.1.3. Endofiti fungini su specie diverse di *Quercus*

Nella tabella 17 è riportata la densità di isolamento media dei vari endofiti sulle cinque specie di *Quercus* esaminate nell'area senza deperimenti, mentre quella della tabella 18 riguarda *Q. cerris*, *Q. pubescens*, *Q. robur* e *Q. suber* nelle aree caratterizzate da deperimento delle piante (manca *Q. ilex* in quanto non colpito dal fenomeno).

Relativamente ai boschi senza deperimenti gli organismi fungini complessivamente isolati (identificati nel genere o, laddove possibile, fino alla specie) nelle varie specie di *Quercus* sono risultati ventidue: *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Biscogniauxia mediterranea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Coryneum quercinum*, *Coniothyrium* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Diplodia corticola*, *Discula quercina*, *Epicoccum nigrum*, *Gliocladium roseum*, *Monocillium* sp., *Penicillium* sp., *Phomopsis quercina*, *Pleurophoma cava*, *Trichoderma viride*, *Tritirachium* sp., *Tubackia dryina*, *Ulocladium* sp. e *Verticillium lecanii*. Essi sono risultati in parte comuni a tutte le specie di *Quercus* ed in parte molto diversificati da una specie all'altra, oppure tra caducifoglie e sempreverdi. Alcuni risultano chiaramente o potenzialmente patogeni, altri indifferenti o addirittura con potenziali capacità antagonistiche.

Tra i patogeni si annoverano numerosi agenti di necrosi corticali (*Biscogniauxia mediterranea*, *Cylindrocarpon* sp., *Coryneum* sp., *Diplodia corticola*, *Phomopsis quercina* e *Pleurophoma cava*) ed alcuni patogeni prettamente fogliari [*Alternaria* sp., *Tubakia dryina* (Saccardo) Sutton] o che si conclamano sulle foglie o giovanissimi germogli (*Discula quercina*). Tra le tipologie fungine non patogene si ricordano *Acremonium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium* sp., *Trichoderma viride*, *Verticillium lecanii*. Come si può notare, vari di questi sono noti come specie fungine antagoniste.

I patogeni risultati presenti in tutte e cinque le specie di *Quercus* sono stati solamente *B. mediterranea*, *P. quercina*, *P. cava* e *D. quercina*, mentre *T. dryina* è risultata presente solo su *Q. robur*, *Cylindrocarpon* solo su *Q. ilex*, *C. quercinum* solo su *Q. cerris* e *Q. pubescens*, *Alternaria* sp. solo sulle querce caducifoglie.

Parimenti, tra gli endofiti non patogeni, solo *C. cladosporioides* e *T. viride* hanno interessato tutte e cinque le specie di *Quercus*, mentre *Monocillium* sp. è stato riscontrato

solo su *Q. suber*, *Aspergillus* sp., *Conyothirum* sp., *G. roseum*, *Ulocladium* sp. e *V. lecanii*, solo sulle caducifoglie e *Tritirachium* sp. solo sulle sempreverdi.

Spiccano alcune particolarità, come l'elevata incidenza di *P. quercina* su *Q. ilex* ed, in minor misura su *Q. robur*, contro bassi valori su *Q. cerris* e *Q. pubescens*, oppure la bassa presenza di *D. quercina* su *Q. robur*, unica specie dove d'altra parte risulta presente, con discreta incidenza, *T. dryina*.

Sia pur con varie differenziazioni l'incidenza globale dei patogeni è grosso modo analoga nell'ambito delle querce caducifoglie con valori maggiori in quello delle querce sempreverdi.

Ad esempio, le densità di isolamento dei patogeni su *Q. cerris*, *Q. pubescens* e *Q. robur* sono rispettivamente 56,03%, 60,81%, 57,31%, mentre su *Q. ilex* e *Q. suber* esse sono 90,08% e 79,51%. Su queste due specie, a valori molto elevati di patogeni fanno riscontro valori relativamente bassi degli endofiti fungini non patogeni.

La densità di isolamento di questi ultimi infatti è 9,92% e 20,49% su *Q. ilex* e *Q. suber*, rispetto a valori di 43,97%, 39,16%, 42,69% di *Q. cerris*, *Q. pubescens* e *Q. robur* rispettivamente.

Per quanto concerne i singoli endofiti non sono emersi andamenti correlati tra patogeni e non patogeni.

Analizzando le densità di isolamento relative alle zone con deperimenti, dalla tabella 18 emerge come le specie di endofiti riscontrate siano grosso modo le stesse, ad eccezione di *Monocillium*, ciò che varia invece notevolmente sono i rapporti tra le specie fungine isolate.

Confrontando le aree con deperimenti con quelle senza, escludendo *Discula quercina*, su tutte e quattro le specie (*Q. cerris*, *Q. pubescens*, *Q. robur* e *Q. suber*) si è fortemente incrementata la percentuale totale dei patogeni agenti di necrosi corticali (che sono quelli più spesso coinvolti nel fenomeno), a scapito di quelli non patogeni.

Questo è particolarmente evidente su *Q. cerris*, *Q. pubescens* e *Q. robur* dove l'incidenza globale dei patogeni sale, rispettivamente da 56,03%, 60,81%, 57,31% a 88,36%, 92,16%, 83,19%, mentre quella dei non patogeni scende da 43,97%, 39,16%, 42,69% a 11,64%, 8,14%, 16,81%, passando dalle aree senza a quelle con deperimenti.

I patogeni che più aumentano sono *Biscogniauxia mediterranea* e *Phomopsis quercina* mentre i non patogeni che più decrementano sono *Gliocladium roseum*, *Aureobasidium*

pullulans e *Verticillium lecanii* sulle caducifoglie. Su *Q. suber* ha un decremento significativo *Trichoderma viride*, mentre tra i patogeni si ha un aumento notevole di *Biscogniauxia mediterranea* quasi totalmente a scapito di *Discula quercina* che, invece, subisce un forte decremento.

Su *Q. robur*, unica delle specie esaminate in cui è stata riscontrata *Tubakia dryina* con una densità del 21,62% nell'area sana e del 32,08% nella deperiente, si nota una minima densità di isolamento di *Discula quercina* (3,60 e 2,19%, rispettivamente nell'area sana ed in quella deperiente). Nell'area deperiente *T. dryina* compare anche su *Q. cerris* e *Q. pubescens* (rispettivamente 7,39% e 8,01%).

In ogni caso la variazione di valori tra l'area sana e quella deperiente è molto più evidente nelle caducifoglie.

Nelle figure 8, 9, 10, 11, per le specie *Q. cerris*, *Q. pubescens*, *Q. robur* e *Q. suber*, sono riportati i grafici delle densità di isolamento dei vari endofiti nelle aree con e senza deperimenti.

Nella tabella 19 sono riportati i risultati relativi all'applicazione degli indici di Margaleef e Shannon alle specie fungine riscontrate su specie diverse di *Quercus* a Castel Porziano, distinguendo le aree senza da quelle con deperimenti.

Da tale tabella sembrerebbe che le querce caducifoglie presentino una ricchezza in specie fungine leggermente maggiore delle querce sempreverdi. Nessuna differenza logica è apparsa invece tra parcelle con deperimenti e senza. Quanto alla diversità delle singole specie fungine, gli indici di Shannon indicherebbero la tendenza a risultare più elevata nelle querce caducifoglie rispetto alle sempreverdi, con valori tendenzialmente maggiori nelle parcelle senza deperimenti.

Tabella 17. Castel Porziano, 2005. Densità di isolamento media (%) di endofiti fungini in piante asintomatiche di specie diverse di *Quercus* nelle aree senza deperimenti.

ENDOFITI FUNGINI			SPECIE DI QUERCUS					
			CERRIS	ILEX	PUBESCENS	ROBUR	SUBER	
PATOGENI	Agenti necrosi corticali	Biscogniauxia mediterranea	8,68±0,85	9,62±0,93	7,69±0,76	1,70±0,16	5,34±0,52	
		Cylindrocarpon sp.	0	1,58±0,15	0	0	0	
		Coryneum quercinum	1,93±0,19	0	1,69±0,17	0	0	
		Diplodia corticola	2,57±0,25	2,42±0,23	2,79±0,28	0	1,89±0,19	
		Phomopsis quercina	10,62±1,04	41,61±4,04	9,57±0,95	20,64±1,98	15,85±1,55	
		Pleurophoma cava	3,86±0,38	4,44±0,43	2,54±0,25	1,51±0,15	8,81±0,86	
		Totale	27,66	59,67	24,28	23,85	31,89	
	Altri	Alternaria sp.	9,33±0,91	0	9,50±0,94	8,24±0,79	0	
		Discula quercina	19,04±1,87	30,41±2,95	27,03±2,68	3,60±0,35	47,62±4,67	
		Tubakya dryina	0	0	0	21,62±2,08	0	
		Totale	28,37	30,41	36,53	33,46	47,62	
	Totale patogeni			56,03	90,08	60,81	57,31	79,51
	NON PATOGENI	Acremonium sp.	2,43±0,24	1,43±0,14	2,21±0,22	2,61±0,25	0	
Aspergillus sp.		1,72±0,17	0	1,82±0,18	1,97±0,19	0		
Aureobasidium pullulans		6,11±0,60	0	6,17±0,61	6,19±0,59	0,32±0,03		
Cladosporium cladosporioides		1,61±0,16	4,12±0,40	2,73±0,27	1,40±0,13	2,20±0,22		
Coniothyrium sp.		3,50±0,34	0	3,63±0,36	3,79±0,36	0		
Epicoccum nigrum		3,86±0,38	2,44±0,24	3,60±0,36	0	0,99±0,10		
Gliocladium roseum		9,32±0,91	0	9,07±0,90	9,37±0,90	0,00		
Monocillium sp.		0	0	0	0	4,09±0,40		
Penicillium sp.		3,99±0,39	0	0	5,40±0,52	2,83±0,28		
Trichoderma viride		3,59±0,35	1,30±0,13	3,65±0,36	4,02±0,39	8,49±0,83		
Tritirachium sp.		0	0,64±0,06	0	0	1,57±0,15		
Ulocladium sp.		1,40±0,14	0	0,00	1,90±0,18	0		
Verticillium lecanii		6,44±0,63	0	6,31±0,62	6,04±0,58	0		
Totale non patogeni		43,97	9,92	39,16	42,69	20,49		
Nulli		13,62	12,30	13,25	11,97	11,68		

Tabella 18. Castel Porziano, 2005. Densità di isolamento media (%) di endofiti fungini in piante asintomatiche di specie diverse di *Quercus* nelle aree con deperimenti.

ENDOFITI FUNGINI			SPECIE DI QUERCUS			
			CERRIS	PUBESCENS	ROBUR	SUBER
PATOGENI	Agenti necrosi corticali	B. mediterranea	25,74±2,55	18,11±1,77	12,96±1,25	15,99±1,64
		Cylindrocarpon sp.	0	1,48±0,14	0	0
		Coryneum quercinum	3,43±0,34	1,80±0,18	0,73±0,07	0,79±0,09
		Diplodia corticola	5,09±0,50	2,97±0,29	0	3,88±0,21
		Fusarium sp.	0	0	4,63±0,45	0
		Phomopsis quercina	0	0	24,91±2,41	19,10±1,87
		Pleurophoma cava	24,12±2,39	19,87±1,94	5,26±0,51	11,32±1,07
		Totale	58,38	44,53	48,50	51,08
	Altri	Alternaria sp.	1,48±0,15	0	0,42±0,04	0
		Discula quercina	21,11±2,09	39,62±3,86	2,19±0,21	33,79±3,57
		Tubakya dryina	7,39±0,73	8,01±0,78	32,08±3,11	0
		Totale	29,98	47,63	34,69	33,79
	Totale patogeni			88,36	92,16	83,19
NON PATOGENI	Acremonium sp.	1,45±0,14	1,55±0,15	1,22±0,12	1,33±0,11	
	Aspergillus sp.	0,30±0,03	0	0	0	
	Aureobasidium pullulans	0,45±0,04	0,60±0,06	0,84±0,08	0,32±0,08	
	Cladosp. cladosporioides	1,54±0,15	1,19±0,12	1,38±0,13	1,87±0,15	
	Coniothiyrum sp.	2,36±0,23	0	2,36±0,23	0	
	Epicoccum nigrum	1,25±0,12	0,85±0,08	1,09±0,11	1,89±0,21	
	Gliocladium roseum	1,11±0,11	1,11±0,11	1,18±0,11	1,21±0,13	
	Penicillium sp.	0,88±0,09	0,55±0,05	0,88±0,09	1,62±0,22	
	Trichoderma viride	0,88±0,09	1,19±0,12	0,88±0,09	4,60±0,44	
	Ulocladium sp.	0	0	3,43±0,33	0	
	Verticillium lecanii	1,41±0,14	1,11±0,11	3,54±0,34	2,30±0,19	
	Totale non patogeni	11,64	8,14	16,81	15,13	
Nulli		6,11	6,39	6,11	14,17	

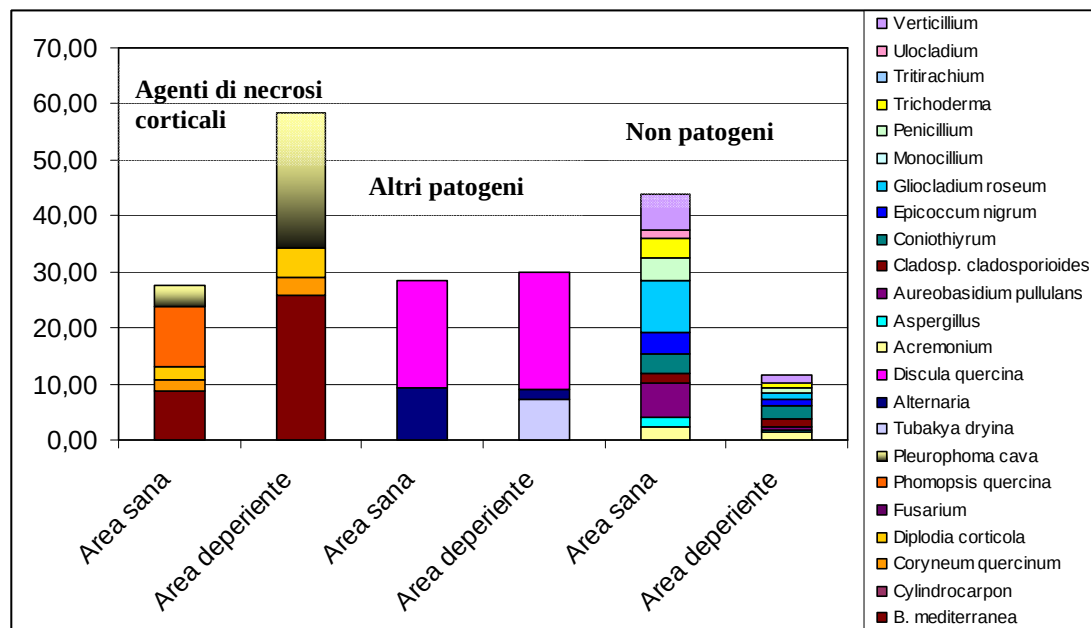


Figura 8. Castel Porziano, 2005. Densità di isolamento media (%) di endofiti fungini in piante asintomatiche di *Quercus cerris* nelle aree con e senza deperimenti.

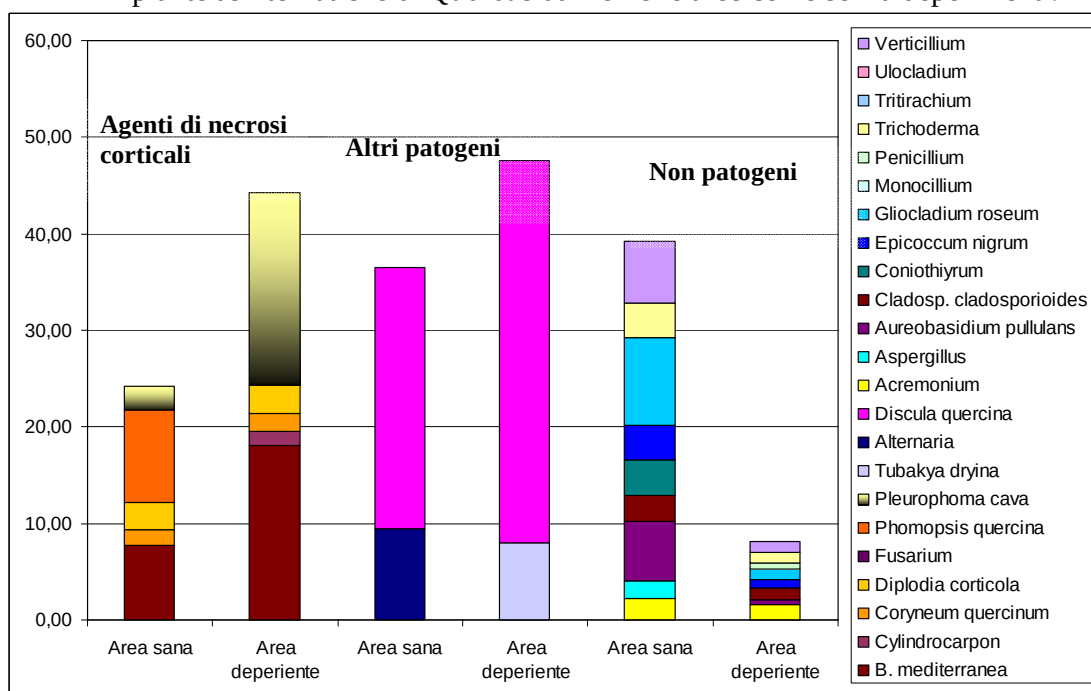


Figura 9. Castel Porziano, 2005. Densità di isolamento media (%) di endofiti fungini in piante asintomatiche di *Quercus pubescens* nelle aree con e senza deperimenti.

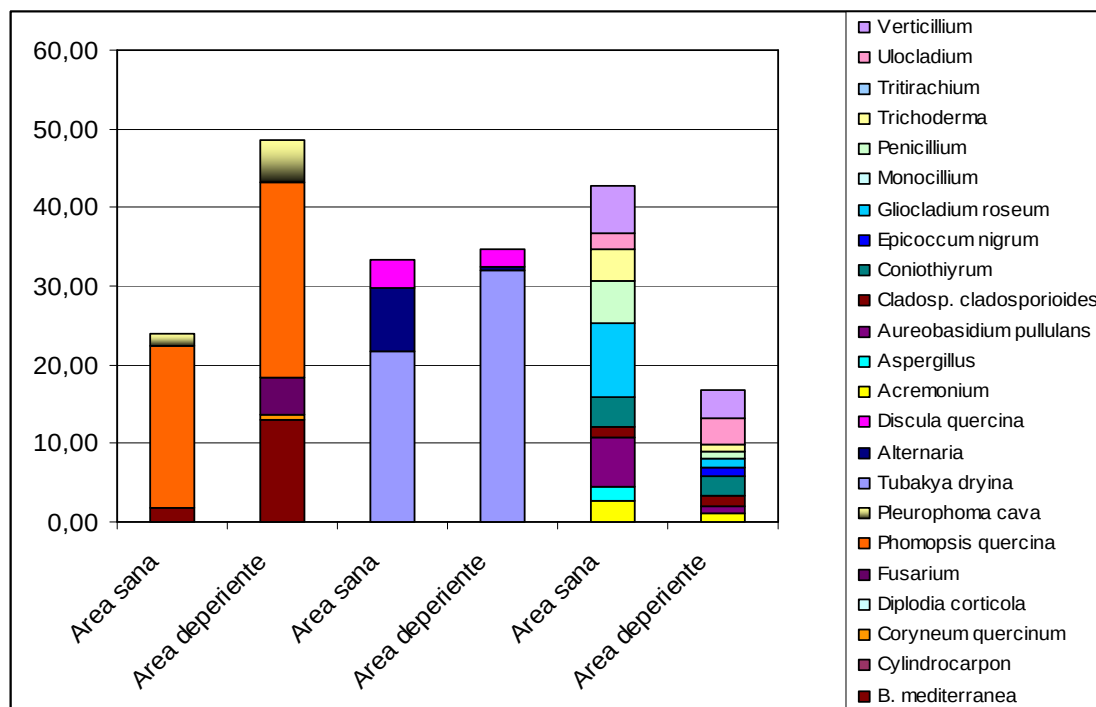


Figura 10. Castel Porziano, 2005. Densità di isolamento media (%) di endofiti fungini in piante asintomatiche di *Quercus robur* nelle aree con e senza deperimenti.

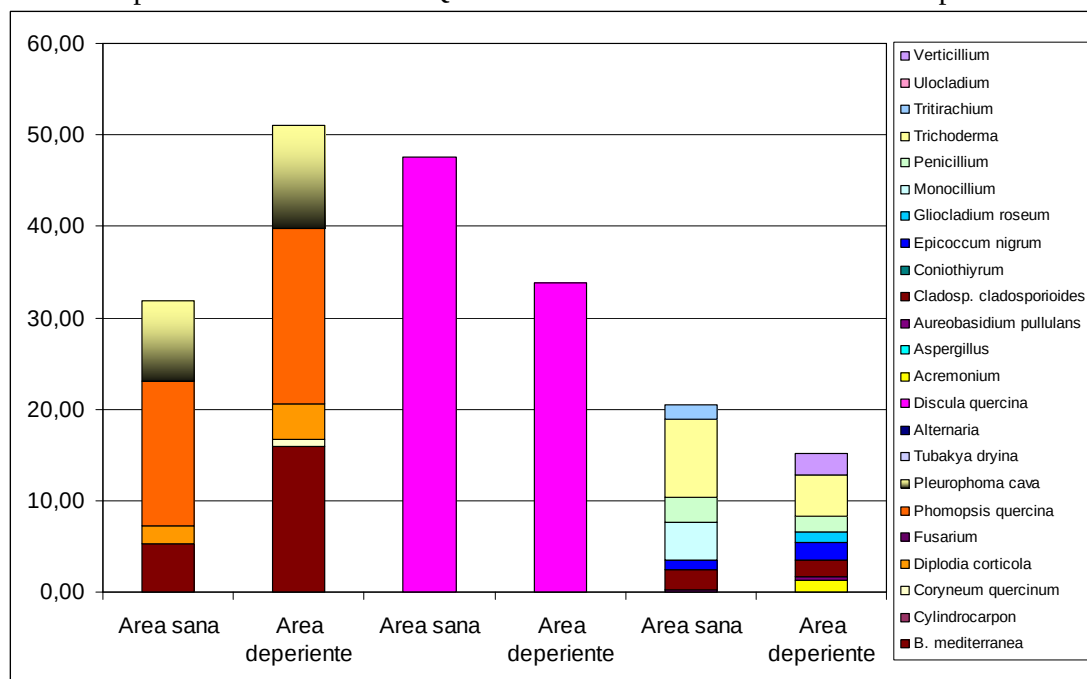


Figura 11. Castel Porziano, 2005. Densità di isolamento media (%) di endofiti fungini in piante asintomatiche di *Quercus suber* nelle aree con e senza deperimenti.

Tabella 19. Indici di Margaleef e Shannon applicati alle specie fungine riscontrate su specie diverse di *Quercus* a Castel Porziano presenti in area con piante sane ed in area con fenomeni di deperimento.

	<i>Quercus cerris</i>		<i>Quercus ilex</i>	<i>Quercus pubescens</i>		<i>Quercus robur</i>		<i>Quercus suber</i>	
	Area “sana”	Area con deperimenti	Area “sana”	Area “sana”	Area con deperimenti	Area “sana”	Area con deperimenti	Area “sana”	Area con deperimenti
Margaleef	0,82	0,74	0,50	0,73	0,65	0,68	0,78	0,55	0,52
Shannon	2,63	1,99	1,62	2,44	1,76	2,40	1,96	1,74	1,74

4.2. STUDI SULL'ANTAGONISMO *IN VITRO* TRA ENDOFITI FUNGINI, PATOGENI E NON

4.2.1. ANTAGONISMO TRA ENDOFITI PATOGENI

In nessun saggio, almeno *in vitro*, è emerso antagonismo tra i due patogeni *Biscogniauxia mediterranea* e *Discula quercina*, le cui incidenze *in planta* è sembrato possedessero un andamento opposto. Parimenti, non è risultato alcun reciproco antagonismo tra i tre agenti di necrosi corticali considerati, *Biscogniauxia mediterranea*, *Pleurophoma cava* e *Coryneum quercinum*.

4.2.2. ANTAGONISMO TRA ENDOFITI NON PATOGENI E PATOGENI

In appresso si illustrano i risultati raggiunti *in vitro* nei confronti di *Biscogniauxia mediterranea*, *Coryneum quercinum* e *Pleurophoma cava* da parte degli otto endofiti non patogeni presi in esame, considerando nell'ordine: a) *Acremonium* sp., b) *Aureobasidium pullulans*, c) *Cladosporium cladosporioides*, d) *Epicoccum nigrum*, e) *Gliocladium roseum*, f) *Penicillium* sp., g) *Trichoderma viride* e h) *Verticillium lecanii*.

Relativamente ad *Acremonium* sp., *Aureobasidium pullulans* e *Cladosporium cladosporioides*, che non hanno mostrato alcun antagonismo nei substrati con filtrati colturali ma nemmeno nelle colture duali, le esposizioni in dettaglio sono limitate ai saggi in queste colture, in quanto abbiamo ritenuto opportuno omettere quelli relativi ai filtrati che nulla avrebbero aggiunto al significato dei risultati, non avendo fornito azione antagonistica alcuna. Per tutti gli altri confronti, invece, l'esposizione contempla sia gli studi a mezzo coltura duale che quelli con filtrati colturali.

A) *ACREMONIUM* SP.

Acremonium* sp. – *Biscogniauxia mediterranea

I tre isolati di *Acremonium* sp. (A1, A2, A3) non risultano avere alcun tipo di azione antagonista nei confronti dei tre diversi ceppi di *B. mediterranea* (B1, B2, B3) (Figg. 12 e 13). Nella figura 12 infatti, le curve di accrescimento medio delle colonie in coltura duale (in media) mostrano il medesimo andamento di quello della coltura testimone, senza “antagonista”. Nella figura 13 si è evidenziato come il micelio del patogeno vada a sovrastare quello di *Acremonium* sp.

Acremonium sp. – *Coryneum quercinum*

Dei tre ceppi di *C. quercinum* analizzati, nessuno si è mostrato sensibile alla presenza in piastra di nessuno dei tre ceppi di *Acremonium* sp. utilizzati. Anche per questo fungo, come emerge in figura 14, dal momento in cui i miceli si toccano, si ha una evidente sovracrescita del patogeno su *Acremonium* sp. Nel grafico (Fig. 15) relativo agli accrescimenti progressivi dei due organismi, le curve di accrescimento medio delle colonie in coltura duale mostrano il medesimo andamento di quello della coltura testimone, senza *Acremonium* sp.

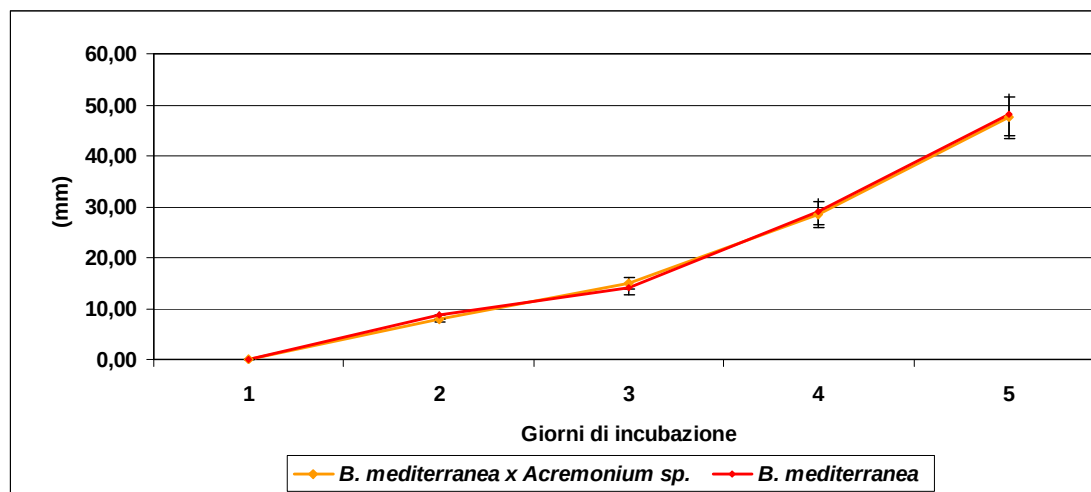


Figura 12. Accrescimento (mm) medio progressivo nel tempo delle colonie di *Biscogniauxia mediterranea* in in coltura duale con *Acremonium* sp. ed in monocultura.

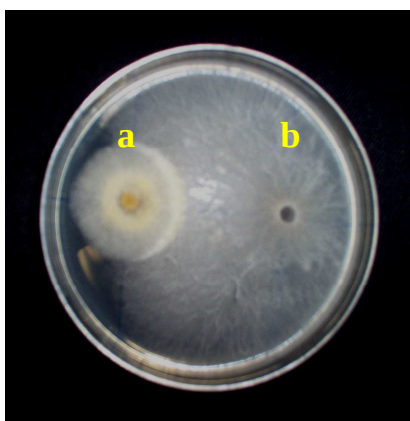


Figura 13. Coltura duale di *Acremonium* sp. (a) con *B. mediterranea* (b), dopo 5 giorni di incubazione. Si noti l'avanzamento della colonia del patogeno sopra quella di *Acremonium* sp.

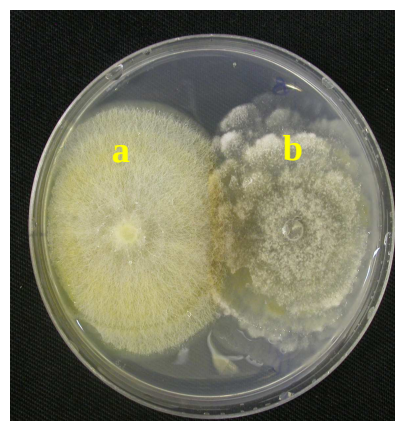


Figura 14. Coltura duale di *Acremonium* sp. (a) con *C. quercinum* (b), dopo 10 giorni di incubazione. Si noti l'avanzamento della colonia del patogeno sopra quella di *Acremonium* sp.

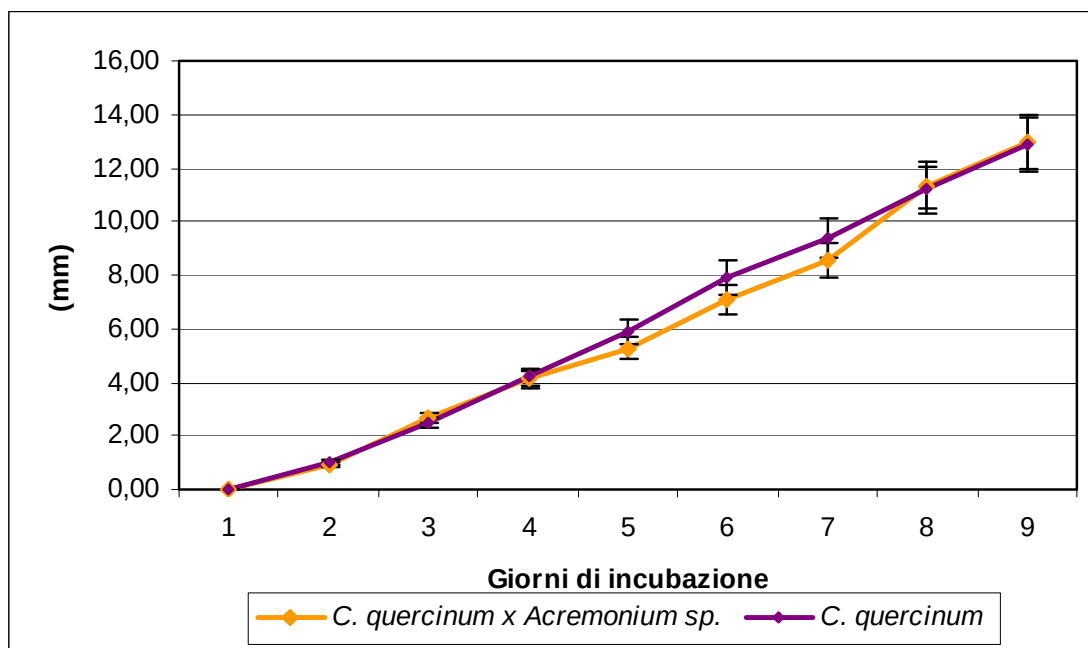


Figura 15. Accrescimento (mm) medio progressivo nel tempo delle colonie di *Coryneum quercinum* in coltura duale con *Acremonium* sp. ed in monocultura.

Acremonium* sp. – *Pleurophoma cava

L'accrescimento di *P. cava* in coltura duale con *Acremonium* sp. non ha avuto la minima variazione rispetto al testimone; nessuno dei tre ceppi del non patogeno utilizzati (A1, A2, A3) ha mostrato azione antagonista nei confronti del patogeno. Anche in questo caso, dopo il contatto dei miceli, il patogeno ha proseguito lo sviluppo, andando a ricoprire la colonia di *Acremonium* sp. Nella figura 16 infatti, le curve di accrescimento medio delle colonie in coltura duale mostrano il medesimo andamento di quello della coltura testimone, senza antagonista.

B) *AUREOBASIDIUM PULLULANS*

Aureobasidium pullulans* – *Biscogniauxia mediterranea

A. pullulans, già a livello delle prove preliminari di interazione miceliare, non ha mostrato alcuna azione antagonistica nei confronti di *B. mediterranea*. Nella figura 17, si può notare la sovracrescita del micelio di *B. mediterranea* sulla colonia di *A. pullulans* già a 3 giorni (foto a sx) e il pressoché completo ricoprimento dopo 5 giorni di incubazione (foto a dx). Lo stesso comportamento si evince dall'andamento degli accrescimenti progressivi del micelio di *B. mediterranea* in coltura singola ed in presenza di *A. pullulans* (Fig. 18).

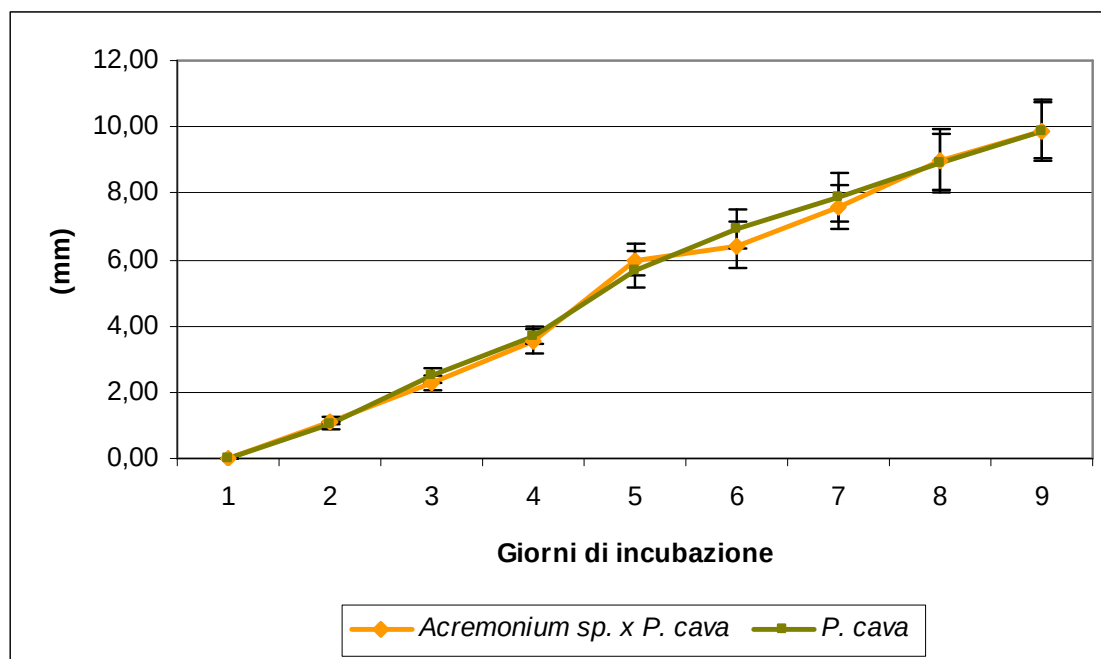


Figura 16. Accrescimento (mm) medio progressivo nel tempo delle colonie di *Pleurophoma cava* in coltura duale con *Acremonium* sp. ed in monocultura.



Figura 17. Coltura duale di *Aureobasidium pullulans* (a) con *Biscognauxia mediterranea* (b), a 3 (foto a sx) e 5 (foto a dx) giorni dall'inoculo. Si noti l'avanzamento della colonia del patogeno sopra quella di *Aureobasidium pullulans*.

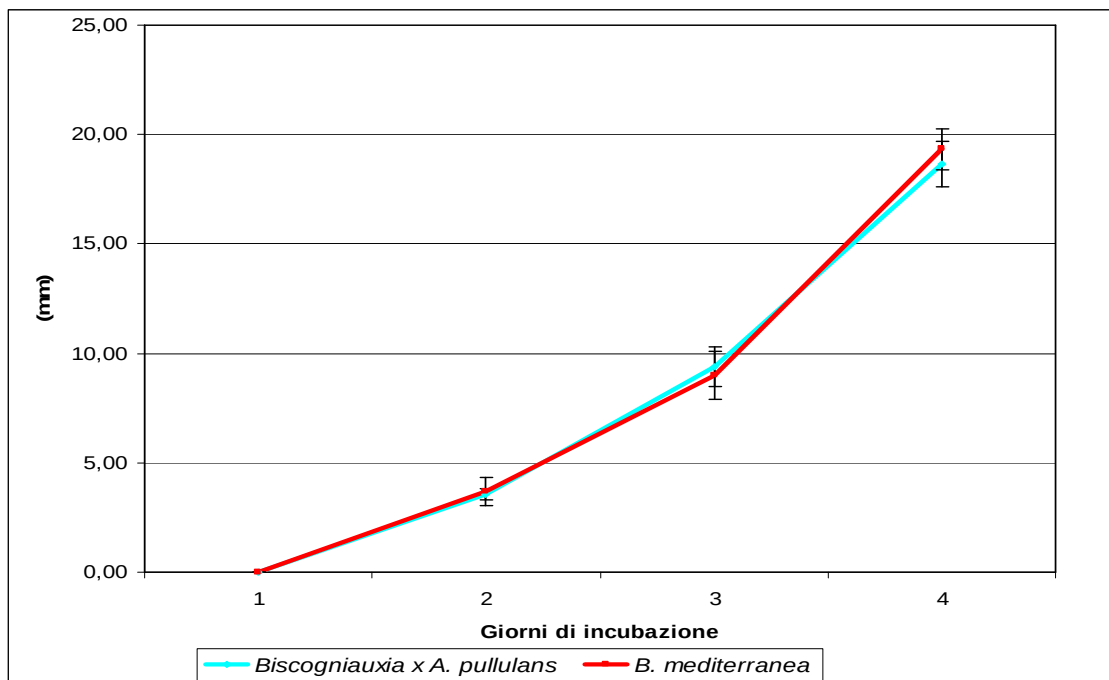


Figura 18. Accrescimento (mm) medio progressivo nel tempo delle colonie di *Biscogniauxia mediterranea* in coltura duale con *Aureobasidium pullulans* ed in monocoltura.

Aureobasidium pullulans* – *Coryneum quercinum

Nel confronto in coltura duale di *A. pullulans* e *C. quercinum*, dopo un regolare sviluppo iniziale dei due miceti, è stato registrato un rallentamento reciproco dell'accrescimento all'avvicinarsi delle colonie, fino ad un blocco completo di entrambi prima del contatto dei due fronti miceliari (figura 19 – dx). Tale comportamento si evidenzia con una lunga fase di stasi degli accrescimenti progressivi (Fig. 20).



Figura 19. Coltura duale di *Aureobasidium pullulans* (destra) e *Coryneum quercinum* in confronto con una coltura pura del patogeno (sinistra), dopo 8 giorni di incubazione. Entrambi i miceti rallentano lo sviluppo all'avvicinarsi delle colonie, fino al blocco completo.

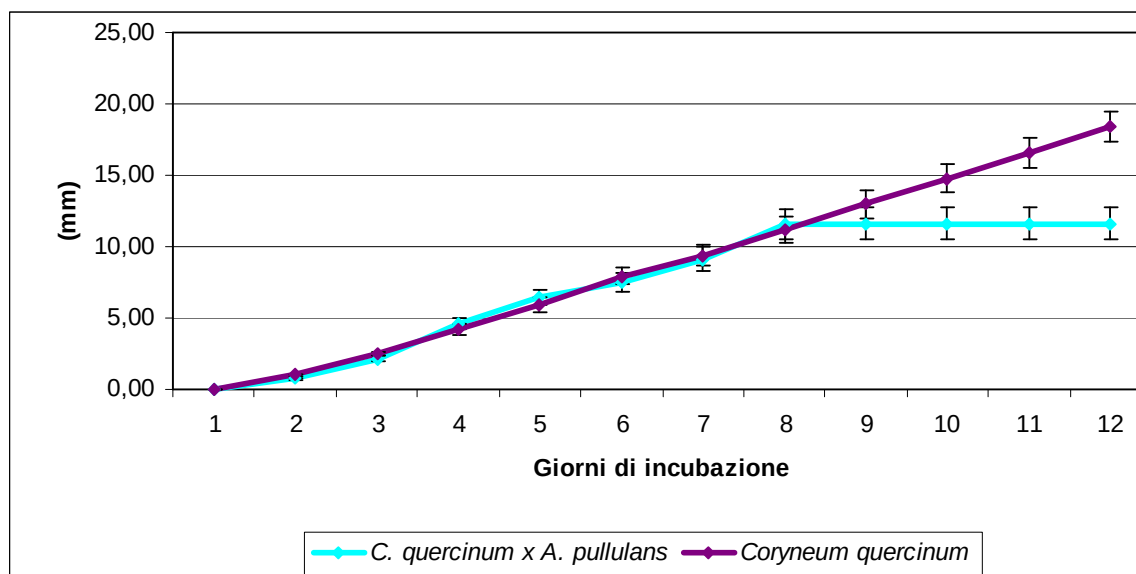


Figura 20. Accrescimento (mm) medio progressivo nel tempo delle colonie di *Coryneum quercinum* in coltura duale con *Aureobasidium pullulans* ed in monocultura.

Aureobasidium pullulans* – *Pleurophoma cava

A. pullulans non ha in nessun modo influenzato l'accrescimento di *P. cava* in coltura duale, salvo un leggerissimo rallentamento di sviluppo delle colonie man mano che si avvicinavano (Fig. 21).

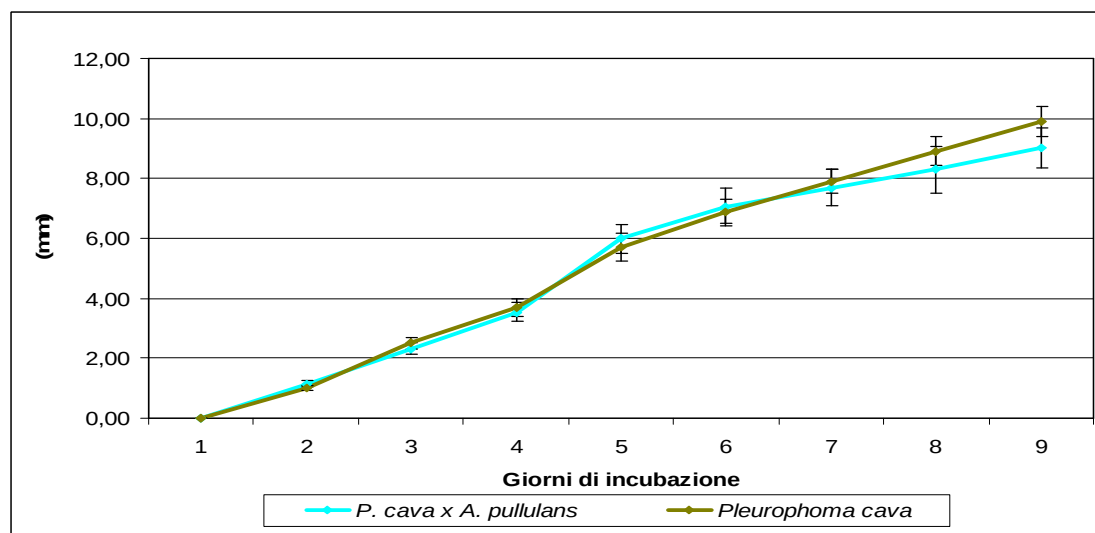


Figura 21. Accrescimento (mm) medio progressivo nel tempo delle colonie di *Pleurophoma cava* in coltura duale con *Aureobasidium pullulans* ed in monocultura.

C) *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES*

Cladosporium cladosporioides – *Biscogniauxia mediterranea*.

Nessuno dei tre isolati di *C. cladosporioides* saggiati è risultato avere, in media, significativa azione antagonistica nei confronti di *Biscogniauxia mediterranea*. (Fig. 22). Già al terzo giorno di incubazione la colonia del patogeno ha ricoperto parte di quella di *C. cladosporioides* (Fig. 23).

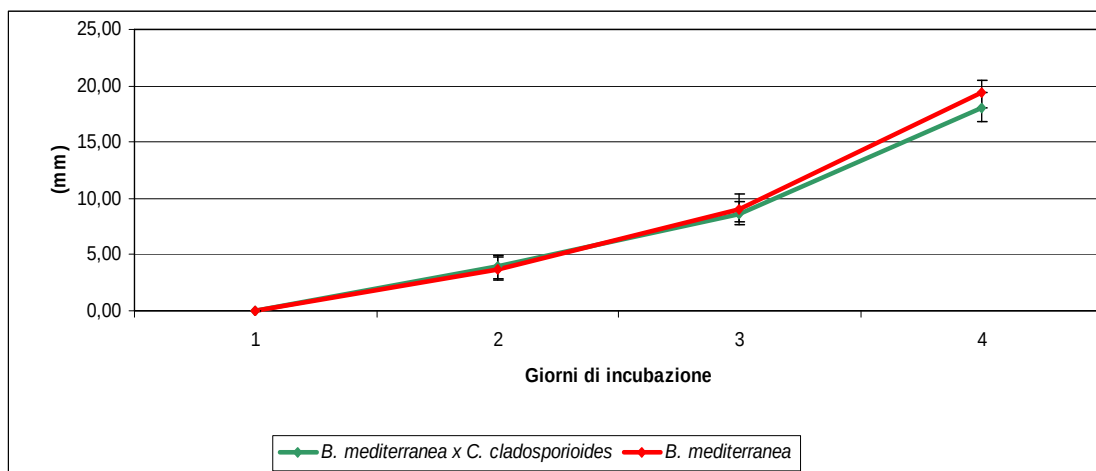


Fig.ura 22. Accrescimento (mm) medio progressivo nel tempo delle colonie di *Biscogniauxia mediterranea* in coltura duale con *Cladosporium cladosporioides* ed in monocultura (testimone).

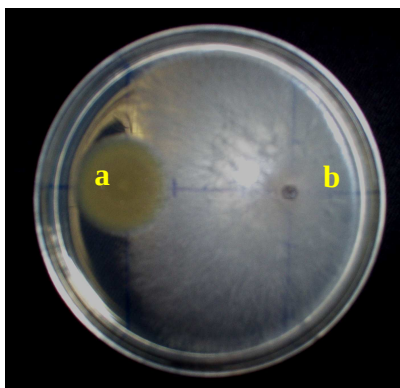


Figura 23. Coltura duale di *Cladosporium cladosporioides* (a) con *Biscogniauxia mediterranea* (b), a 3 gg. dall'inoculo. Si noti l'avanzamento della colonia del patogeno sopra quella di *Cladosporium cladosporioides*.

Cladosporium cladosporioides* – *Coryneum quercinum

Nelle colture duali, le colonie di *C. cladosporioides* e quelle di *C. quercinum* hanno mostrato una reciproca competizione all'avvicinarsi dei fronti miceliari.

Nella figura 24 si può notare infatti come le colonie dei due funghi arrestino la loro crescita all'avvicinarsi delle colonie, senza però che nessuno dei due vada a sovrapporsi all'altro. Ciò è messo in evidenza nella figura 25, dove si rileva come le colonie del patogeno in coltura duale blocchino praticamente il loro accrescimento circa all'ottavo giorno, dopo il primo contatto dei miceli.

Nella tabella 20, dove sono riportati gli indici di inibizione giornalieri medi di *Cladosporium cladosporioides* verso *Coryneum quercinum*, si nota che dopo un iniziale periodo dove addirittura si è registrato una specie di stimolo (evidenziato da indice di inibizione negativo) si ha un notevole aumento dell'inibizione fino al momento del blocco reciproco degli accrescimenti.

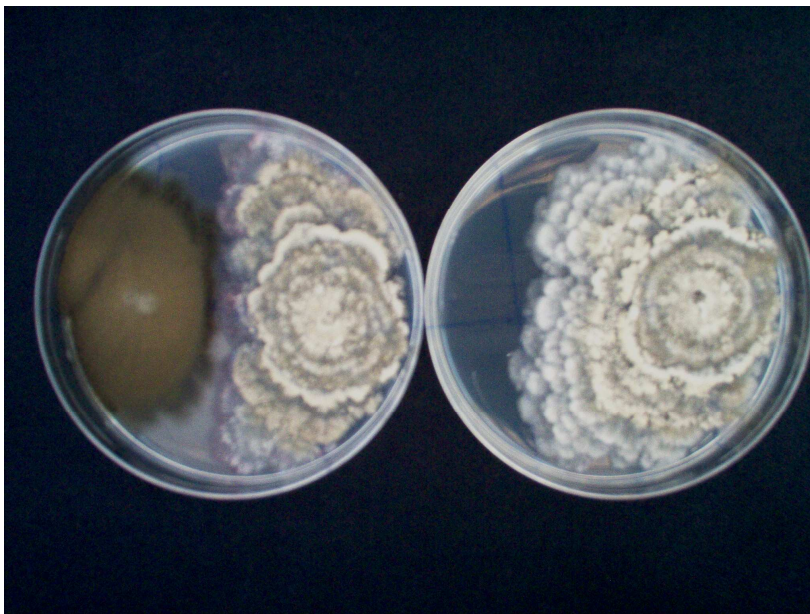


Figura 24. Coltura duale di *Cladosporium cladosporioides* e di *Coryneum quercinum*, dopo 6 giorni di incubazione.

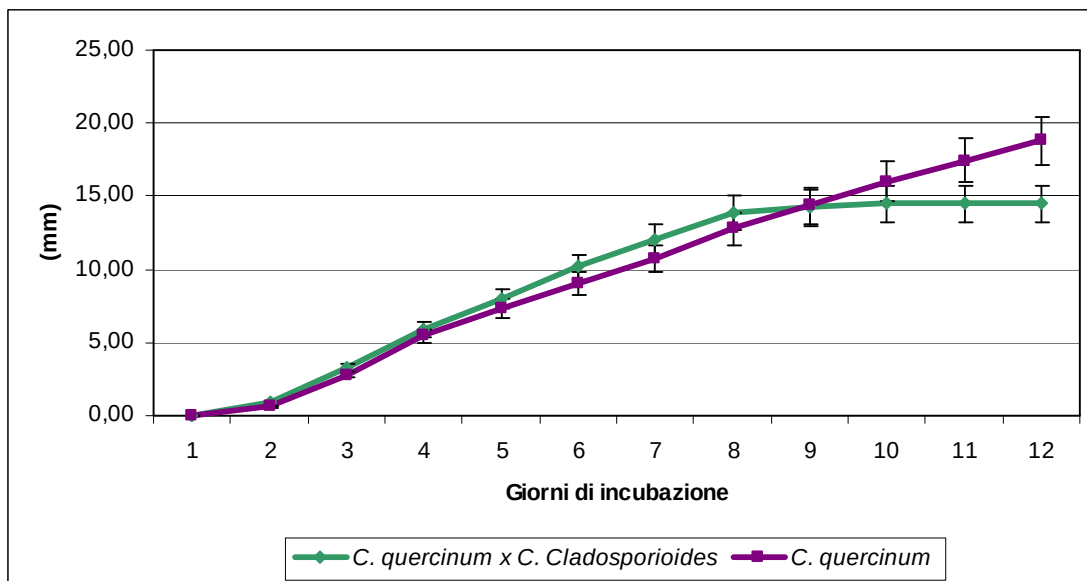


Figura 25. Quadro riassuntivo degli accrescimenti medi progressivi (mm) nel tempo di *Coryneum quercinum* in monocoltura (testimoni) ed in coltura duale con *Cladosporium cladosporioides*. I valori sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

Tabella 20. Indice di inibizione medio giornaliero indotto in coltura duale da *Cladosporium cladosporioides* nei confronti di *Coryneum quercinum*.

Giorni di incubazione												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	-4,99	-4,17	-9,14	-13,9	-5,0	13,58	33,53	78,077	87,5	85,713	98,75	100

Cladosporium cladosporioides* – *Pleurophoma cava

Nelle colture duali tra *C. cladosporioides* e *P. cava* non è stata evidenziata alcuna azione di inibizione nell'accrescimento del patogeno, rispetto a quello della coltura testimone. Dal grafico si evince un accrescimento progressivo pressoché identico (Fig. 26).

D) EPICOCCUM NIGRUM

Epicoccum nigrum* – *Biscogniauxia mediterranea

Coltura duale.

E. nigrum mostra una certa attività antagonistica nei confronti di *Biscogniauxia*, come si può osservare nelle figure 27, 28, 29 e nella tabella 21.

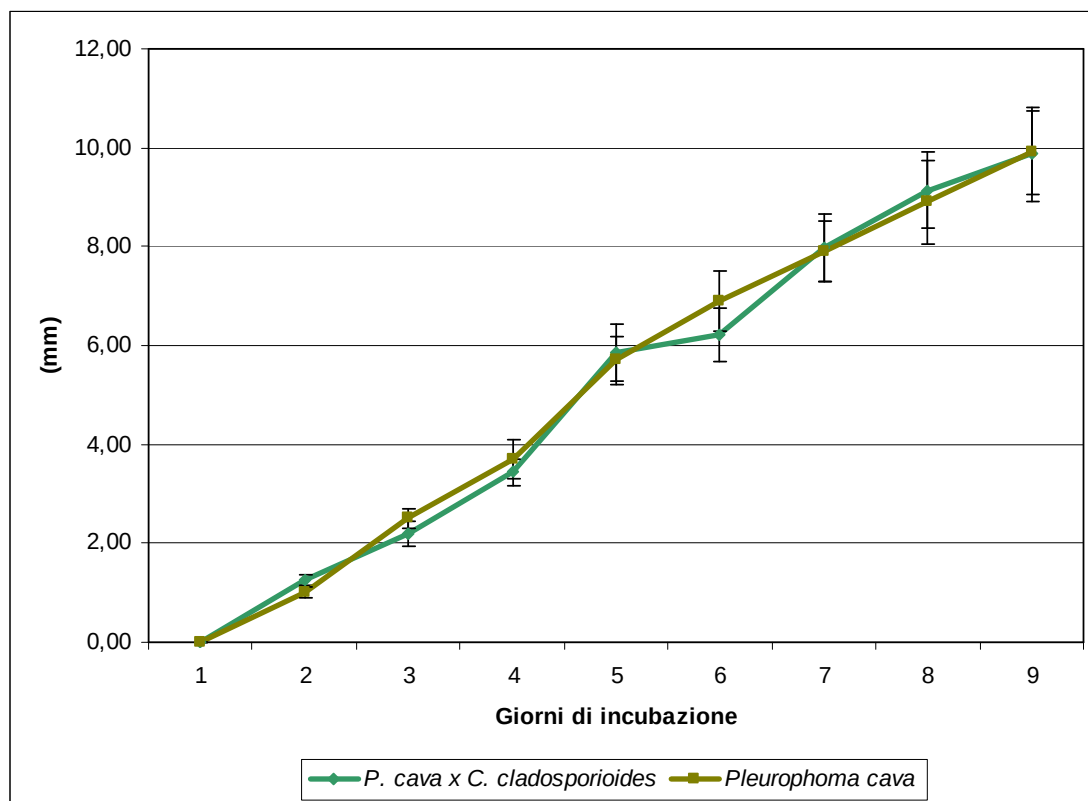


Figura 26. Quadro riassuntivo degli accrescimenti medi progressivi (mm) nel tempo di *Pleurophoma cava* in coltura duale con *Cladosporium cladosporioides* ed in monocultura. I valori sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.



Figura 27. Coltura duale di *B. mediterranea* (a) ed *E. nigrum* (b) con a destra la monocultura di *B. mediterranea*.

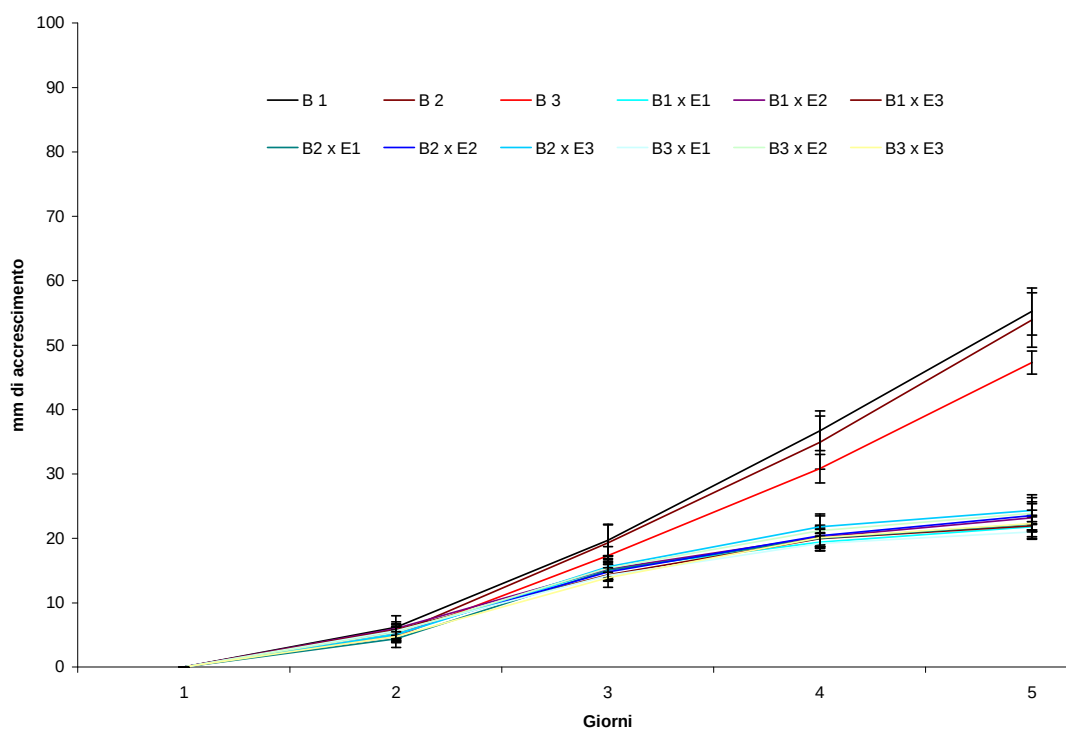


Figura 28. Sviluppo miceliare giornaliero medio (mm) di 3 isolati di *B. mediterranea* (B1, B2 e B3) in monocultura (testimoni) ed in coltura duale con altrettanti isolati di *E. nigrum* (E1, E2 ed E3), nei cinque giorni successivi all'inoculazione. I valori sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

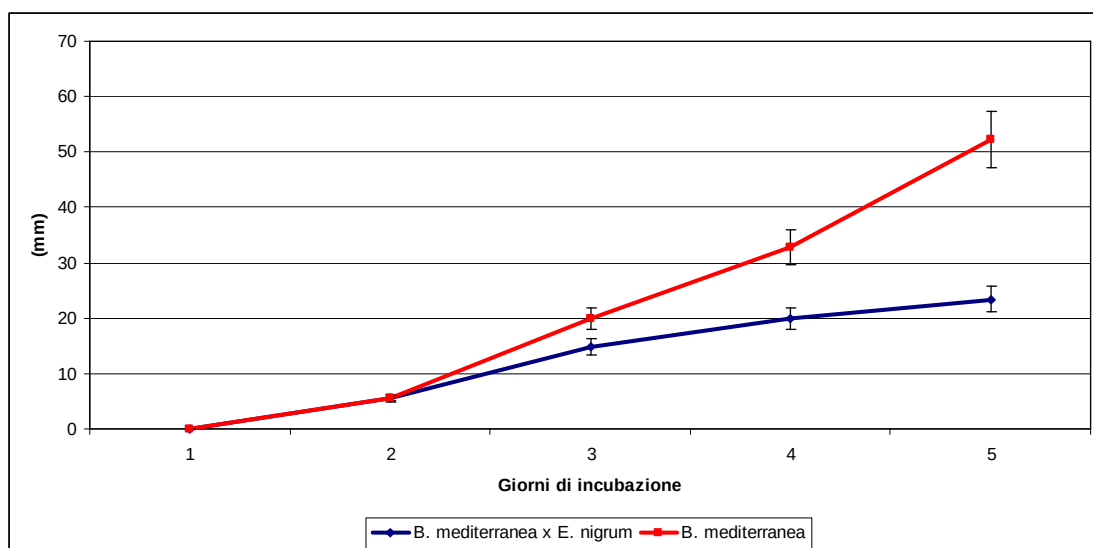


Figura 29. Accrescimento (mm) medio di *Biscogniauxia mediterranea* in monocultura (controllo) ed in coltura duale con *Epicoccum nigrum* nei cinque giorni successivi alla inoculazione.

Filtrato culturale.

Per quanto riguarda l'utilizzo dei filtrati culturali, le prime osservazioni hanno mostrato che, nei primi 10 giorni, si ha una buona attività antagonista (Figg. 30 e 31), in seguito però il micelio di *Biscogniauxia* riprende a crescere anche se morfologicamente diverso dal testimone.

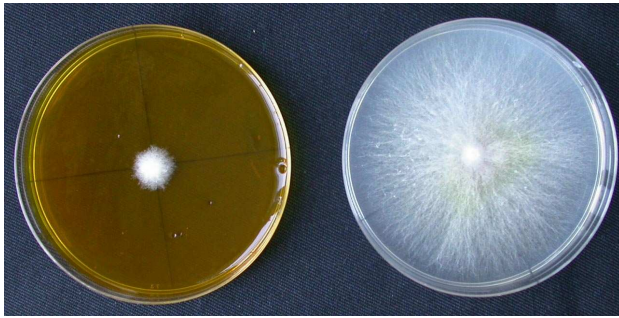


Figura 30. Coltura di *B. mediterranea* su filtrato culturale di *Epicoccum nigrum* (3:1) con a destra la coltura testimone di *Biscogniauxia mediterranea*.

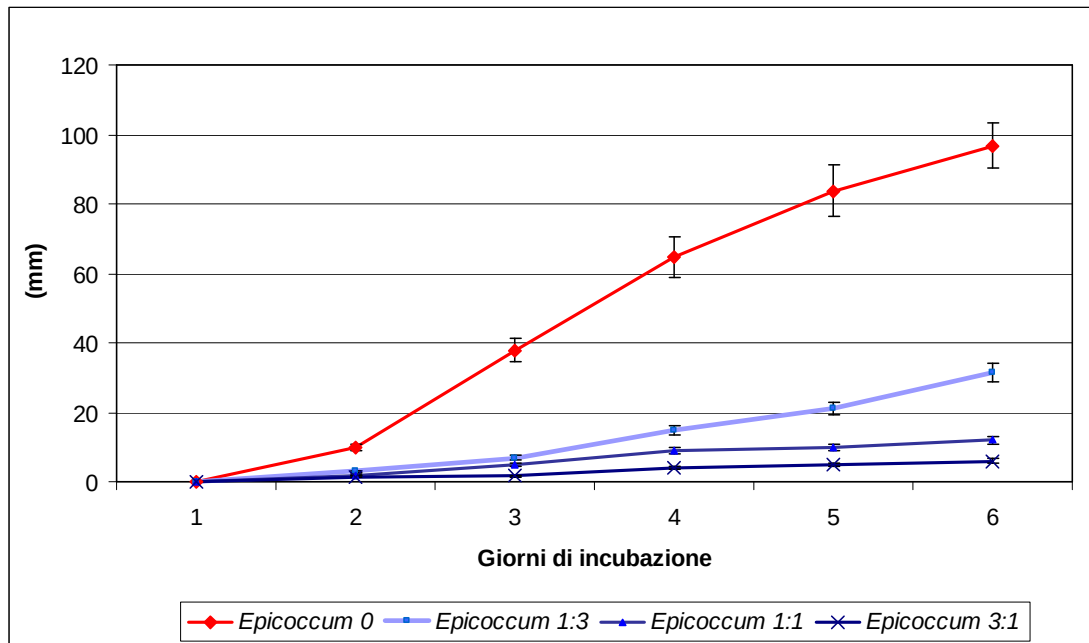


Figura 31. Accrescimento (mm) medio progressivo di colonie dei tre ceppi di *B. mediterranea* in substrato con assenza (0) od addizionato di filtrato culturale dei diversi isolati di *E. nigrum*, in rapporto 1:3, 1:1 e 3:1, a diversi giorni di incubazione.

Epicoccum – *Coryneum quercinum*

Coltura duale.

I tre ceppi di *E. nigrum* (E1, E2, E3) risultano avere una buona azione antagonista nei confronti di *C. quercinum*. La crescita relativamente lenta di entrambi i funghi ha permesso di raccogliere un buon numero di misurazioni giornaliere, dalle quali emerge che

l'inibizione a distanza (dovuta all'antagonista) diventa visibile dal quarto giorno in poi, quando lo sviluppo del patogeno sembra arrestarsi. All'ottavo giorno, comunque, in tutti i casi saggiati, l'indice di inibizione è sempre pari a 100 (Tab. 21), testimoniando così l'arresto completo dello sviluppo di *C. quercinum*. Per contro invece *E. nigrum* continua a cresce senza rallentamenti, fino al contatto micelico (Fig. 32). A questo punto anche l'antagonista termina il proprio sviluppo, senza compenetrazione di ife tra i due bionti. Il comportamento dei tre ceppi di *E. nigrum* non mostra grossa variabilità. Una certa variabilità è stata semmai notata tra i ceppi di *C. quercinum*, dei quali il ceppo 3 è risultato il meno sensibile.



Figura 32. Coltura duale di *C. quercinum* ed *E. nigrum* al sesto giorno dall'inoculo dell'antagonista. Il patogeno risulta notevolmente rallentato in confronto alla coltura pura (sinistra).

Filtrato colturale.

I tre ceppi di *E. nigrum* (E1, E2, E3), utilizzati per la preparazione dei filtrati colturali, risultano avere una buona azione antagonistica nei confronti di *C. quercinum* soltanto ad elevate concentrazioni del filtrato stesso. Il patogeno, dopo 10 giorni dall'inoculazione presenta accrescimenti simili al controllo nelle piastre contenenti aliquote di filtrato in rapporto 1:3 e 1:1, mentre su piastre contenenti filtrato dei 3 ceppi di *E. nigrum* in rapporto 3:1 rispetto al PDA, si sono evidenziati accrescimenti pressoché nulli (Fig. 33).

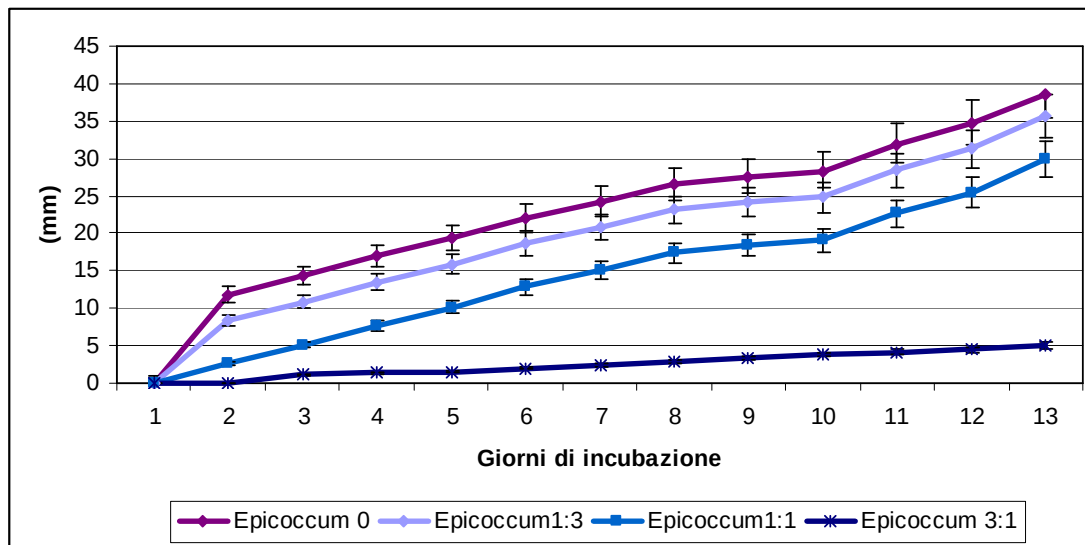


Figura 33. Accrescimento (mm) medio progressivo di colonie dei tre ceppi di *B. mediterranea* in substrato con assenza (0) od addizionato di filtrato culturale dei diversi isolati di *E. nigrum*, in rapporto 1:3, 1:1 e 3:1, a diversi giorni di incubazione.

Epicoccum nigrum* – *Pleurophoma cava

Coltura duale.

Nelle nostre condizioni sperimentali, data la crescita iniziale abbastanza lenta del patogeno saggiato (meno di un mm al giorno, nei primi 4-5 giorni), è stato necessario inoculare *P. cava* almeno una settimana prima rispetto all'antagonista. In queste condizioni, come già nei confronti di *B. mediterranea* e *C. quercinum*, *E. nigrum* mostra anche contro *P. cava* netta azione antagonistica.

In particolare, analogamente a quanto accade soprattutto nel caso di *C. quercinum*, si registra un rallentamento della crescita dopo pochi giorni dall'inoculo dell'antagonista. Infatti, prove preliminari hanno comunque mostrato che, anche ricorrendo a pre-inoculi del patogeno ancora più anticipati, l'azione antagonistica da parte di *E. nigrum* si manifesta sempre e comunque già a partire dal 5°- 6° giorno dal momento dell'inoculo dell'antagonista.

Quanto detto viene messo bene in evidenza dagli indici di inibizione (Tab. 21).

Non sono state notate significative differenze di comportamento tra i vari isolati sia considerando il patogeno che l'antagonista.

Filtrato culturale.

Su substrato addizionato di filtrati culturali di *E. nigrum*, a diverse concentrazioni, i risultati non hanno evidenziato nessuna significativa attività antagonistica di *E. nigrum* sull'accrescimento delle colonie di *Pleurophoma cava* (Fig. 34), si notano, tuttavia accrescimenti medi leggermente inferiori rispetto al testimone delle colonie cresciute sui substrati addizionati di filtrato culturale.

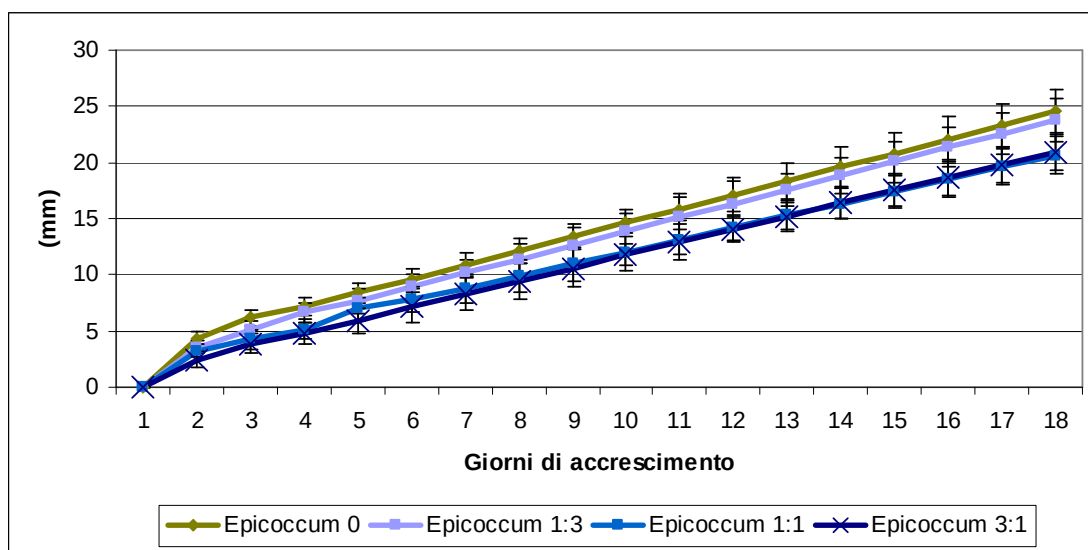


Figura 34. Accrescimento (mm) medio progressivo di colonie dei tre ceppi di *P. cava* in substrato con assenza (0) od addizionato di filtrato culturale dei diversi isolati di *E. nigrum*, in rapporto 1:3, 1:1 e 3:1, a diversi giorni di incubazione.

Tabella 21. Indici medi di inibizione giornalieri di *Epicoccum nigrum* nei confronti dei tre patogeni *Biscogniauxia mediterranea*, *Coryneum quercinum* e *Pleurophoma cava* in coltura duale.

PATOGENO	Giorni									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>B. mediterranea</i>	6,82	22,19	46,70	74,80	87,70	97,44				
<i>C. quercinum</i>	0	0	17,44	33,00	50,67	68,89	98,22	100		
<i>P. cava</i>	0	0	0	0	0,45	14,3	31,9	51,1	72,60	90,00

E) *GLIOCLADIUM ROSEUM*

Gliocladium roseum – *Biscogniauxia mediterranea*

Coltura duale.

Dalle prove in coltura duale è emerso che *G. roseum* presenta una chiara azione antagonista verso *B. mediterranea*, ma solo a partire dal terzo giorno di incubazione e con una forte variabilità tra un ceppo e l'altro (Fig. 35).

Durante i primi tre giorni di incubazione non si è assistito a differenze di crescita tra le colture duali ed i testimoni, differenze che si sono potute apprezzare nei due giorni successivi (Fig. 36), condizione confermata anche dai risultati del calcolo degli indici di inibizione (Tab. 22).

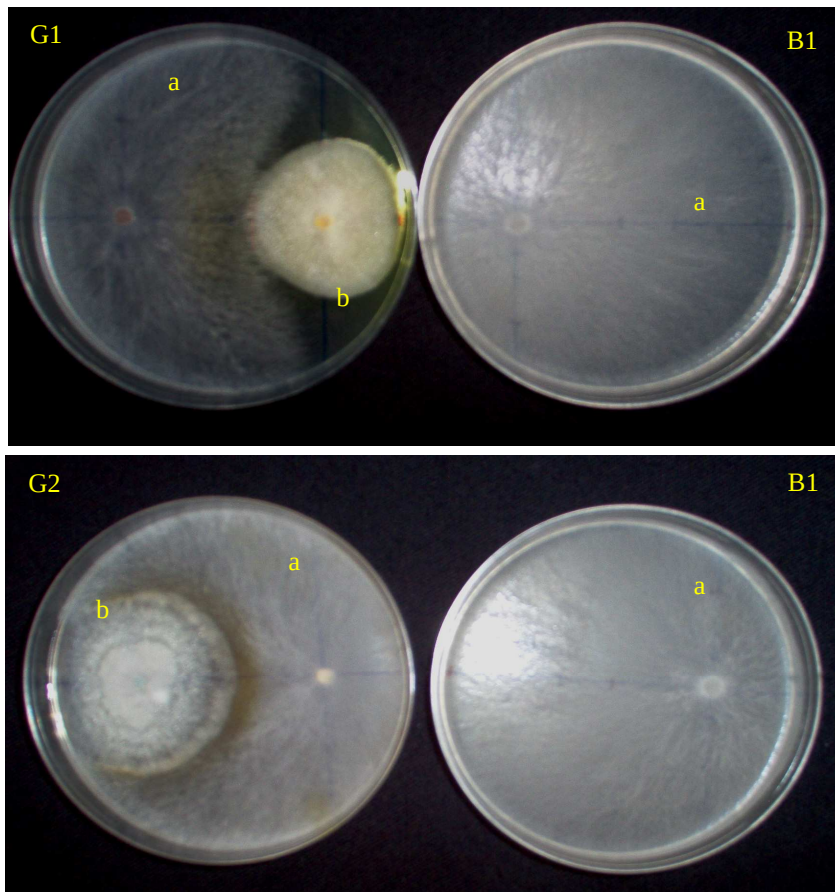


Figura 35. Coltura duale di *Biscogniauxia mediterranea* (a) con due differenti isolati di *Gliocladium roseum* (b), con a destra la monocultura del patogeno.
Notare come solo l'isolato G1 mostri una chiara azione inibitrice verso il patogeno.

Tabella 22. Esempio di indici medi di inibizione giornalieri di due ceppi di *Gliocladium roseum* nei confronti di *Biscogniauxia mediterranea*.

Giorni	1	2	3	4	5
<i>Gliocladium roseum</i> (1)	4,34	38,46	59,64	85,50	100,00
<i>Gliocladium roseum</i> (2)	8,60	4,61	-	-	-

Anche quando non si assisteva a fenomeni di inibizione a distanza, o alla formazione di evidenti strutture di “barrage”, si è potuto osservare, attraverso isolamenti *in vitro* effettuati a partire dal bordo della colonia di *G. roseum* e procedendo di 5 in 5 millimetri nella direzione di *B. mediterranea*, fino ad una distanza di 25 millimetri, come l’unico fungo isolato fosse appunto *G. roseum*. Ciò può far pensare ad una azione micoparassita da parte di *G. roseum* nei confronti del patogeno *B. mediterranea*.

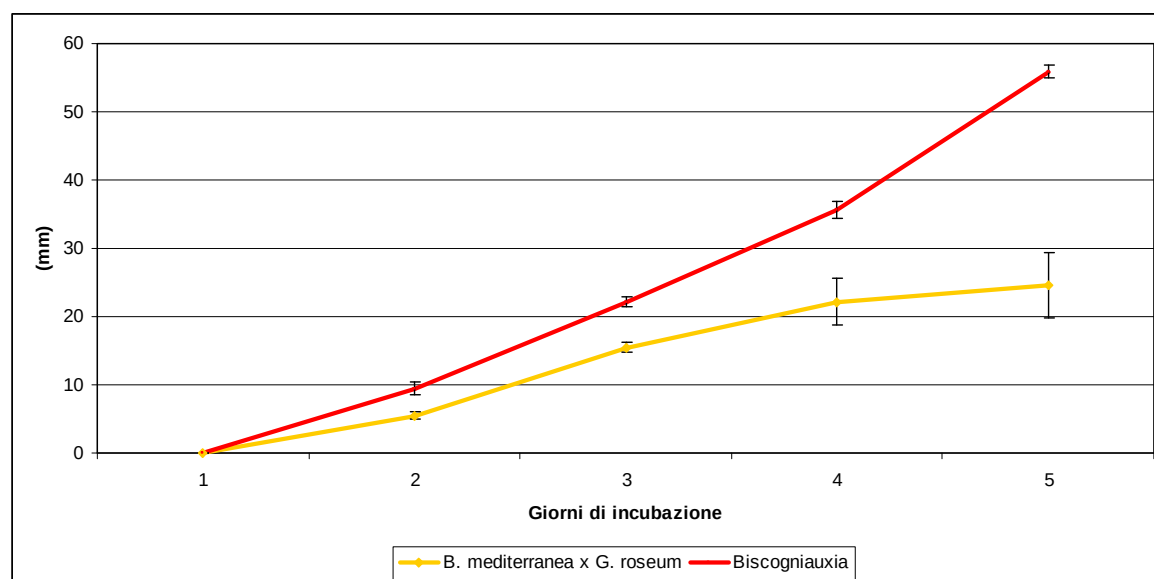


Figura 36. Accrescimento (mm) medio di *Biscogniauxia mediterranea* in monocultura (controllo) ed in coltura duale con *Gliocladium roseum* nei cinque giorni successivi alla inoculazione.

Filtrato culturale.

I risultati ottenuti con l’utilizzo di substrati addizionati con aliquote crescenti di filtrato culturale di *G. roseum* hanno confermato l’effetto antagonistico di quest’ultimo (Fig. 37) nei confronti di *B. mediterranea*. Lo sviluppo della colonia del patogeno, infatti, si riduce ad opera del filtrato in proporzione al rapporto substrato-filtrato, con una certa variabilità tra i vari ceppi.

In nessun caso tuttavia, si è verificata la morte delle ife del patogeno, ciò sembrerebbe dimostrare che l'eventuale micoparassitismo da parte dell'antagonista si esplica solamente in presenza del micelio.

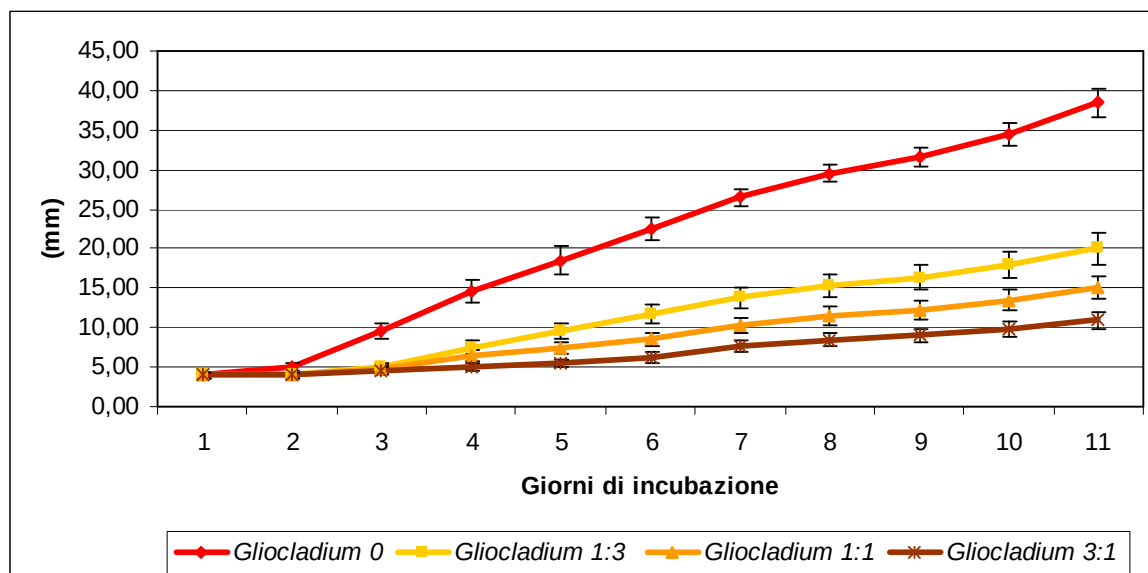


Figura 37. Accrescimento (mm) medio progressivo di colonie di *Biscogniauxia mediterranea* in substrato con assenza (0) o addizionato di filtrato culturale di *Gliocladium roseum* in rapporto di 1:3, 1:1 e 3:1 rispetto al substrato.

Gliocladium roseum* – *Coryneum quercinum

Coltura duale.

In coltura duale, *C. quercinum* ha subito una azione inibitrice da parte di *G. roseum*, con differenze però tra un ceppo e l'altro (Fig. 38). Il ceppo 1 del patogeno si è mostrato più sensibile degli altri due alla presenza di *G. roseum* (Fig. 39). Anche in questo caso si è notata una certa variabilità tra i ceppi, per esempio nell'incrocio *C. quercinum* 3 e *G. roseum* si è visto un allineamento degli accrescimenti tra patogeno e antagonista (Fig. 40), mentre nell'incrocio *C. quercinum* 1 x *G. roseum*, oltre ai valori di accrescimento minori rispetto al testimone, si nota visivamente una disposizione spaziale della colonia di *C. quercinum* alterata rispetto al testimone (Fig.41).

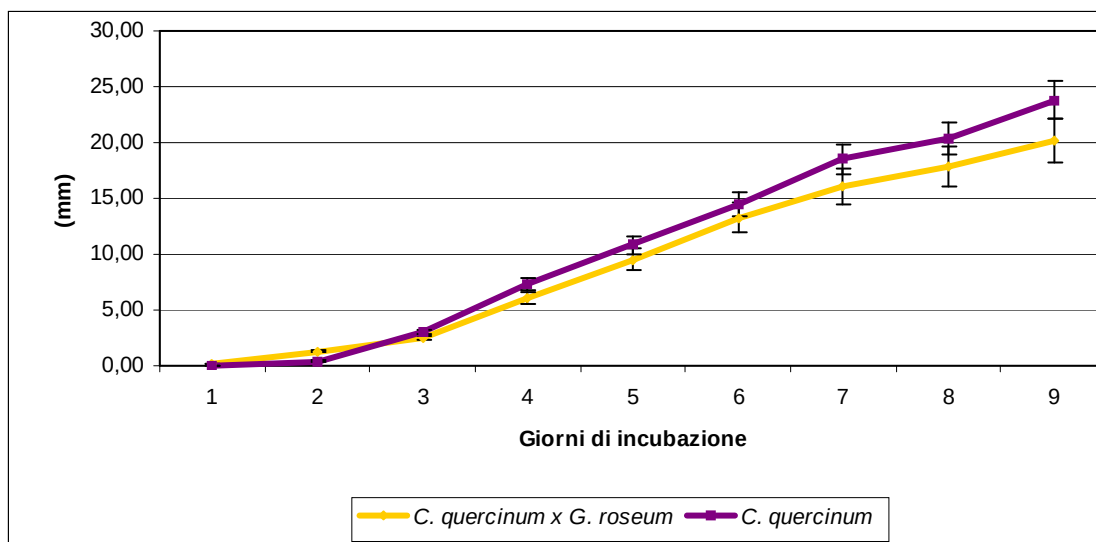


Figura 38. Accrescimento (mm) progressivo medio di colonie di *Coryneum quercinum* in coltura duale con *Gliocladium roseum* od in coltura pura.

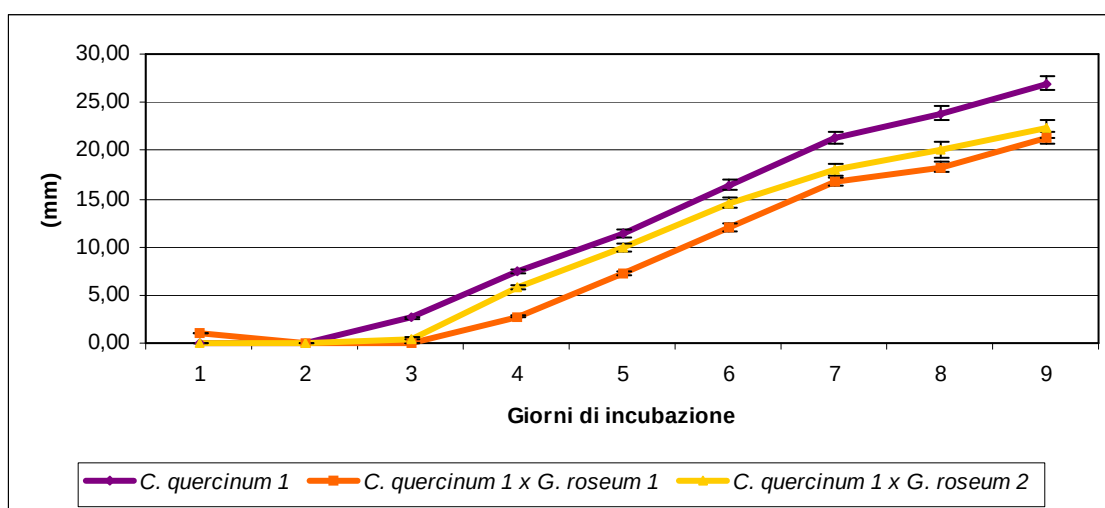


Figura 39. Accrescimento (mm) medio progressivo di colonie del ceppo 1 di *Coryneum quercinum* in coltura pura od in coltura duale con i ceppi 1 e 2 di *Gliocladium roseum*.

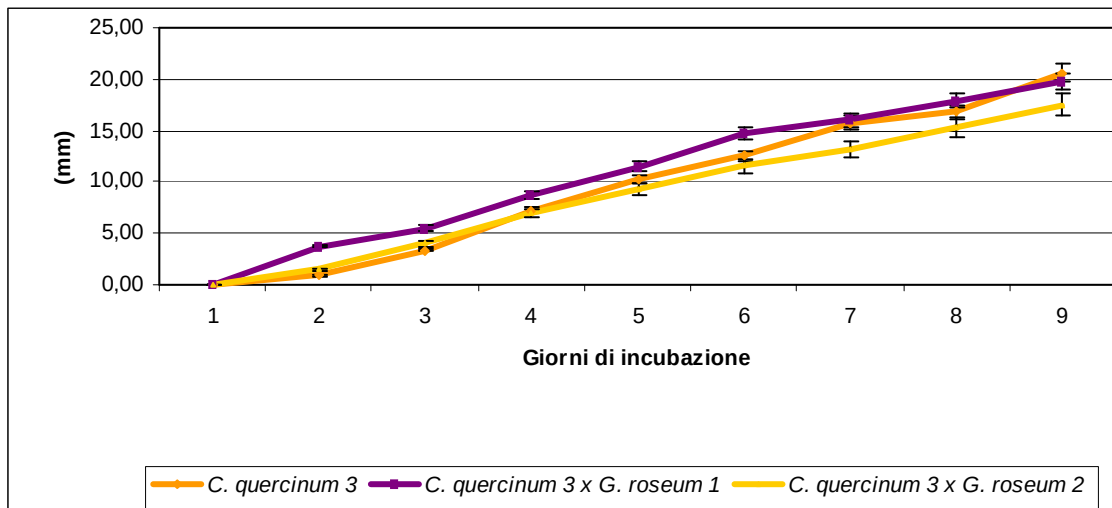


Figura 40. Accrescimento (mm) medio progressivo di colonie del ceppo 3 di *Coryneum quercinum* in coltura duale con i ceppi 1 e 2 di *Gliocladium roseum* od in coltura pura.

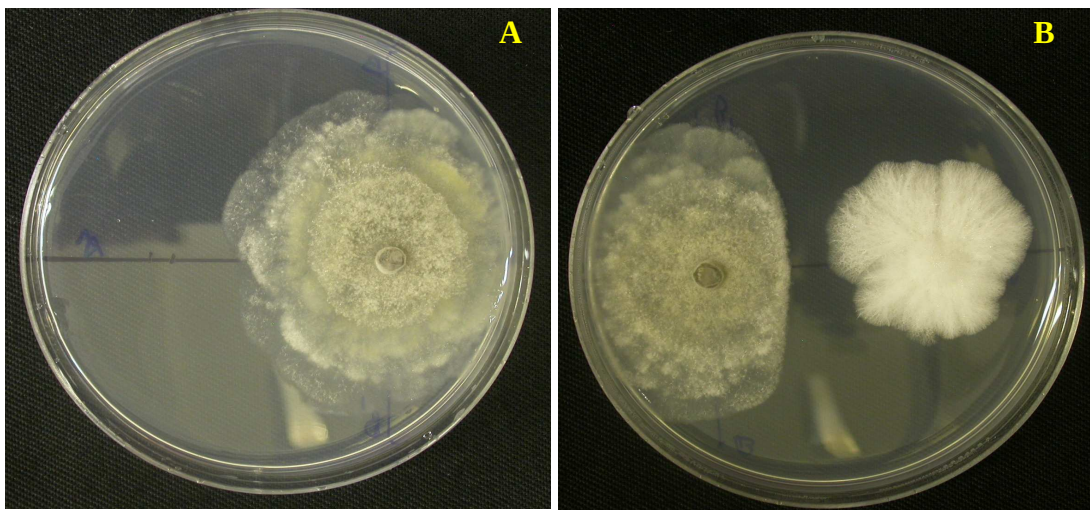


Figura 41. Disposizione spaziale del micelio di *Coryneum quercinum* (a) in assenza od in presenza di *Gliocladium roseum* (b).

Filtrato culturale.

Nella figura 42 si può notare come l'aggiunta di estratti culturali di *G. roseum* al substrato espliciti un significativo effetto negativo sullo sviluppo di *C. quercinum*. L'accrescimento medio delle colonie del patogeno si riduce notevolmente all'aumentare delle concentrazioni di filtrato culturale dell'antagonista.

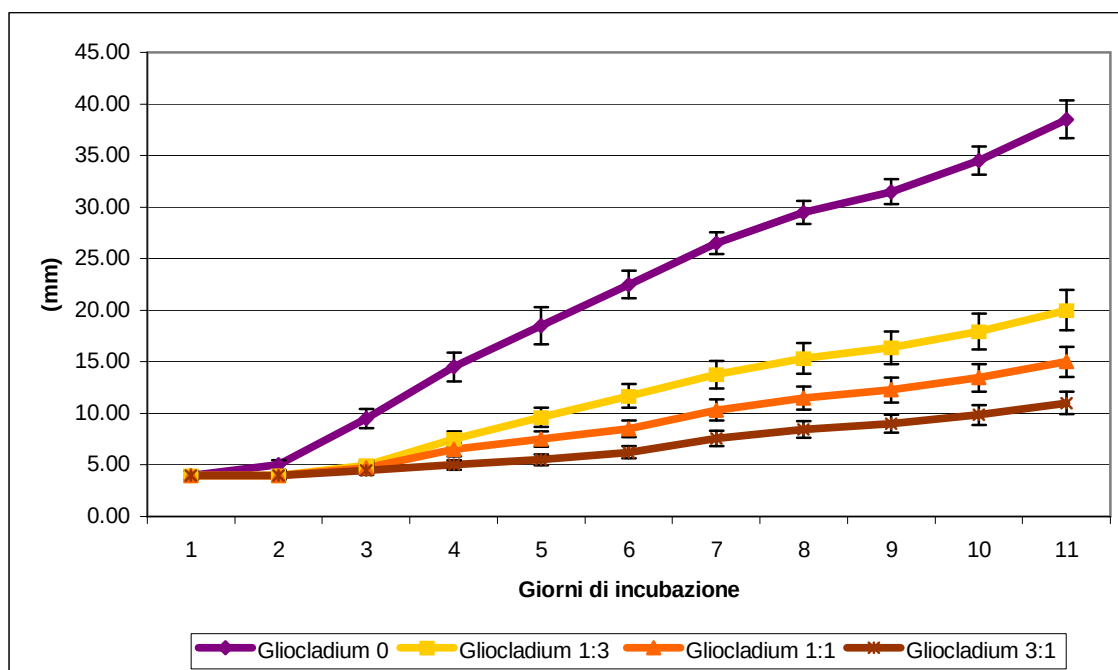


Figura 42. Accrescimento (mm) medio progressivo di colonie di *Coryneum quercinum* in substrati con assenza (0) o con concentrazione di filtrato culturale di *Gliocladium* pari a 1:3, 1:1 e 3:1.

Gliocladium roseum* – *Pleurophoma cava

Coltura duale.

In coltura duale, l'accrescimento di nessuno dei ceppi di *P. cava* è risultato influenzato dalla presenza di *G. roseum*. Questo comportamento risulta evidente dal grafico in figura 43 in cui l'andamento dell'accrescimento delle colonie del patogeno in monocultura, è stato del tutto analogo a quello della coltura duale.

Filtrato culturale.

Anche dalle prove effettuate tramite l'utilizzo di filtrato culturale di *G. roseum* addizionato al substrato in vari rapporti è emerso un effetto antagonistico del fungo nei confronti del patogeno. Come si può evincere dalla figura 44 l'accrescimento delle colonie del patogeno sui substrati contenenti filtrato culturale non si discosta significativamente dal testimone.

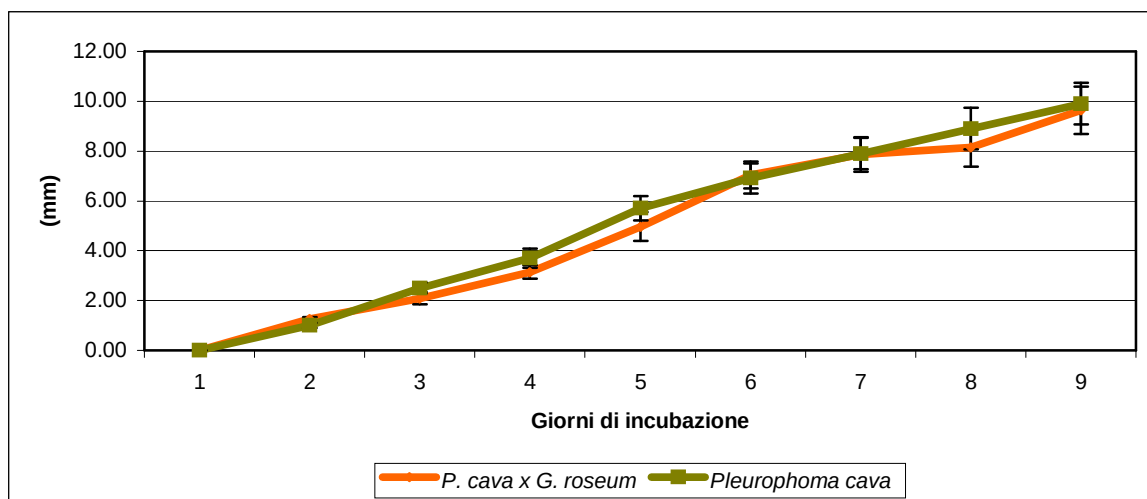


Figura 43. Accrescimento (mm) medio progressivo di *Pleurophoma cava* in coltura duale con *Gliocladium roseum* od in coltura pura.

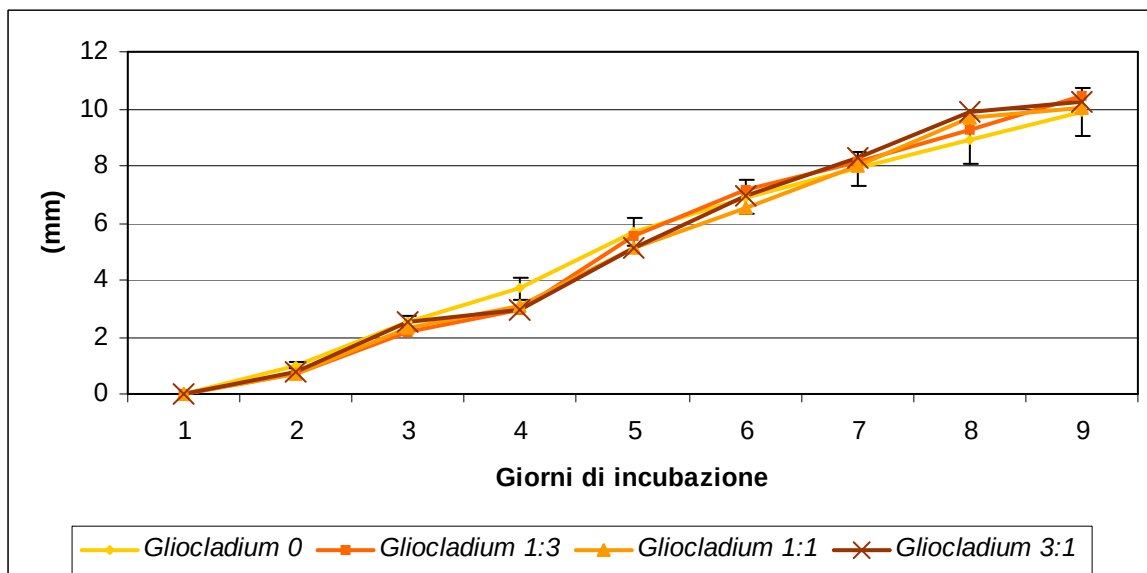


Figura 44. Accrescimento (mm) medio progressivo delle colonie di *Pleurophoma cava* in substrati con assenza (0) o con concentrazione di filtrato culturale di *Gliocladium roseum* pari a 1:3, 1:1 e 3:1.

F) *PENICILLIUM* SP.

Penicillium sp. – *Biscognauxia mediterranea*

Coltura duale.

Come si può osservare dal grafico riportato, come esempio, in figura 45, *Penicillium* sp. non ha mostrato alcuna azione antagonistica a livello miceliare, nei confronti di *B. mediterranea*.

L'accrescimento medio del patogeno in coltura pura è risultato analogo a quello verificatosi in presenza del potenziale antagonista.

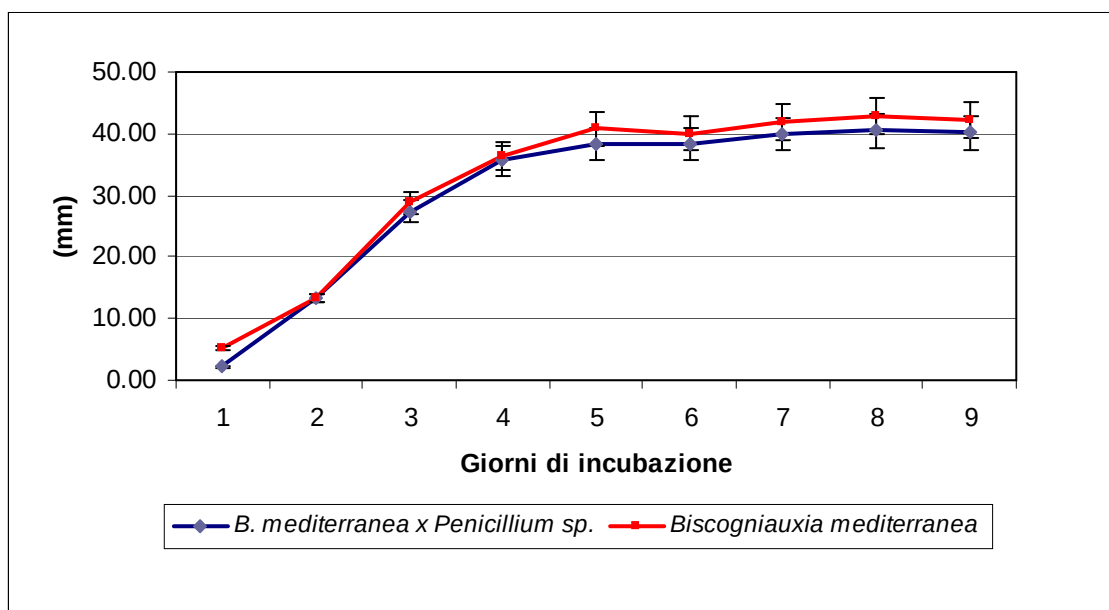


Figura 45. Accrescimento (mm) medio progressivo nel tempo delle colonie di *Biscognauxia mediterranea* in coltura duale con *Penicillium* sp. in confronto con il testimone in coltura pura.

Filtrato culturale.

Con l'utilizzo dei filtrati culturali è stato notato come l'accrescimento dei ceppi di *B. mediterranea* sia stato influenzato dalla presenza nel substrato di filtrato di *Penicillium* sp. a tutte le concentrazioni. Mentre inizialmente detta presenza sembrava avere un effetto stimolante sull'accrescimento del patogeno, dal quarto giorno, la coltura testimone ha mostrato accrescimenti maggiori rispetto a quelli delle colture contenenti filtrato culturale di *Penicillium* sp., soprattutto alle concentrazioni maggiori (Fig. 46).

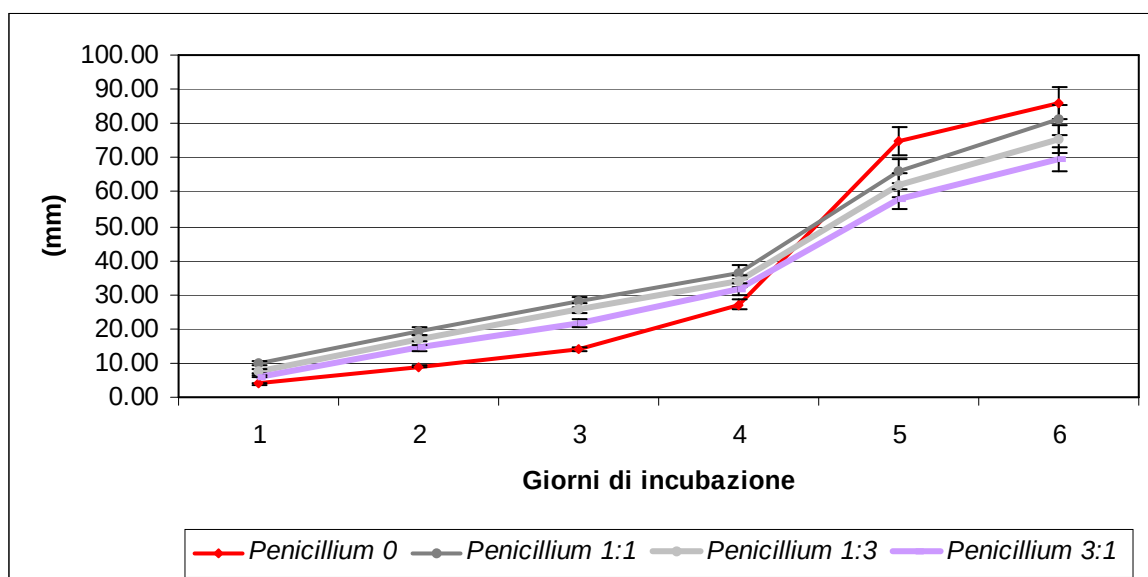


Figura 46. Accrescimento (mm) medio progressivo delle colonie di *Biscogniauxia mediterranea* in substrati con assenza (0) o con concentrazione di filtrato colturale di *Penicillium* sp. pari a 1:3, 1:1 e 3:1.

Penicillium* sp. – *Coryneum quercinum

Coltura duale.

In coltura duale, come si può notare nel grafico in figura 47, *Penicillium* sp. è risultato avere un certo effetto inibitorio sullo sviluppo delle colonie di *Coryneum quercinum*, variabile però da un ceppo all'altro. Il ceppo 1 del patogeno sembrerebbe aver maggiormente risentito della presenza di *Penicillium* sp. rispetto agli altri due.

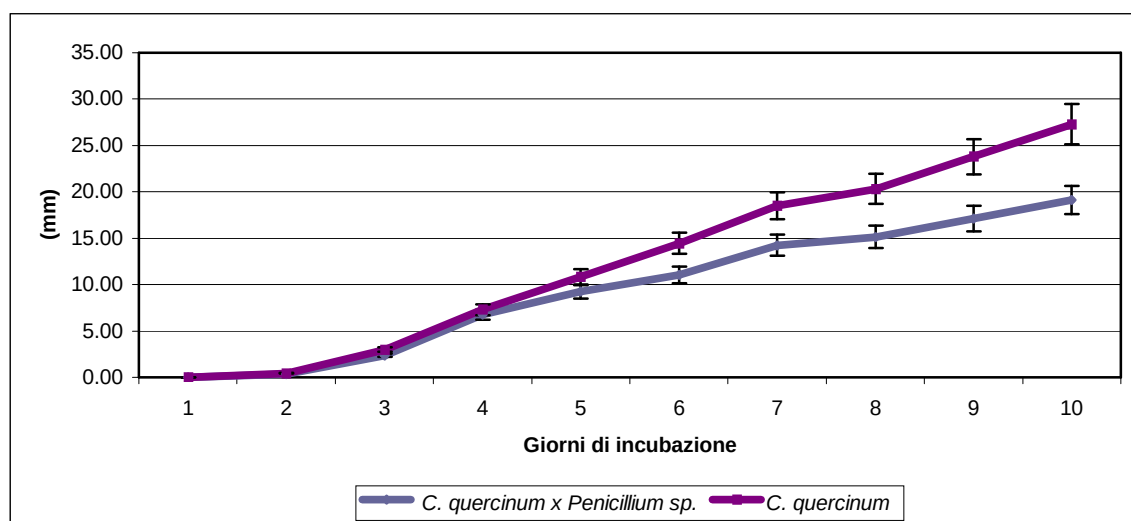


Figura 47. Accrescimento (mm) medio progressivo di colonie di *Coryneum quercinum* in coltura duale con *Penicillium* sp. od in coltura pura.

Filtrato culturale.

Con l'utilizzo dei filtrati colturali di *Penicillium* sp., si è evidenziato che il fungo svolge una significativa azione antagonista nei confronti di *Coryneum quercinum*, crescente con l'aumentare della concentrazione. In figura 48 si evidenzia un andamento analogo al testimone con concentrazione di filtrato più bassa (1:3), mentre già ad una concentrazione di 1:1 si nota un calo considerevole degli accrescimenti progressivi medi.

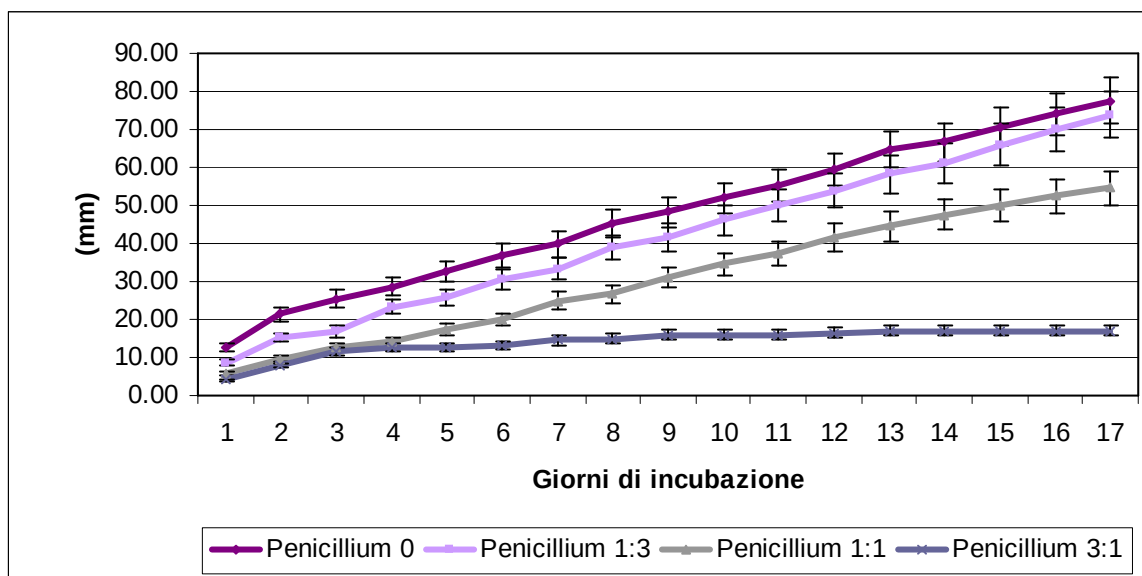


Figura 48. Accrescimento (mm) medio progressivo delle colonie di *Coryneum quercinum* in substrati con assenza (0) o con concentrazione di filtrato culturale di *Penicillium* sp. pari a 1:3, 1:1 e 3:1.

Penicillium sp. – *Pleurophoma cava*

Gli isolati di *Penicillium* sp. saggianti non risultano avere, in coltura duale, nessuna particolare attività verso *P. cava* (Fig. 49).

Filtrato culturale.

Come riportato dall'esempio in figura 50, l'utilizzo dei filtrati colturali dei diversi ceppi di *Penicillium* sp. ha avuto un effetto stimolante sull'accrescimento del patogeno.

Le colonie del patogeno cresciute su substrato testimone, senza estratti miceliari di *Penicillium* sp., hanno mostrato uno sviluppo più lento di quelle cresciute su substrato addizionato dell'estratto.

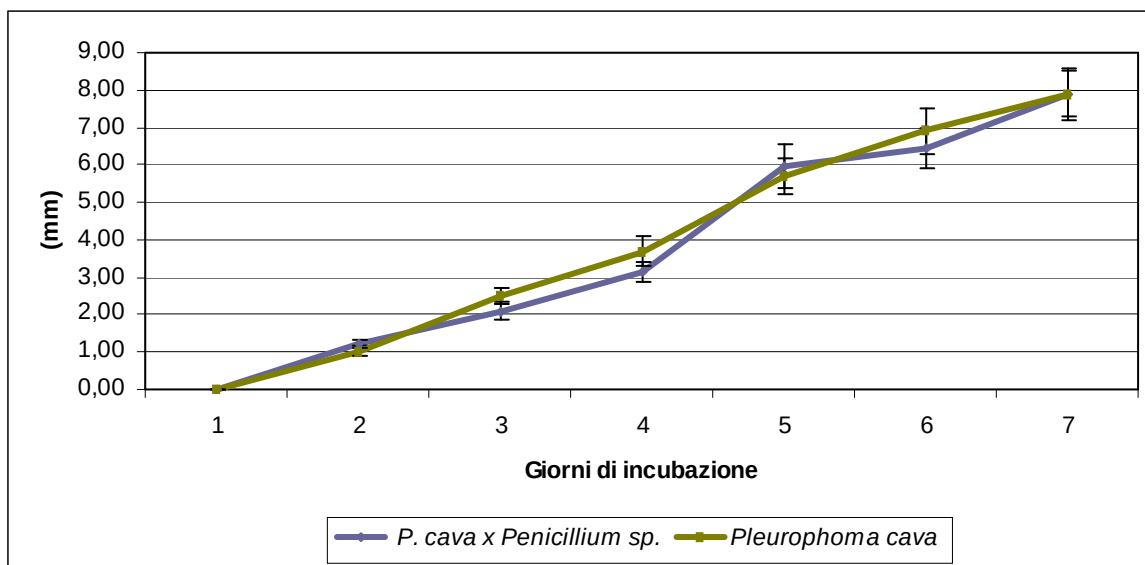


Figura 49. Accrescimento (mm) medio progressivo di colonie di *Pleurophoma cava* in coltura duale con *Penicillium* sp. od in coltura pura.

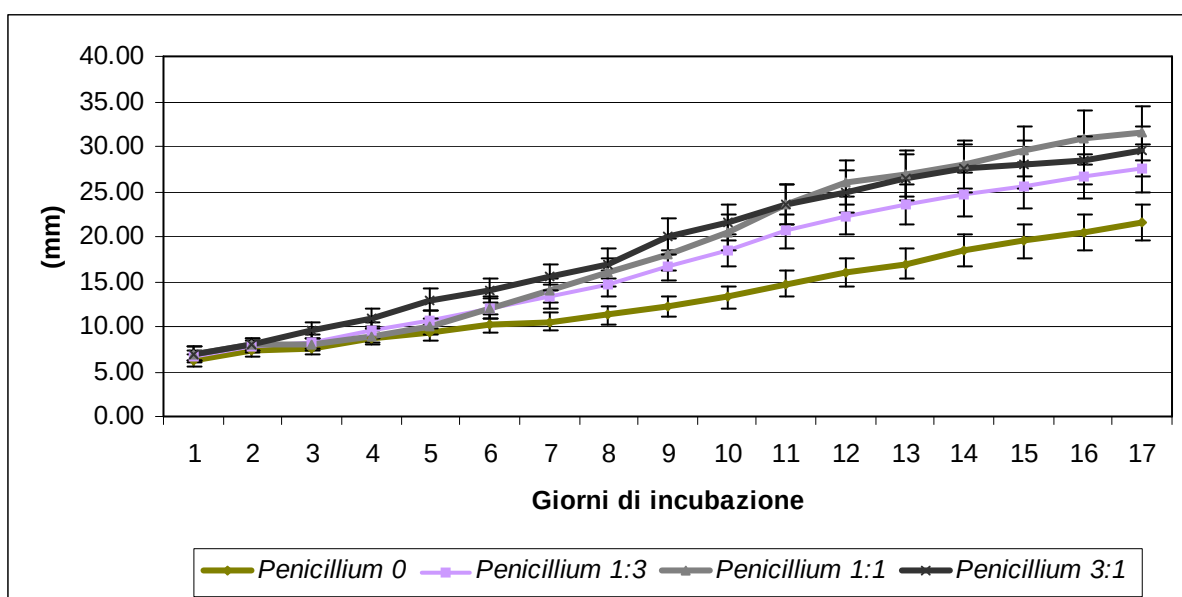


Figura 50. Accrescimento (mm) medio progressivo di colonie di *Pleurophoma cava* in substrati con assenza (0) o con concentrazione di filtrato colturale di *Penicillium* pari a 1:3, 1:1 e 3:1.

G) TRICHODERMA VIRIDE

Trichoderma viride* – *Biscogniauxia mediterranea

L'azione antagonistica in coltura duale da parte di *T. viride* nei confronti di *B. mediterranea* si manifesta fin dal terzo giorno di crescita, quando il micelio dell'antagonista prevale sul quello del patogeno, sviluppandosi sopra di esso.

I ritmi di accrescimento particolarmente elevati sia per il patogeno che il non patogeno hanno impedito di poter creare curve di crescita per mancanza di una congrua serie di valori. Come già detto, infatti, già dopo due – tre giorni di incubazione è avvenuto il contatto tra i due miceli (Fig. 51).

Per contro però è stato possibile stabilire una forte azione micoparassitica da parte di *Trichoderma viride*. Tale azione era visibile in tutti e tre i ceppi dell'antagonista e su tutti gli isolati del patogeno, confermando quanto riportato in letteratura a proposito di questo ifale.

L'azione fortemente antagonistica era in qualche caso limitata da parte del patogeno con la formazione di un setto scuro ben visibile sul micelio, presumibilmente un tentativo di arrestare la colonizzazione del proprio micelio da parte di *T. viride*. Nella figura 52 sono riportati esempi di colture duali in capsule Petri, in cui è evidente la formazione del sopra citato setto di separazione tra i due miceli ad opera di *B. mediterranea*, nonché le reazioni cromatiche del patogeno all'azione "predatoria" da parte dell'antagonista. Reisolamenti in prossimità della zona di contatto hanno dimostrato come il micelio di *B. mediterranea* non fosse più vitale.

A distanza di qualche giorno, comunque, la resistenza del patogeno, dovuta presumibilmente al rilascio di tossine nel substrato, veniva vinta da parte dell'antagonista che completava la colonizzazione della capsula Petri. Oltre questo momento diveniva impossibile reisolare il patogeno.

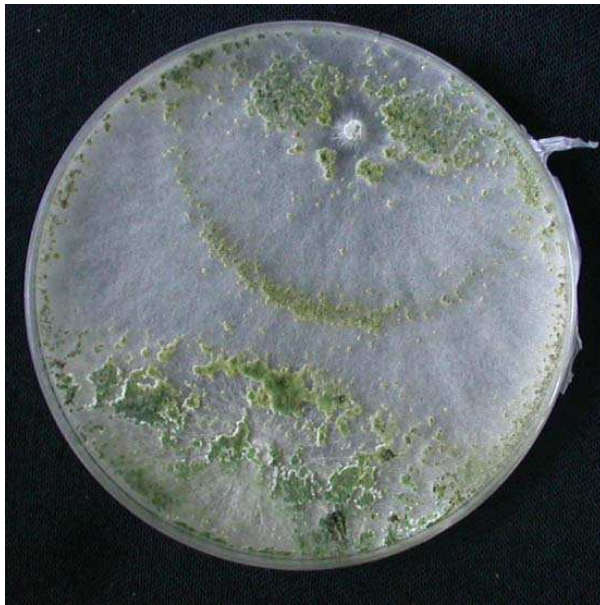


Figura 51. Coltura duale di *Biscogniauxia mediterranea* (originariamente inoculata in basso) e *Trichoderma viride* a 5 giorni dal momento dell'inoculo. Si noti come il micelio dell'antagonista abbia interamente ricoperto il patogeno, arrivando anche alla formazione delle fruttificazioni conidiche.



Figura 52. Colture duali di *B. mediterranea* e *T. viride* in cui si evidenzia la formazione del setto di separazione tra i due miceli ad opera di *B.*

Filtrato culturale.

I risultati ottenuti utilizzando substrato addizionato a concentrazioni diverse di filtrato culturale di *T. viride*, hanno confermato le capacità antagonistiche di *T. viride* nei confronti di *B. mediterranea*, sebbene in misura molto minore rispetto alle prove precedenti (Fig. 53). Lo sviluppo delle colonie del patogeno in presenza dei filtrati di *Trichoderma*, in effetti, si riduce notevolmente solo quando si prendono in considerazione le concentrazioni maggiori (3 parti di filtrato ed una di PDA), sempre confrontato ovviamente con il relativo testimone (3 parti di acqua sterile ed una di PDA) (Fig. 54). Tale azione è risultata via via ridursi alle concentrazioni più basse del filtrato rispetto al substrato (Figg. 55 e 56).

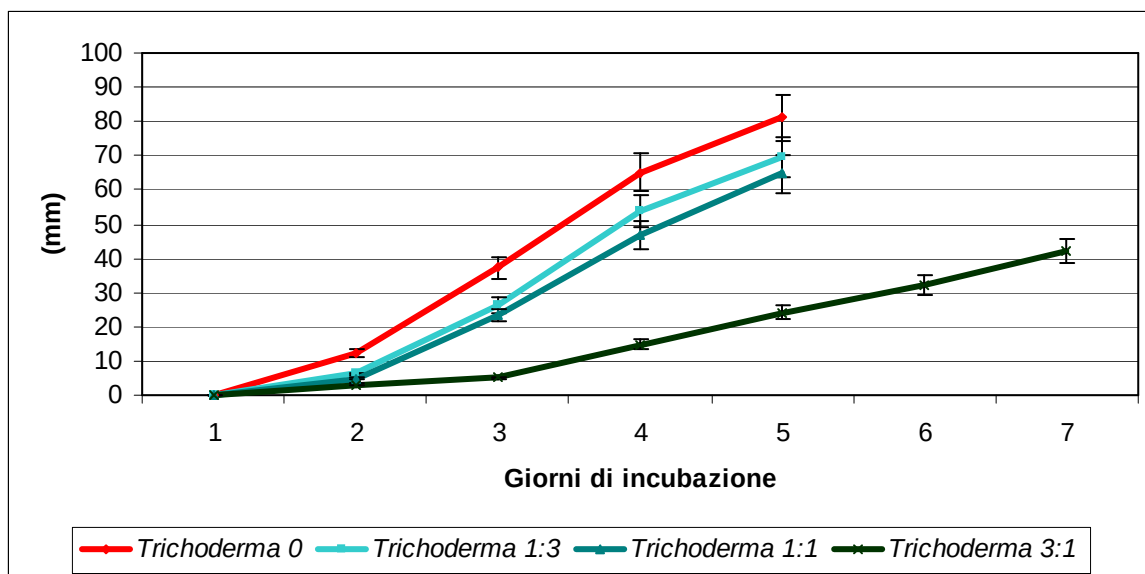


Figura 53. Accrescimento (mm) medio di colonie di *Biscogniauxia mediterranea* in assenza (0) od in presenza di filtrato culturale di *Trichoderma viride*, in rapporto 1:3, 1:1 e 3:1 con il substrato, a diversi giorni di incubazione.

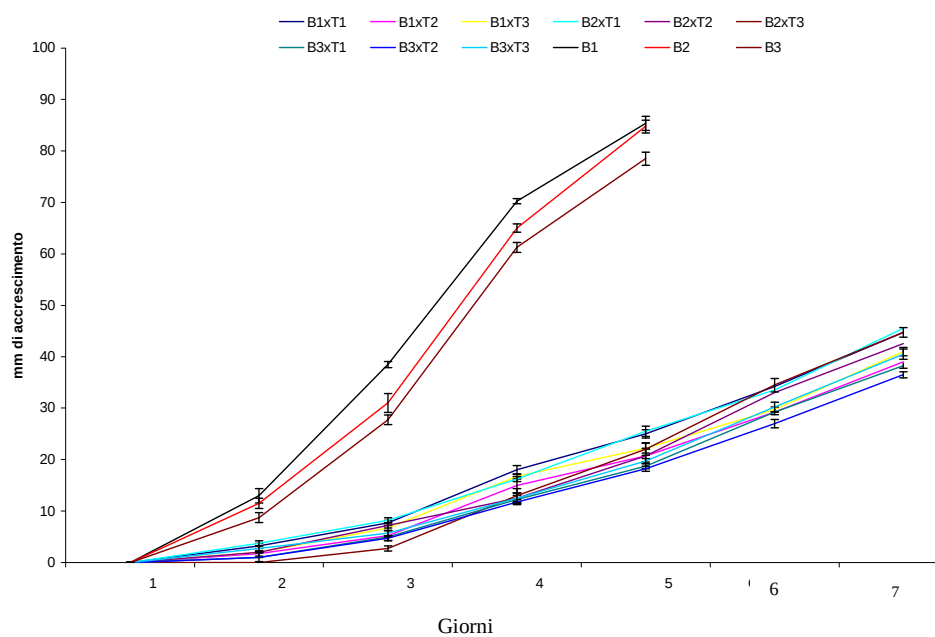


Figura 54. Accrescimento (mm) medio di tre ceppi di *Biscogniauxia mediterranea* in assenza od in presenza di filtrato culturale dei diversi isolati di *Trichoderma viride*, in rapporto 3:1 con il substrato, a diversi giorni di incubazione.

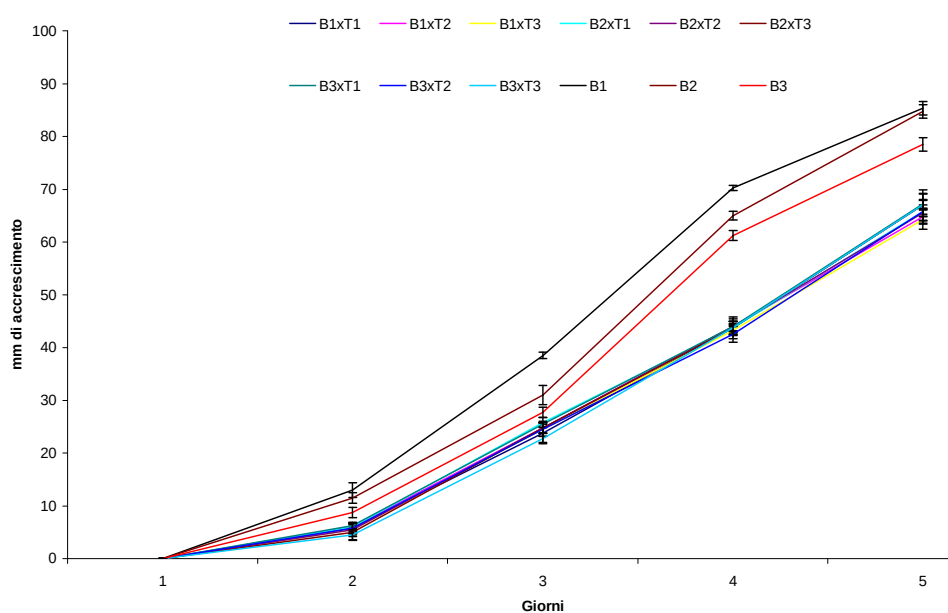


Figura 55. Accrescimento (mm) medio di tre ceppi di *Biscogniauxia mediterranea* in assenza od in presenza di filtrato culturale dei diversi isolati di *Trichoderma viride*, in rapporto 1:1 con il substrato, a diversi giorni di incubazione.

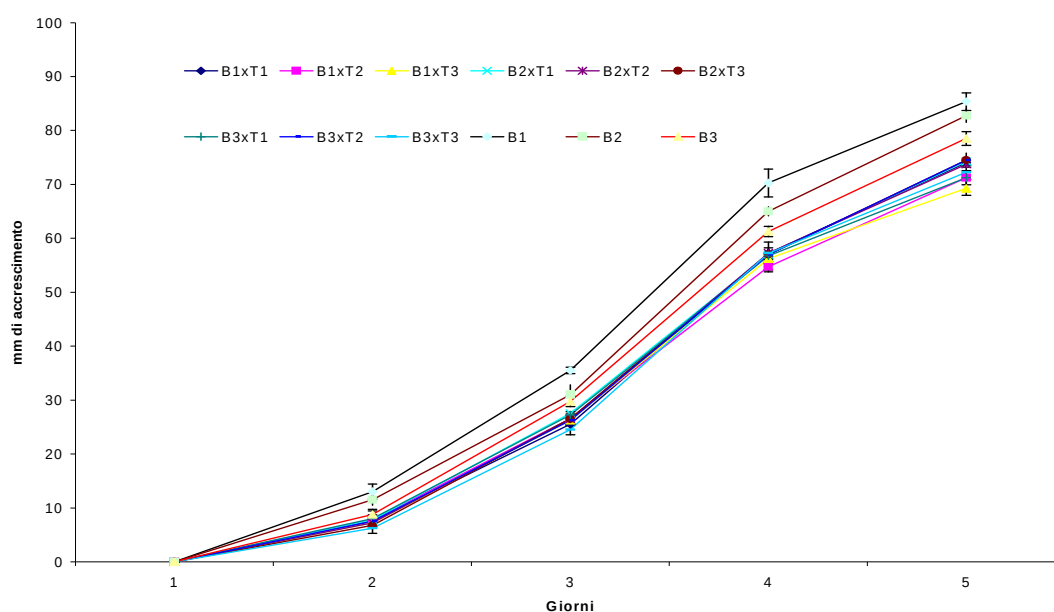


Figura 56. Accrescimento (mm) medio di tre ceppi di *Biscogniauxia mediterranea* in assenza od in presenza di filtrato culturale dei diversi isolati di *Trichoderma viride*, in rapporto 1:3 con il substrato, a diversi giorni di incubazione.

In particolare, con la concentrazione di 1:3, ad esempio, le differenze rispetto ai testimoni divengono praticamente trascurabili, sebbene ancora statisticamente significative. In nessun caso tra l'altro si sono presentate differenze particolarmente apprezzabili tra i diversi ceppi anche se, tra gli isolati di *B. mediterranea* saggiati, il B1, che peraltro appare anche il più veloce nello sviluppo, è risultato sempre il meno inibito.

Trichoderma viride* – *Coryneum quercinum

Coltura duale.

I tre ceppi di *T. viride* (T1 ,T2, T3) risultano avere un notevole antagonismo sullo sviluppo di *C. quercinum*, basato quasi esclusivamente sulla forte attività micoparassitica. Analogamente a quanto descritto per *B. mediterranea*, sin dal terzo giorno, il micelio dell'antagonista in tutti e tre gli isolati, prevale sul micelio del patogeno sviluppandosi a carico di esso, parassitizzandolo (Fig. 57).

Ciò è dimostrato dalla impossibilità di reisolare il patogeno nelle zone già invase da *T. viride*. Ad ogni tentativo infatti, l'unico micelio che si sviluppava era sempre quello di *T. viride*.

I ceppi di *C. quercinum* mostrano senza alcuna significativa distinzione una crescita molto lenta rispetto a quella di *T. viride*, ma l'azione antagonistica si manifesta anche inoculando il patogeno con 4 giorni di anticipo.

Anche in questo caso è stato impossibile calcolare gli indici di inibizione in quanto la velocità di crescita dell'antagonista, che in due tre giorni colonizzava interamente la capsula Petri e il micelio di *C. quercinum*, ha impedito di effettuare un numero congruo di misurazioni

Filtrato colturale.

I tre ceppi di *T. viride* utilizzati per la preparazione dei filtrati colturali, risultano avere una azione antagonistica abbastanza omogenea nei confronti di *C. quercinum*, esplicitata alle due concentrazioni più elevate.

In figura 58 si evidenzia un andamento analogo al testimone con concentrazioni di filtrato più basse (1:3 e 1:1 fino al tredicesimo giorno), mentre a concentrazione più elevata si nota un calo considerevole degli accrescimenti medi già al decimo giorno.

.



Figura 57. Coltura duale di *C. quercinum* e *T. viride* al quarto giorno dall'inoculo dell'antagonista. La colonia del patogeno risulta ormai completamente ricoperta da *T. viride*.

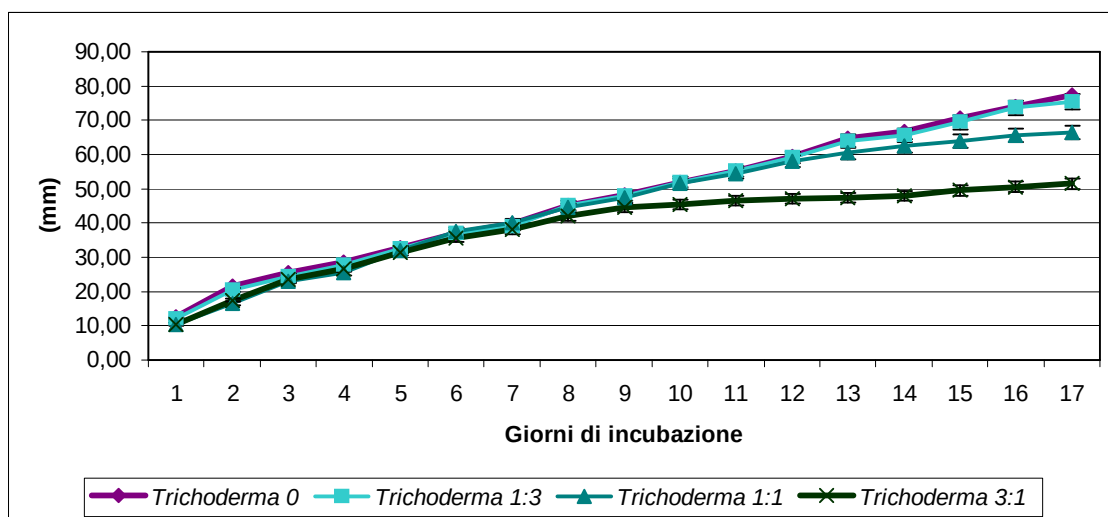


Figura 58. Accrescimenti (mm) medi giornalieri di *Coryneum quercinum* in assenza (0) od in presenza di filtrato culturale di *Trichoderma viride* in concentrazioni 1:3, 1:1 e 3:1.

***Trichoderma viride* – *Pleurophoma cava*.**

Coltura duale.

I diversi isolati di *T. viride* saggiati (T1 ,T2, T3) risultano avere anche nei confronti di questo patogeno un notevole antagonismo di natura micoparassitica. Analogamente a quanto descritto per *B. mediterranea* e *C. quercinum*, sin dal terzo giorno il micelio dell'antagonista in tutti e tre gli isolati, prevale sul patogeno sviluppandosi a carico di esso, parassitizzandolo.

Questo avviene anche quando *P. cava* viene inoculata con alcuni giorni di anticipo rispetto all'antagonista per tener conto dei suoi ritmi di crescita particolarmente lenti. I ceppi del

patogeno infatti, mostrano senza alcuna distinzione significativa una crescita molto più lenta (inizialmente meno di un mm al giorno) rispetto a quella dell'antagonista.

Trascorsi 5 – 6 giorni dal contatto tra le ife, non è stato più possibile risolvere il patogeno in coltura pura. Ad ogni tentativo infatti, l'unico micelio che si sviluppava era sempre e soltanto quello di *T. viride*. Anche in questo caso è stato impossibile calcolare gli indici di inibizione per l'alta velocità di crescita dell'antagonista, che in due tre giorni colonizzava interamente la capsula Petri.

Filtrato colturale.

Su *P. cava*, al contrario di quanto verificato per gli altri due patogeni, i filtrati colturali di *T. viride* hanno avuto un effetto stimolante sul patogeno, come si evidenzia dalla figura 59. Infatti, la tendenza generale delle colonie cresciute su substrati addizionati è stata quella di un netto maggiore accrescimento soprattutto per quelle cresciute su substrati addizionati di filtrato colturale di *T. viride* in rapporto 3:1.

Il controllo, soprattutto dal sesto giorno di incubazione, si discosta negativamente dagli accrescimenti delle colonie cresciute su substrati addizionati.

Sembrerebbe pertanto che mentre verso *B. mediterranea* e *C. quercinum* *T. viride* mostri sia un'azione parassitica che un effetto "tossico" verso il patogeno, nei confronti di *P. cava* quest'ultimo effetto viene a mancare.

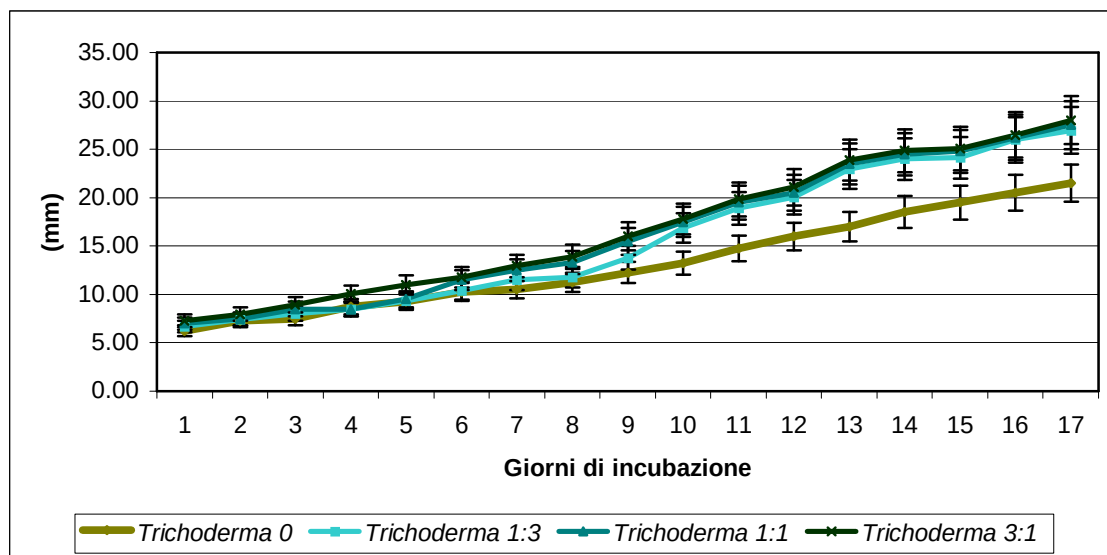


Figura 50. Accrescimenti (mm) medi giornalieri di *Pleurophoma cava* in assenza (0) od in presenza di filtrato colturale di *Trichoderma viride* in concentrazioni 1:3, 1:1 e 3:1.

H) *VERTICILLIUM LECANII*

Verticillium lecanii – *Biscogniauxia mediterranea*

Coltura duale.

Nella figura 60 è riportato il quadro riassuntivo degli sviluppi medi progressivi nel tempo dei tre ceppi del patogeno in colture duali con i tre diversi isolati di *V. lecanii*. Da essa, emerge come la crescita delle colonie di *B. mediterranea* si riduca notevolmente a partire dal quarto giorno. Ciò significa che quando le colture duali si avvicinano, *V. lecanii* comincia ad esplicare una certa azione antagonistica, dovuta probabilmente alla produzione di metaboliti. Tali effetti di inibizione sono evidenti nella figura 61.

Gli effetti antagonistici sono messi in evidenza nella tabella 23, dove vengono riportati gli indici medi di inibizione espressi in coltura duale dai tre ceppi di *V. lecanii* nei confronti dei tre ceppi di *B. mediterranea*, a 5 giorni dall'inoculazione. Nella tabella 22 vengono invece riportati gli indici di inibizione medi giornalieri espressi da *V. lecanii* nei confronti dei tre patogeni saggiati.

Filtrato colturale.

I saggi sui filtrati colturali hanno fondamentalmente confermato i risultati ottenuti con le colture duali: *V. lecanii* produce probabilmente dei metaboliti che inibiscono lo sviluppo di *B. mediterranea*. È emersa tuttavia una notevole variabilità nell'azione antagonistica tra i diversi ceppi, a livello sia di inibizione dell'accrescimento (Fig. 62), sia della morfologia delle colonie (Fig. 63).

Tabella 23. Indici di inibizione espressi dai tre ceppi di *Verticillium lecanii* (V1, V2 e V3) nei confronti dei tre ceppi di *B. mediterranea* (B1, B2 e B3) in colture duali, a 5 giorni dall' inoculazione.

		<i>Biscogniauxia mediterranea</i>			
		B1	B2	B3	Media
<i>Verticillium lecanii</i>	V1	76,70	86,48	86,90	84,36
	V2	81,80	81,78	87,50	83,69
	V3	83,13	75,13	80,00	79,42
	Media	81,54	81,13	84,80	82,49

Figura 60. Accrescimento (mm) medio progressivo di *Biscogniauxia mediterranea* in monocoltura ed in coltura duale con tre ceppi di *Verticillium lecanii* nei 7 giorni successivi alla inoculazione.

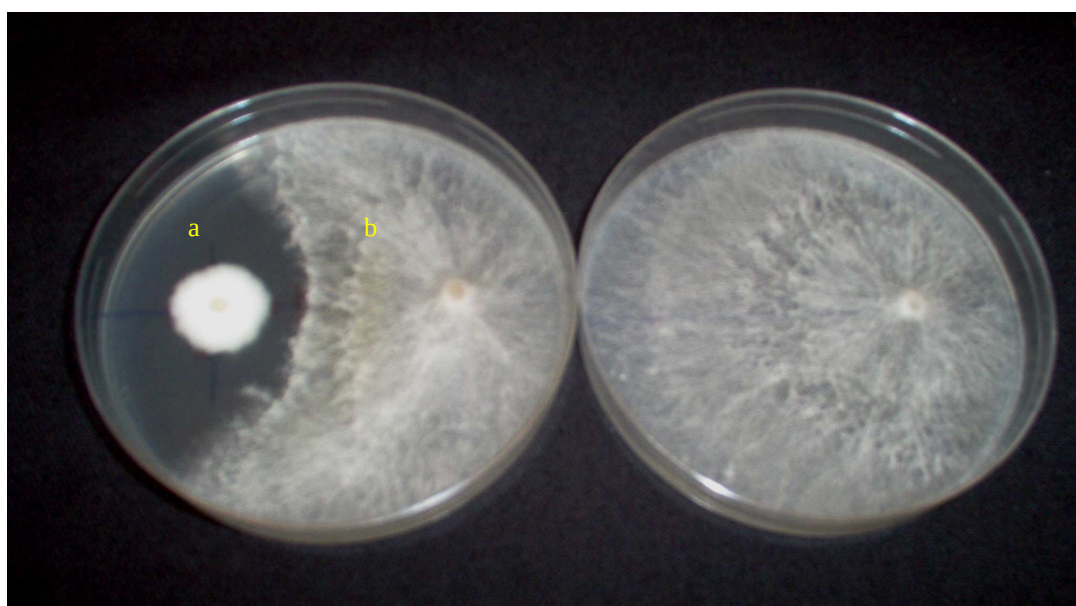
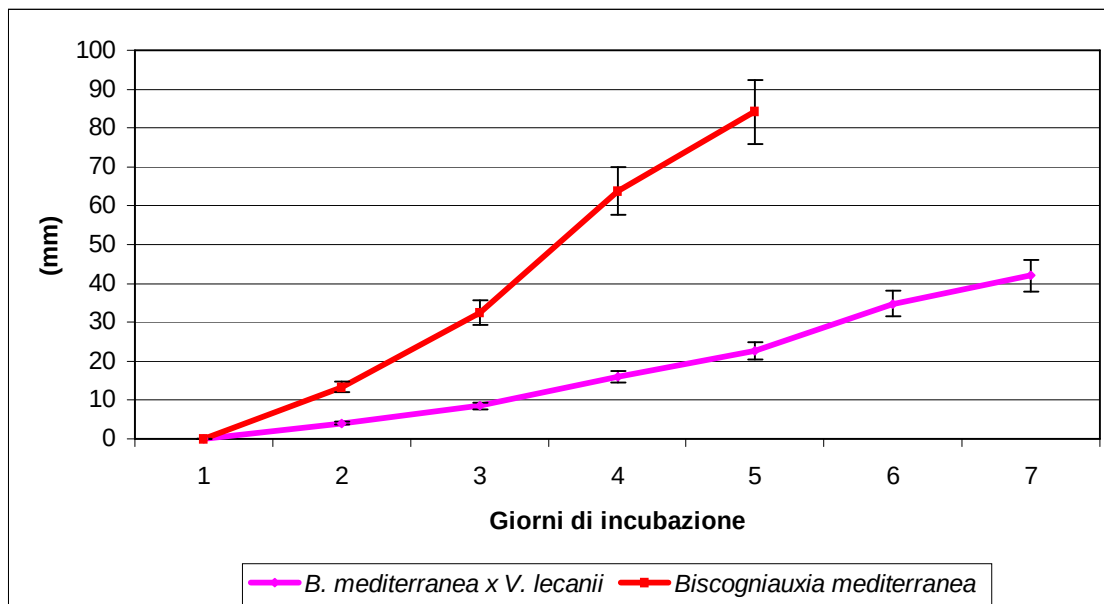


Figura 61. Coltura duale di *Verticillium lecanii* (a) e *Biscogniauxia mediterranea* (b), con a destra la coltura testimone di *B. mediterranea*.

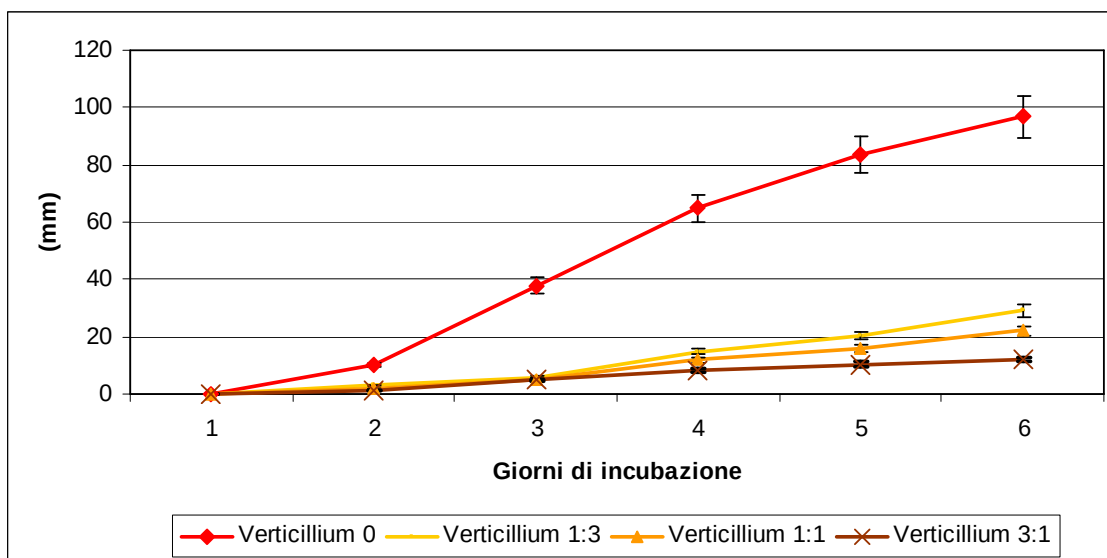


Fig. 62. Accrescimenti (mm) medi giornalieri di *Biscognauxia mediterranea* in assenza (0) od in presenza di filtrato culturale di *Verticillium lecanii* in concentrazioni 1:3, 1:1 e 3:1.

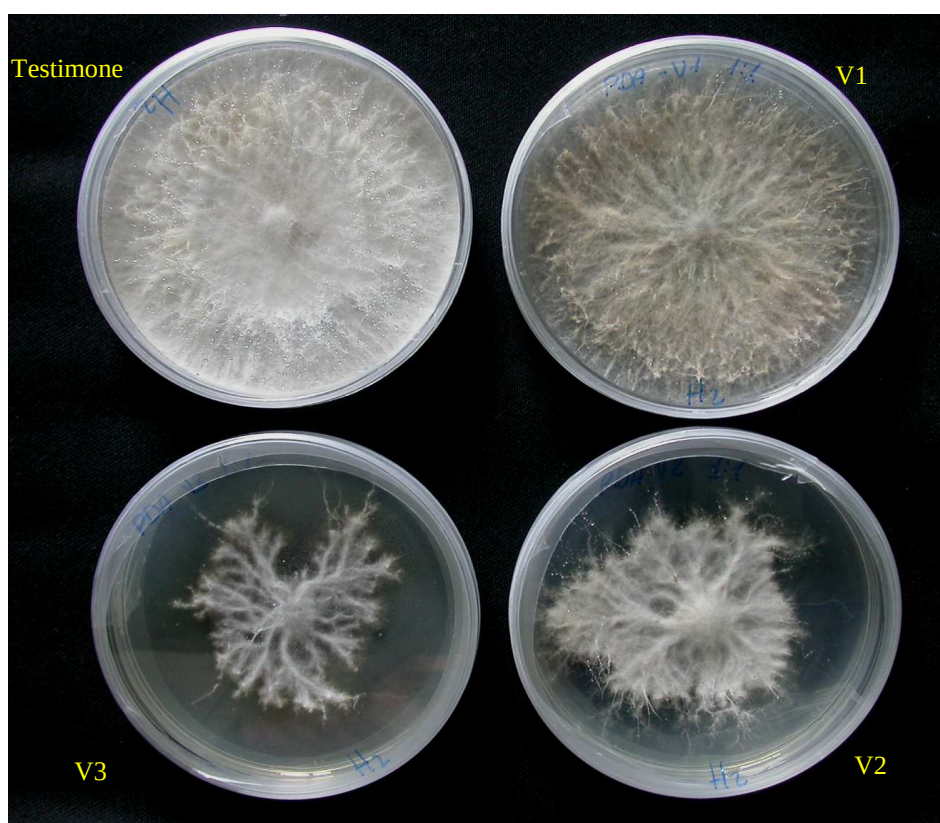


Figura 63. Colonie del Ceppo 2 di *Biscognauxia mediterranea* sviluppatesi su PDA addizionato di filtrati culturali dei 3 isolati di *V. lecanii* in confronto con il testimone.

Verticillium lecanii* – *Coryneum quercinum

Coltura duale.

I tre ceppi di *V. lecanii* (V1, V2, V3) risultano avere una buona azione antagonista nei confronti di *C. quercinum*, azione visibile dall'ottavo giorno in poi (Fig. 64), quando la crescita del patogeno sembra arrestarsi. All'undicesimo giorno, ad esempio, in tutti i casi saggiati, l'indice di inibizione è risultato pari a 100 (Tab. 22).

La tabella 22 mostra come, soprattutto a partire dal settimo giorno, l'indice medio di inibizione tenda ad aumentare sensibilmente.

Una certa variabilità è stata notata tra i ceppi di *C. quercinum*, dei quali il ceppo 3 è risultato il meno sensibile. L'aspetto delle colonie a confronto è raffigurato nella figura 65.

Filtrato culturale.

Dalla figura 66, dove vengono raffigurati gli accrescimenti progressivi medi delle colonie di *C. quercinum* su substrato con assenza o con diverse concentrazioni di filtrato culturale di *V. lecanii*, emerge chiaramente la non interferenza di queste ultime nell'accrescimento del patogeno.

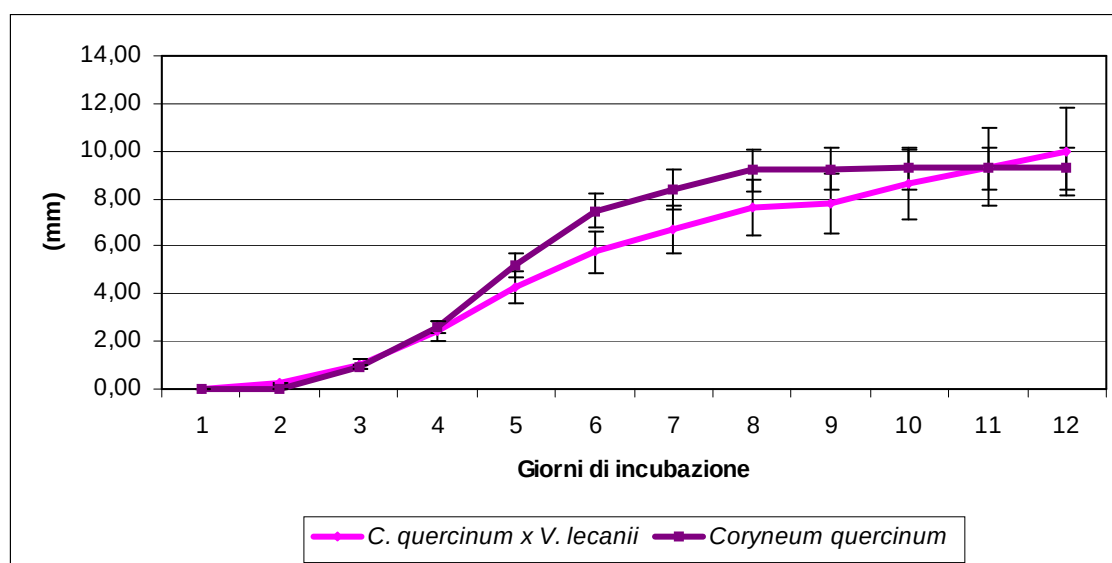


Figura 64. Accrescimento (mm) medio progressivo nel tempo di *Coryneum quercinum* in monocultura (testimone) ed in coltura duale con *Verticillium lecanii*. I valori sono riportati come la media $\pm$ deviazione standard.



Figura 65. Coltura duale del ceppo 1 di *Coryneum quercinum* con il ceppo 2 di *Verticillium lecanii* con a destra la coltura testimone di *Coryneum quercinum*.

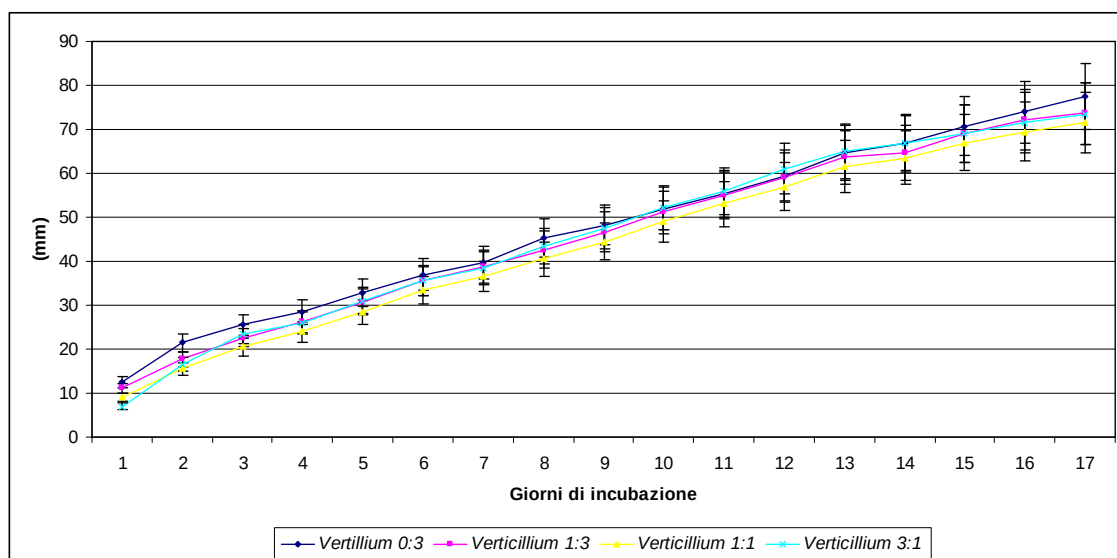


Figura 66. Accrescimento (mm) medio progressivo di colonie di *Coryneum quercinum* in substrati con assenza (0) o con concentrazione di filtrato culturale di *Verticillium lecanii* pari a 1:3, 1:1 e 3:1.

Verticillium lecanii – *Pleurophoma cava*

Coltura duale.

V. lecanii non sembra avere particolari azioni antagonistiche nei confronti di *P. cava*, anzi, quando i due funghi vengono quasi a contatto si riscontra un aumento della crescita del fungo patogeno (Figg. 67, 68 e 69). La sua struttura miceliare subisce tuttavia delle modificazioni: da una analisi allo stereoscopio è stato possibile notare un micelio più lasso, meno compatto, ma soprattutto un aumento delle fruttificazioni picnidiche. Probabilmente ciò è imputabile all'attuazione di una strategia di sopravvivenza, adottata dal fungo in risposta alla presenza di probabili metaboliti prodotti da *V. lecanii*.

Questa particolare azione è messa bene in evidenza dagli indici di inibizione negativi ricavati dai confronti in coltura duale (Tab. 24).

La risposta di *P. cava* alla presenza di un eventuale metabolita prodotto da *V. lecanii* non è uguale in tutti i ceppi esaminati. Il ceppo 2 (PC2) risulta avere una stimolazione maggiore, ciò è particolarmente visibile dagli indici di inibizione che, per questo ceppo, sono particolarmente elevati.

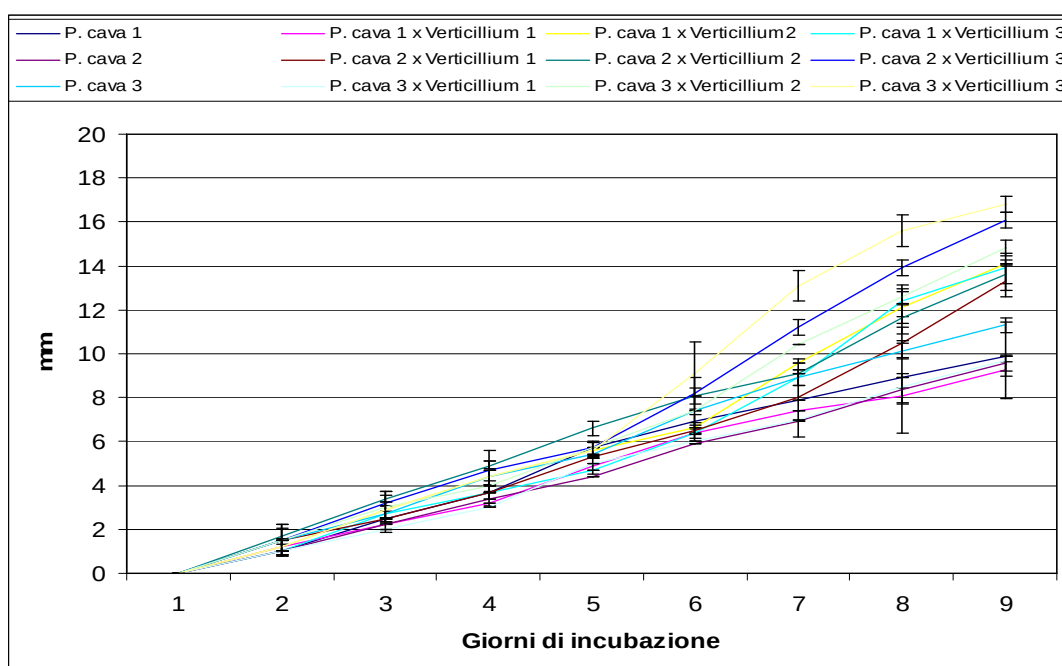


Figura 67. Accrescimento (mm) medio progressivo nel tempo dei tre ceppi di *Pleurophoma cava* in monocultura (testimoni) ed in colture duali con tre ceppi diversi (V1,V2,V3) di *Verticillium lecanii*. I valori sono riportati come la media $\pm$ deviazione standard.

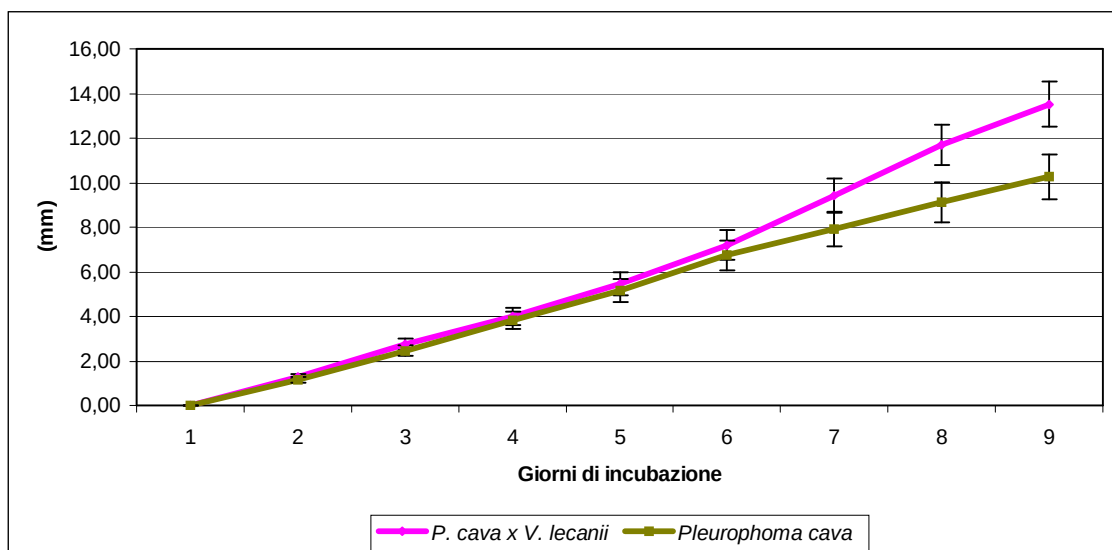


Figura 68. Accrescimento (mm) medio progressivo nel tempo di *Pleurophoma cava* in monocultura (testimone) ed in coltura duale con *Verticillium lecanii*. I valori sono riportati come la media $\pm$ deviazione standard.



Figura 69. Coltura duale del ceppo 2 di *Pleurophoma cava* con il ceppo 2 di *Verticillium lecanii*. Si noti come la colonia di *Pleurophoma cava* in coltura duale con *Verticillium lecanii* sia cresciuta più rapidamente rispetto al testimone.

Tabella 24. Indici medi giornalieri della inibizione indotta da *Verticillium lecanii* sullo sviluppo dei patogeni *Biscogniauxia mediterranea*, *Coryneum quercinum* e *Pleurophoma cava* in colture duali.

Patogeno	Giorni												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Biscogniauxia</i>	7,63	13,54	61,56	76,77	82,49	100,00	–	–	–	–	–	–	–
<i>Coryneum</i>	0,00	0,00	1,99	22,69	12,50	14,00	42,90	46,60	98,50	99,30	100,00	100,00	100,00
<i>Pleurophoma</i>	0,00	-15,70	-16,10	8,57	-12,00	-11,39	-98,33	-76,85	-74,44	–	–	–	–

Filtrato colturale.

Nelle prove con l'utilizzo di filtrati colturali, *Verticillium* sp. sembra confermare un'azione stimolandone a tutti gli effetti l'accrescimento di *Pleurohoma cava* (Fig. 70). Si è osservato infatti che la presenza del filtrato del potenziale antagonista ha l'effetto di far aumentare gli accrescimenti medi rispetto al controllo anche se il micelio risulta modificato, presentandosi con cospicua parte aerea poco sviluppata invece nel controllo.

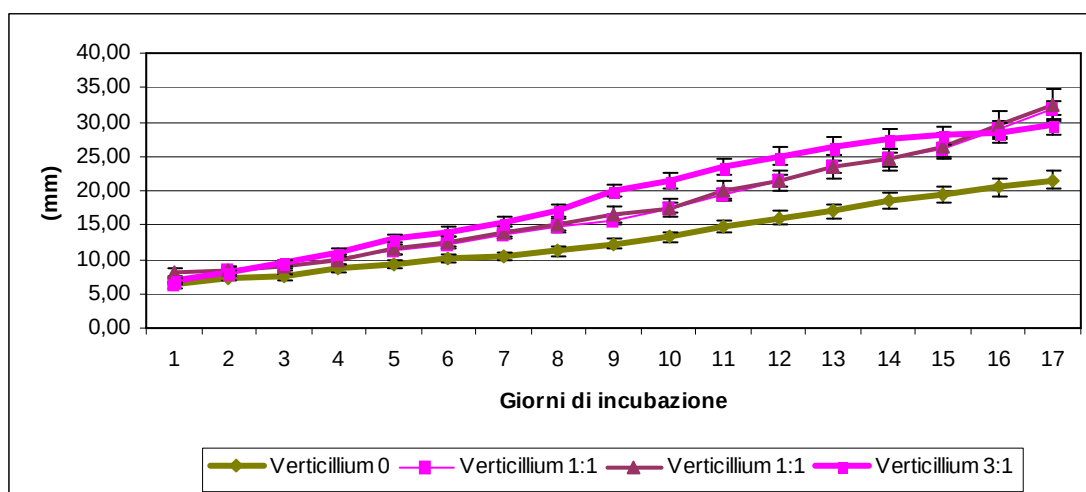


Fig. 70. Accrescimento (mm) medio progressivo di colonie di *Pleurophoma cava* in substrati con assenza (0) o con concentrazione di filtrato colturale di *Verticillium lecanii* pari a 1:3, 1:1 e 3:1.

4.2.2. VALUTAZIONE DELLE INTERAZIONI CON L'INDICE DI BADALYAN

Nella tabella 25, si riportano i risultati della valutazione delle interazioni in coltura duale, ottenuti applicando l'indice di Badalyan (Badalyan *et al.*, 2002; 2004), tra gli 8 funghi non patogeni esaminati e le tre specie di endofiti patogeni.

Attraverso questo indice è stato possibile evidenziare i casi in cui entrambe le colonie (patogeno e non patogeno) arrestavano la loro crescita, manifestando un tipo di interazione competitiva essenzialmente spaziale, quelli in cui si verificava un arresto a distanza delle colonie (più o meno marcato) e quelli infine di sovraccrescita parziale e/o totale del non patogeno sul patogeno dopo un iniziale blocco.

Tab. 25. Indice di inibizione Badalyan tra gli otto endofiti fungini non patogeni e le tre specie patogene esaminate.

Specie non patogene		Specie patogene		
		<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	<i>Coryneum quercinum</i>	<i>Pleurophoma cava</i>
1	<i>Acremonium</i>	0*	0*	1
2	<i>Aureobasidium</i>	0*	2	1
3	<i>Cladosporium</i>	0*	2	1
4	<i>Epicoecum</i>	2	2	2
5	<i>Gliocladium</i>	3,5	3,5	3,5
6	<i>Penicillium</i>	*	1	1
7	<i>Verticillium</i>	2 (+1)	2 (+2)	1
8	<i>Trichoderma</i>	4,5	4,5	4,5
a	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>		0	0
b	<i>Coryneum quercinum</i>	0		1
c	<i>Pleurophoma cava</i>	0	1	

* In questi casi è il patogeno che cresce sull'altro fungo

Attraverso questo indice è stato possibile evidenziare i casi in cui entrambe le colonie (patogeno e non patogeno) arrestavano la loro crescita, manifestando un tipo di interazione competitiva essenzialmente spaziale, quelli in cui si verificava un arresto a distanza delle colonie (più o meno marcato) e quelli infine di sovraccrescita parziale e/o totale del non patogeno sul patogeno dopo un iniziale blocco.

Una evidente azione antagonistica su tutti e tre i patogeni è stata evidenziata dalle specie *E. nigrum* e *V. lecanii* ed ancor più per *G. roseum* e *T. viride*.

Acremonium sp. non ha mostrato nessuna forma di competizione attiva, anzi, le colonie sono state sovrastate dall'accrescimento delle colonie di *Biscogniauxia mediterranea* e *Coryneum quercinum*.

Le interazioni tra i tre patogeni hanno mostrato sovraccrescita di *Biscogniauxia* su *Coryneum quercinum* e *Pleurophoma cava* e blocco degli accrescimenti per contatto tra le colonie tra *Coryneum quercinum* e *Pleurophoma cava*.

4.2.3. OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE.

Al fine di rilevare se le forme di antagonismo riscontrate nei saggi *in vitro* potevano essere correlate con modificazioni morfologiche del micelio dei funghi coinvolti, sono state condotte osservazioni al microscopio elettronico a scansione (SEM), secondo la metodologia precedentemente esposta.

Si è posta una particolare attenzione alle zone di contatto tra i miceli ed in particolare laddove si evidenziavano, per esempio, fenomeni di barrage. Per le interazioni antagonistiche attive a distanza con le osservazioni si è cercato di verificare eventuali cambiamenti strutturali delle ife del patogeno.

Dei funghi (*Epicoecum nigrum*, *Gliocladium roseum*, *Trichoderma viride*, *Verticillium lecanii*) che avevano mostrato fenomeni di interazione miceliare, quelli che hanno evidenziato al SEM chiare modificazioni strutturali sono stati, *G. roseum*, *Verticillium lecanii* e *Trichoderma viride*.

Sebbene tali modificazioni siano state palesate per tutti e tre i patogeni considerati, qui si riferisce in particolare per *Biscogniauxia mediterranea*, che per la sua importanza nei deperimenti delle querce, è stata oggetto delle osservazioni e delle documentazioni fotografiche più dettagliate.

Il micelio di *Gliocladium roseum*, al contatto con *Biscogniauxia mediterranea*, produce numerosi avvolgimenti e deformazioni su quello del patogeno, con restringimenti del diametro, avvolgimenti a spirale e strozzature più o meno evidenti (Fig. 71).

Trichoderma viride ha prodotto le più evidenti ed intense modificazioni strutturali su *Biscogniauxia mediterranea*, con avvolgimenti a spirale, strozzature, schiacciamenti, perforazioni delle ife (Fig. 72).

Verticillium lecanii sembrerebbe produrre degenerazioni a carico del micelio di *B. mediterranea* nelle ife più prossime (Fig. 73a.) alle proprie ed indurre una produzione

di ingrossamenti miceliari, grosso modo sferici, del diametro di 10 – 15 μm , simili a clamidospore (Fig. 73b).

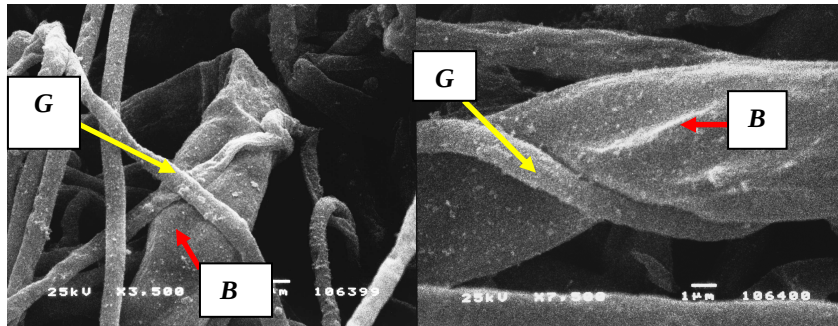


Figura 71.
Avvolgimenti a spirale
di ife di *Gliocladium
roseum* (G) su micelio
di *Biscogniauxia
mediterranea* (B) in
coltura duale.

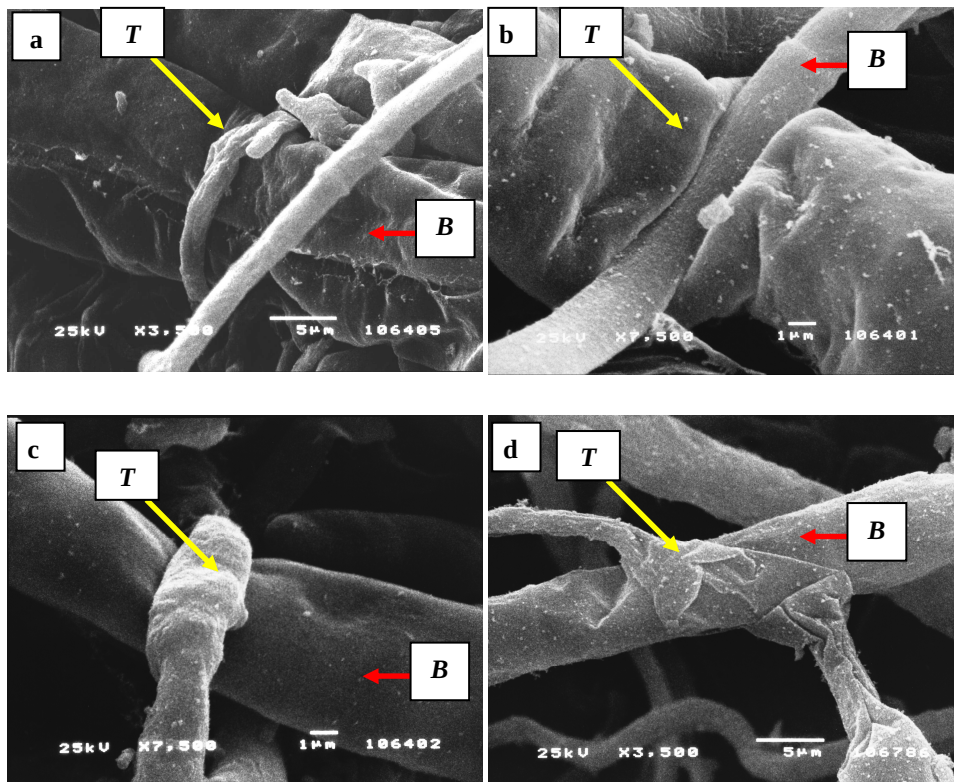


Figura 72. Strozzature (a), schiacciamenti (b e c) e avvolgimenti (d) di ife di *Trichoderma viride* (T) su micelio di *Biscogniauxia mediterranea* (B), in coltura duale.

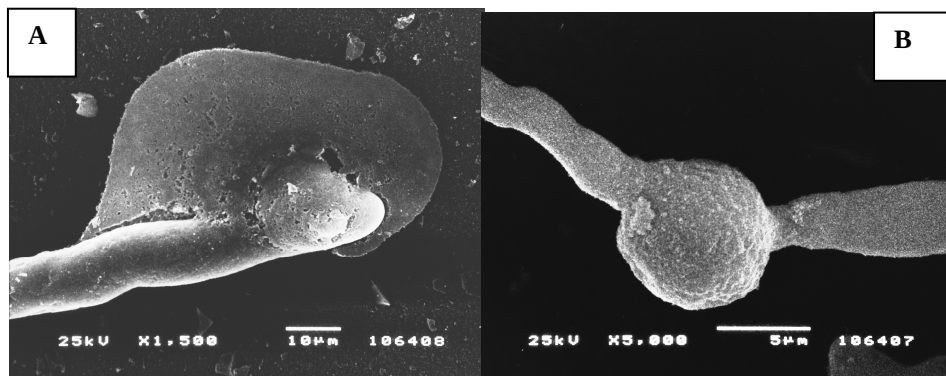


Figura 73. Alterazioni a carico del micelio di *Biscogniauxia mediterranea* indotte da *Verticillium lecanii* in coltura duale. Si noti in (a) un esempio di ifa del patogeno prelevata dalla zona di inibizione con evidenti processi degenerativi ed in (b) un ingrossamento miceliare di un'ifa del patogeno.

5. CONSIDERAZIONI

Le ricerche condotte con questa Tesi di Dottorato, incentrate sul genere *Quercus*, hanno portato a risultati molto interessanti, sia per quanto concerne le indagini in bosco, sulla presenza di endofiti fungini, patogeni e non, in piante asintomatiche, sia per quanto concerne quelle in laboratorio sugli antagonismi tra i vari endofiti.

INCIDENZA ED ASSOCIAZIONI DEGLI ENDOFITI FUNGINI IN BOSCO

In bosco, su piante asintomatiche di *Quercus*, è stata sempre evidenziata una massiccia presenza di endofiti fungini, patogeni e non, con diversificazioni nell'incidenza, nella ricorrenza e nelle associazioni delle specie, fortemente influenzate dagli organi delle piante, dalla specie ospite, dalle situazioni stazionali e dalle condizioni di deperimento o meno del bosco.

Numerosità e ricorrenza degli endofiti fungini, patogeni e non

È apparso innanzi tutto evidente come tutte le piante di *Quercus*, indipendentemente dal loro apparente stato sanitario e dalla loro localizzazione, siano colonizzate piuttosto diffusamente da un rilevante numero di endofiti fungini diversi, sia patogeni che non.

Anche laddove le condizioni vegetazionali del bosco sono buone, infatti, gli organismi fungini endofiticamente presenti nei tessuti sono alquanto numerosi, con una significativa incidenza anche di patogeni, senza però alcuna influenza negativa sullo stato delle piante.

Appare pertanto evidente come gli eventuali potenziali patogeni su piante che si mantengono in buone condizioni, restino circoscritti ai punti di inoculo o nelle immediate vicinanze, senza diffondersi né interagire negativamente con la pianta.

Complessivamente, con i nostri studi, nell'areale considerato (9 stazioni del Lazio e 2 dell'Abruzzo), sono state riscontrate ben 19 specie fungine endofite differenti, di cui 11 patogeni, per lo più (80%) di debolezza ed agenti di necrosi corticali (*Biscogniauxia mediterranea*, *Coryneum quercinum*, *Cytospora* sp., *Fusarium* sp., *Monochaetia* sp., *Phomopsis quercina*, *Pleurophoma cava*) ed 8 a carattere non patogeno (*Acremonium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium* sp., *Trichoderma viride*, *Verticillium lecanii*).

Buona parte degli agenti di necrosi corticali sono gli stessi più volte segnalati come patogeni opportunistici implicati nel deperimento delle querce, soprattutto

nell'ambiente mediterraneo (Ragazzi *et al.*, 2000). Molti degli endofiti non patogeni sono specie note per avere comportamento antagonistico contro patogeni.

Endofiti comuni alle varie situazioni. Sia pur con diversificazioni, anche consistenti, un certo numero di endofiti sono risultati comuni a tutte le specie di *Quercus* e pressoché a tutte le varie condizioni stazionali considerate, dalle zone costiere a quelle montane.

Tra essi due sono patogeni, *Pleurophoma cava* e *Discula quercina*, mentre ben cinque sono non patogeni, e precisamente: *Acremonium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum nigrum*, *Gliocladium roseum*, *Trichoderma viride*.

Tra le specie fungine patogene più diffuse, oltre alle suddette *Pleurophoma cava* e *Discula quercina* (100% delle stazioni), sono da sottolineare, *Biscogniauxia mediterranea* e *Phomopsis quercina* (oltre l'80%), assenti solo a quote maggiori di 1000 metri, nonché *Coryneum quercinum* (oltre il 90%), assente solo nella stazione di Ortolano.

La maggior parte delle specie non patogene risulta presente in tutte le stazioni, ad eccezione di: *Cladosporium cladosporioides* (90% delle stazioni), *Verticillium lecanii* (70%) e *Penicillium* sp. (80%). Con quote comprese tra zero e 1000 metri, il numero di endofiti comuni sale a 11, di cui 5 patogeni.

Influenza degli organi

In linea generale, nell'ambito della stessa specie di *Quercus*, buona parte degli endofiti sono stati riscontrati sia nelle gemme, sia nei rametti di un anno che di tre anni, salvo rare eccezioni, quali ad esempio *Botrytis* sp., completamente assente nelle gemme di piante sane.

Nei boschi sani, tra i patogeni, l'incidenza di *Biscogniauxia mediterranea* aumenta passando dalle gemme ai rametti di un anno, alla corteccia dei rametti di tre anni, mentre *Pleurophoma cava* mostra un andamento inverso; tra i non patogeni, *Acremonium* sp. e *Penicillium* sp. presentano una maggiore presenza nelle gemme rispetto ai rametti di un anno e tre anni, mentre *Aureobasidium pullulans* presenta la maggiore incidenza sui rametti di un anno.

Influenza della specie di *Quercus*

Esistono delle specie endofite tendenzialmente più legate ad alcune specie di *Quercus* rispetto ad altre. Tra i patogeni, ad esempio, *Cylindrocarpon* sp. si riscontra solo su

Quercus ilex, mentre *Tubakia dryina* risulta massicciamente presente soprattutto su *Quercus robur* e totalmente assente sulle querce sempreverdi.

Tra gli endofiti non patogeni, sono risultati particolarmente specifici *Monocillium* sp., riscontrato solo su *Quercus suber*, *Tritirachium* sp. solo su *Quercus ilex* e *Quercus suber* e *Ulocladium* sp. su *Quercus cerris* e *Quercus robur*. Altri endofiti sembrano prediligere alcuni gruppi di specie rispetto ad altre: *Discula quercina*, tra i patogeni, incide molto di più sulle querce caducifoglie rispetto alle sempreverdi.

I dati relativi a *Tubakia dryina* vanno a confermare quanto più volte segnalato nel Nord Italia da Cellerino e Gennaro (2000).

La numerosità e l'incidenza degli endofiti sulle singole specie di *Quercus* non sembrano correlabili con la loro predisposizione al deperimento.

Quercus cerris e *Quercus pubescens*, ad esempio, presentano grossomodo una analoga carica di endofiti patogeni e non patogeni, ma è noto come la prima specie sia nettamente più suscettibile ai fenomeni di deperimento rispetto alla seconda. Inoltre, *Quercus ilex*, notoriamente più resistente ai fenomeni di deperimento, nella stazione di Castel Porziano ha mostrato la più alta incidenza di molti dei più temuti patogeni, ma nel contempo è risultata l'unica a non essere mai andata incontro a problemi di deperimento.

La differente predisposizione ai deperimenti delle singole specie di quercia, pertanto, più che alle associazioni endofitiche sembrerebbe connessa alla relativa tolleranza allo stress idrico, che è il fattore che innesca il fenomeno e probabilmente va a scatenare il passaggio di molti agenti di necrosi corticali dallo stato endofitico, asintomatico, a quello patogenetico.

Influenza della stazione

Le condizioni pedoclimatiche, soprattutto quelle connesse all'altitudine, risultano presentare un peso notevole sulle associazioni di endofiti nelle piante.

Molte specie di endofiti si riducono alle più elevate altitudini e comunque nelle zone di montagna. Tra le specie fungine patogene, ad esempio, spicca l'assenza di *Biscogniauxia mediterranea* e *Phomopsis quercina* a quote maggiori di 1000 metri; tra quelle non patogene, solo l'incidenza di *Acremonium* sp. sembrerebbe leggermente ridursi con la quota, mentre *Verticillium lecanii* è risultato assente sopra i 1000 m. s.l.m. La diffusione territoriale riscontrata per *Biscogniauxia mediterranea* va a confermare quanto constatato in studi precedenti (Anselmi *et al.*, 2001), in cui si

indicava l'assenza di questo patogeno nelle zone meno calde del nostro Paese, ed in particolare nell'Italia settentrionale, a conferma delle note esigenze termiche del patogeno.

Il peso degli endofiti patogeni e non patogeni, visti come gruppi separati, non hanno globalmente manifestato una correlazione con l'altitudine. Per contro, i due gruppi sono risultati significativamente correlati con la presenza o meno di fenomeni di deperimento nel bosco.

Relazioni tra deperimenti ed endofiti fungini

Nell'ambito di una stessa specie quercina, l'incidenza dei vari endofiti fungini, patogeni e non, su piante asintomatiche, è risultata in genere variare, spesso anche notevolmente, passando da un'area "sana" ad una con deperimenti (Fig. 74).

Indagini multistazionali su *Quercus cerris*

Nei boschi con fenomeni di deperimento, sono risultati in genere aumentare diversi agenti di necrosi corticali, notoriamente implicati nel fenomeno, quali, ad esempio, *Biscogniauxia mediterranea* (che passa da 1,77% a ben 27,43% nelle stazioni considerate, peraltro ad altitudini diverse), *Phomopsis quercina* (da 0,49% a 10,32%), *Coryneum quercinum* (da 0,61% a 2,52%). Nei boschi deperienti compaiono peraltro *Diplodia corticola* e *Monochaetia* sp., quasi mai riscontrati nelle varie stazioni con boschi sani. Solo *Pleurophoma cava* è risultata ridursi nei boschi con deperimenti, probabilmente sopraffatta dagli altri patogeni.

Quanto agli endofiti non patogeni, vari di essi sembrerebbero ridurre la propria incidenza passando dalle aree senza deperimenti a quelle con deperimenti ed in particolare *Acremonium* sp. (da 5,41% a 1,60%), *Aureobasidium pullulans* (da 3,14% a 1,32%), *Cladosporium cladosporioides* (da 7,40% a 1,24%) *Gliocladium roseum* (da 1,55% a 1,29%), *Penicillium* sp. (da 6,16% a 1,83%); *Epicoccum nigrum* e *Verticillium lecanii* mostrano un leggero aumento nelle aree con deperimenti rilevanti, rispettivamente da 1,07% a 1,28% e da 0,51% a 0,79%)

Complessivamente, considerando l'insieme degli agenti di necrosi corticali e gli endofiti non patogeni, passando dai boschi senza deperimenti a quelli colpiti dal fenomeno, si nota chiaramente come i primi aumentino da 14,01% ad addirittura 50,65%, mentre i secondi scendono da 27,75 a 11,43%.

Altro dato di un certo interesse consiste nella rilevante riduzione degli isolamenti muti, cioè dei frammenti di tessuto che non hanno generato colonie, che passano da 29,06% nei boschi sani a 4,80% in quelli degradati. Ciò sta probabilmente a dimostrare come gli insediamenti di endofiti nei tessuti delle piante aumentino in boschi con elevata pressione di inoculo.

Quanto ai fattori che condizionano l'incidenza e le associazioni di endofiti, molti di essi sono gli stessi che favoriscono i fenomeni di deperimento.

Le differenze più evidenti tra le aree senza e quelle con deperimenti sono la densità del bosco e la natura del suolo, con più ridotta competizione e terreno tendente al medio impasto, nelle prime e con popolazioni più fitte, generalmente cedui invecchiati a prevalenza di *Quercus cerris*, nelle seconde. Queste ultime hanno probabilmente risentito delle prolungate e ripetute siccità che hanno caratterizzato gli ultimi decenni.

Queste condizioni svantaggiose sono state probabilmente alla base di stress alle piante, con scatenamento degli attacchi dei patogeni di debolezza, compresi gli agenti di necrosi corticali, caratterizzati da una lunga fase asintomatica endofitica.

Confronti tra specie diverse di *Quercus* a Castel Porziano

Quanto sopra si constata anche confrontando piante di specie diverse di *Quercus* nella medesima stazione, ma poste in aree con e senza deperimento. A Castel Porziano, infatti, in tutte le specie ospiti, nelle situazioni con fenomeni di deperimento, l'incidenza degli endofiti patogeni su piante asintomatiche risulta più elevata che in situazioni senza deperimenti, mentre, al contrario, l'insieme degli endofiti non patogeni diminuisce (Tab. 26 e Fig. 75).

In tutte e quattro le specie di *Quercus* interessate da deperimenti, cioè cerro, farnia, roverella e sughera, passando al confronto di parcelle caratterizzate da piante sane con quelle denunciando fenomeni di deperimento è risultato che l'incidenza degli endofiti patogeni è più elevata, in genere a scapito di quelli non patogeni, in particolare su roverella e cerro.

Il patogeno che subisce il maggior incremento è risultato *Biscogniauxia mediterranea*, particolarmente implicato nei fenomeni di deperimento delle querce nell'Italia centro-meridionale.

In conclusione, di grande importanza appare il condizionamento sulla microflora endofitica da parte dello stato sanitario generale delle piante nell'area boschiva considerata. Nei boschi che presentano sintomi di deperimento infatti, l'incidenza

endofitica dei patogeni, ed in particolare degli agenti di necrosi corticali, cresce significativamente rispetto alle aree sane, mentre quella dei non patogeni diminuisce.

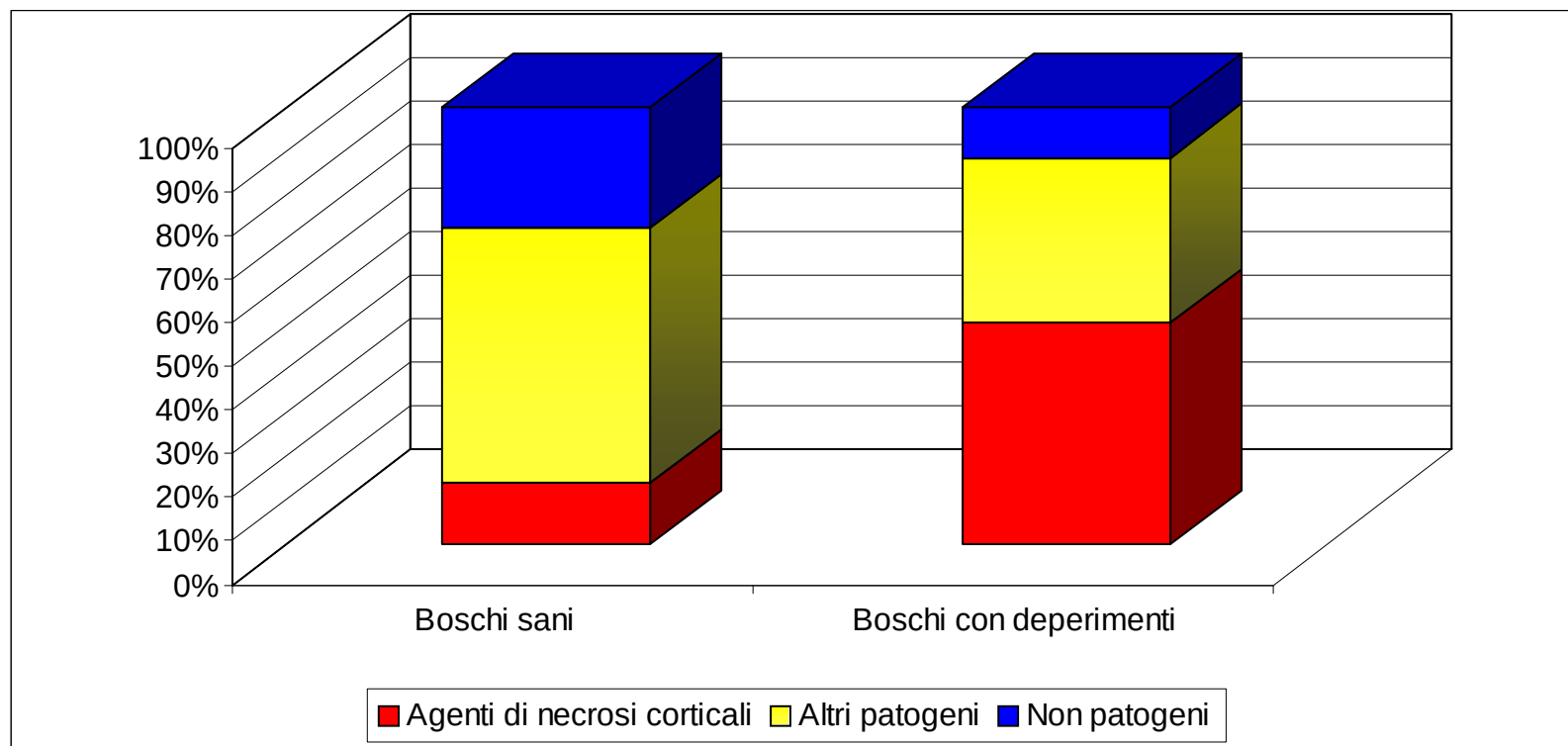


Figura 74. Densità di isolamento media (%) riassuntiva degli endofiti fungini patogeni, con distinzione degli agenti di necrosi corticali, e di quelli non patogeni, relativa a piante asintomatiche delle piante di *Quercus cerris* esaminate nei boschi sani ed in quelli con deperimenti.

Tabella 26. Castel Porziano 2005. Tabella riassuntiva delle densità di isolamento di agenti di necrosi corticali, altri patogeni e non patogeni riscontrati su piante asintomatiche di varie specie di *Quercus*.

ENDOFITI FUNGINI		<i>QUERCUS CERRIS</i>		<i>QUERCUS PUBESCENS</i>		<i>QUERCUS ROBUR</i>		<i>QUERCUS SUBER</i>	
		Area sana	Area deperiente	Area sana	Area deperiente	Area sana	Area deperiente	Area sana	Area deperiente
Patogeni	Agenti di necrosi corticali	27,66	58,38	24,28	44,53	23,85	48,50	31,89	51,08
	Altri	28,37	29,98	36,53	47,63	33,46	34,69	47,62	33,79
Non patogeni		43,97	11,64	39,19	8,14	42,69	16,81	20,49	15,13

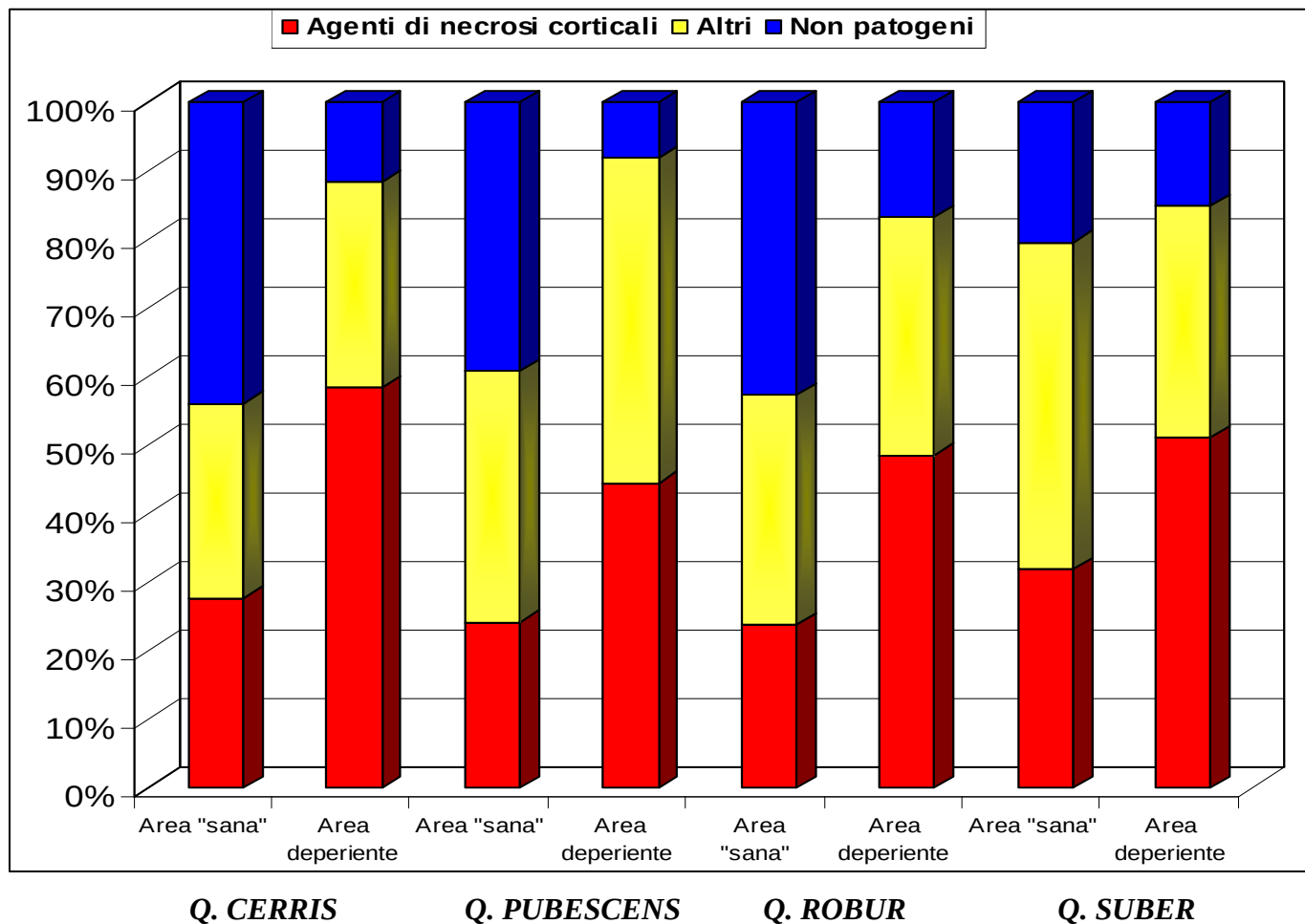


Figura 75. Castel Porziano, 2005. Densità di isolamento media (%) degli endofiti fungini patogeni, con distinzione degli agenti di necrosi corticali, e di quelli non patogeni, relativa a piante asintomatiche delle quattro specie di *Quercus* nella zona senza (sana) e con deperimenti (deper.).

Andamento dell'incidenza di *Biscogniauxia mediterranea* e *Discula quercina*.

Apparentemente, le incidenze di *Biscogniauxia mediterranea* e *Discula quercina* negli ultimi anni sembrano avere avuto un andamento reciprocamente inverso. In realtà *in vitro* non sono emerse forme di palese antagonismo tra i due patogeni.

Ad indurre le diverse fluttuazioni dei due patogeni sono probabilmente state le condizioni climatiche (Figg. 6 e 7). Durante la stagione vegetativa, infatti, le prolungate siccità, mentre favoriscono la predisposizione delle piante a *Biscogniauxia mediterranea*, ostacolano *Discula quercina*, che necessita di acqua liquida per diffondersi. Le piogge, per contro, rendono le piante più reattive al primo patogeno, di debolezza, mentre favoriscono le infezioni di *Discula*. Le prolungate piogge del 2002 e quelle discrete del 2004, 2005 e 2006, pertanto, mentre hanno fatto regredire l'incidenza endofitica di *Biscogniauxia mediterranea*, hanno esaltato quella di *Discula quercina*.

ANTAGONISMO IN VITRO TRA ENDOFITI FUNGINI, PATOGENI E NON

Dalle indagini sull'antagonismo tra i vari endofiti, i risultati sono stati nettamente differenti considerando confronti reciproci tra patogeni e quelli tra non patogeni e patogeni.

Nel primo caso, le prove in coltura duale effettuate combinando tra loro *Discula quercina*, *Biscogniauxia mediterranea*, *Coryneum quercinum* e *Pleurophoma cava*, non hanno evidenziato nessuna forma di inibizione tra le colture messe a confronto.

Per contro, sebbene con risultati che non coinvolgono tutti i confronti, per la maggior parte dei casi gli endofiti non patogeni hanno indotto modificazioni nello sviluppo di tutti e tre od almeno uno dei tre patogeni saggiati, generalmente con fenomeni di antagonismo (Tab. 27).

Di tutti gli endofiti non patogeni analizzati (*Acremonium* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium* sp., *Trichoderma viride*, *Verticillium lecanii*), solo *Acremonium* sp. non ha mostrato inibizione alcuna nei confronti dei tre patogeni *Biscogniauxia mediterranea*, *Coryneum quercinum* e *Pleurophoma cava*.

Aureobasidium pullulans e *Cladosporium cladosporioides*, mentre non hanno mostrato nessun antagonismo verso *Biscogniauxia mediterranea* e *Pleurophoma cava*, hanno contrastato lo sviluppo di *Coryneum quercinum*.

Quando detti endofiti sono stati posti a confronto con quest'ultimo fungo, infatti, si è verificato che sia il loro micelio che quello di *Coryneum quercinum* hanno bloccato il proprio accrescimento.

Nessuna azione è stata invece svolta dai filtrati colturali dei due miceti contro il patogeno.

Sembrerebbe pertanto che tra i due miceti e *Coryneum quercinum* si venga ad instaurare una vera e propria competizione per lo spazio.

Anche *Penicillium* sp. ha mostrato netto antagonismo solo contro *Coryneum quercinum* mentre *Verticillium lecanii* lo ha mostrato sia verso *Biscogniauxia mediterranea* che verso *Coryneum quercinum*.

In coltura duale con *Pleurophoma cava*, *Verticillium lecanii* è sembrato avere addirittura azione di stimolo, incrementandone lo sviluppo delle colonie.

Contro tale patogeno, un'azione di stimolo allo sviluppo è stata mostrata sia da *Verticillium lecanii* che da *Penicillium* sp. quando *Pleurophoma cava* è stata inoculata su substrati contenenti filtrati colturali dei due non patogeni.

Nel confronto *Verticillium lecanii* – *Biscogniauxia mediterranea*, per contro, sembrerebbero manifestarsi alcune modificazioni morfologiche a carico del patogeno.

Gliocladium roseum, mentre non ha mostrato nessuna influenza negativa verso lo sviluppo di *Pleurophoma cava*, ha avuto un'azione fortemente inibitoria nei confronti di *Coryneum quercinum* e *Biscogniauxia mediterranea*, verso la quale ultima, in coltura duale è stato evidenziata addirittura una azione micoparassitica.

Trichoderma viride ha mostrato una buona azione antagonistica verso i tre patogeni saggiati, più marcata nelle prove in coltura duale, evidenziando un comportamento micoparassitico. L'utilizzo dei filtrati colturali del non patogeno ha ostacolato l'accrescimento delle colonie dei patogeni solo alle più alte delle concentrazioni da noi utilizzate.

L'antagonismo dei due endofiti verso i patogeni è stato manifestato anche da parte dei loro estratti colturali, sia pure ad elevate concentrazioni.

Pertanto, degli otto endofiti non patogeni saggiati, quelli che hanno evidenziato una azione antagonistica generalizzata verso i tre patogeni sono stati *Epicoccum nigrum* e *Trichoderma viride*.

Meccanismi dell'antagonismo.

Alcune delle suddette specie, quali ad esempio *Aureobasidium pullulans* e *Cladosporium cladosporioides* verso *Coryneum quercinum* e *Pleurophoma cava*, sembrerebbero presentare azioni di antagonismo basate soprattutto sulla competizione per lo spazio in quanto manifestano un arresto reciproco degli accrescimenti solo a distanze molto ravvicinate delle colonie.

Trichoderma viride e *Gliocladium roseum* mostrano inoltre una vera e propria azione micoparassitica, con l'invasione della colonia del patogeno e la devitalizzazione delle relative ife.

Epicoccum nigrum ed in alcuni casi *Gliocladium roseum*, *Penicillium* sp., *Trichoderma viride* e *Verticillium lecanii*, sembrerebbero produrre invece delle vere e proprie sostanze antagonistiche, attive anche a distanza dalla colonia ed anche quando si utilizzano filtrati colturali.

Tabella 27. Azione inibitoria verso l'accrescimento *in vitro* dei patogeni *Biscogniauxia mediterranea*, *Coryneum quercinum* e *Pleurophoma cava* da parte degli endofiti non patogeni saggiati, verificata attraverso saggi in coltura duale od in substrato addizionato di filtrati colturali. 0 assente; – appena rilevabile; + modesta; ++ discreta; +++ rilevante; () micoparassitismo; [] competizione reciproca; * crescita del patogeno sul non patogeno.

	Presunto antagonista	Tipo di confronto	Azione antagonistica		
			<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	<i>Coryneum quercinum</i>	<i>Pleurophoma cava</i>
NON PATOGENI	<i>Acremonium</i>	Coltura duale	0*	0*	0
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Coltura duale	0*	[+]	0
		Filtrato colturale	0	0	0
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Coltura duale	0*	[-]	0
		Filtrato colturale	0	0	0
	<i>Epicoccum nigrum</i>	Coltura duale	+	++	+
		Filtrato colturale	+	+	-
	<i>Gliocladium roseum</i>	Coltura duale	(++)	(++)	0
		Filtrato colturale	++	++	0
	<i>Penicillium</i> sp.	Coltura duale	0	+	stimolo
		Filtrato colturale	+	+	stimolo
	<i>Trichoderma viride</i>	Coltura duale	(+++)	(+++)	(+++)
		Filtrato colturale	+	+	+
PATOGENI	<i>Verticillium lecanii</i>	Coltura duale	+	+	stimolo
		Filtrato colturale	+	+	stimolo
	(<i>Discula quercina</i>)	Coltura duale	0	0	0
	(<i>Coryneum quercinum</i>)	Coltura duale	0	0	0
	(<i>Pleurophoma cava</i>)	Coltura duale	0	0	0

6. CONCLUSIONI

Le ricerche condotte con questa tesi hanno risposto agli obiettivi prefissati, con risultati di notevole interesse scientifico e tecnico.

È stato dimostrato come nei vari organi delle piante arboree sane, senza sintomi di malattia, risultino insediate numerose specie fungine, sia patogene che non patogene. La gran parte di queste ultime sono agenti di necrosi corticali, prevalentemente a carattere opportunistico, cosiddetti patogeni da debolezza.

L'incidenza dei singoli endofiti e le loro associazioni sono risultate condizionate dall'organo, ma soprattutto dalla specie di *Quercus* ospite, dall'altitudine, dallo stato di deperimento o meno del bosco.

Con i fenomeni di deperimento sembrerebbero aumentare gli endofiti patogeni, mentre sembrano ridursi quelli non patogeni.

Non è stata evidenziata nessuna forma di antagonismo reciproco tra i patogeni.

Le eventuali fluttuazioni nel tempo, apparentemente tra loro inverse, mostrate dai due patogeni *Biscogniauxia mediterranea* e *Discula quercina*, sono pertanto semplicemente correlabili all'andamento delle condizioni climatiche.

Vari degli endofiti non patogeni mostrano invece chiari fenomeni di antagonismo verso i patogeni, sia come competizione per lo spazio (es. *Aureobasidium pullulans* e *Cladosporium cladosporioides*), sia con l'azione di sostanze antagonistiche probabilmente volatili (*Epicoccum nigrum*, *Gliocladium roseum* e *Trichoderma viride*) che con fenomeni di micoparassitismo (*Gliocladium roseum* e *Trichoderma viride*).

Dal punto di vista biologico, le nostre indagini hanno confermato il ruolo del fenomeno "endofitismo" nella strategia di sopravvivenza di molti parassiti di debolezza della chioma. Essi sopravvivono innocui nei tessuti sani delle piante ospiti in attesa che le stesse (o loro parti: es. rami senescenti) entrino in forte stress, per virare verso l'habitus patogenetico, colonizzare i tessuti, produrre fruttificazioni e rinnovare le infezioni su piante in buono stato, senza conseguenze fitopatologiche. Al verificarsi di fattori di stress, questo stato di innocuità può essere rotto con il viraggio verso lo status patogenetico.

In questo viraggio è probabile che un ruolo molto importante venga svolto dagli endofiti non patogeni, attraverso fenomeni di antagonismo.

Questi eventuali antagonismi da un lato potrebbero meglio spiegare l'innescarsi dei fenomeni di deperimento nelle piante forestali, dall'altro potrebbero suggerire la messa in atto di forme di lotta preventiva e curativa nei confronti del deperimento.

Alcune tecniche selvicolturali, ad esempio, andando a favorire taluni endofiti rispetto ad altri, potrebbero essere prese come modello contro il fenomeno oppure potrebbe convenire evitarli per non favorire lo stesso.

Necessita tuttavia approfondire le conoscenze dell'argomento, in particolare sulle forme di antagonismo, sui relativi fattori condizionanti e chiarire se, quando ed in che misura esse vengano messe in atto sulla pianta.

Si auspica pertanto che gli studi possano continuare e che venga fatta luce su questi aspetti, la cui comprensione potrebbe aiutarci a combattere certune malattie, soprattutto quelle a carattere complesso, non soltanto delle piante forestali, ma in tutte le piante arboree, comprese quelle fruttifere.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

- Agosteo G. E. e Granata G., 1993. Fungi associated with declined oaks in Sicily and Calabria. In: Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992. Ed. by Luisi N., Lerario P. e Vannini A. pp. 71-75.
- Ahmad S., Govindarajan S., Funk C. R. e Johnson-Cicalese J. M., 1985. Fatality of house crickets on perennial ryegrasses infected with a fungal endophytes. Entomol. Exp. Appl. 39: 183-190.
- Anselmi N., 1990. Agenti di marciumi radicali e di carie connessi al deperimento delle querce. Atti Convegno "Aspetti fitopatologici delle querce". Firenze, 19-20 Novembre. pp. 392-408.
- Anselmi N., Capretti P., Cellerino G.P., Franceschini A., Granata G., Luisi N., Marras F., Mazzaglia A., Mutto Accordi S., Ragazzi A., Vannini A., 2002. Studi sull'endofitismo di patogeni fungini di debolezza implicati nel deperimento delle querce in Italia. Atti del Convegno "L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive". A. Franceschini e F. Marras (Ed.), Sassari-Tempio Pausania, 19-21 maggio: 43-59.
- Anselmi N., Invernizzi C., 1992. *Ophiostomatales* as sap stain agents in wood of declining forest trees. Petria. 2: 119-128.
- Anselmi N., Mazzaglia A., 2005. Relation entre la présence de champignons pathogènes endophytes et le dépérissement des chênes vert (*Quercus ilex*) après incendie. IOBC/wprs Bulletin; 28, 8, 93 – 101.
- Anselmi N., Vannini A., Mazzaglia A., Librandi I., 2001. L'endofitismo nei funghi patogeni forestali: l'esempio *Biscogniauxia mediterranea*. In: Atti del XIV Convegno Nazionale di Micologia Selva di Fasano 22-27 Ottobre, 28.
- Arx J. A. von, 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture. 3rd ed. J. Cramer, Vaduz, Liechtenstein, 211 pp.
- Autori vari, 1990. Oak decline and the status of *Ophiostoma* spp. on oak in Europe. EPPO Bulletin. 20: 405-422.
- Badalyan S.M., Innocenti G., Garibyan N.G., 2002. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. Phytopathologia Mediterranea 41 (3): 220-225.
- Badalyan S.M., Innocenti G., Garibyan N.G., 2004. Interactions between xylotrophic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments. Phytopathologia Mediterranea 43: 44-48.
- Barker, G. M., Pottinger, P. J. e Prestige, R. A., 1984. Effects of *Lolium* endophyte fungus infection on behaviour of adult Argentine stem weevil. New Zeland J. Agric. Res. 27: 271-277.
- Barklund P., Rowe J., 1983. Endophytic fungi in Norway spruce - possible use in bioindication of vitality. Aquilo Series Botanicae, 19: 228-232.
- Barnett H. L., Hunter B. B., 1972 - *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Third edition. Burgess Publishing Co, 508 pp.
- Boddy L., 1993. Saprotrophic cord-forming fungi: warfare strategies and other ecological aspects. Mycol. Res. 97, 641 – 655.
- Boddy L., 1999. Saprotrophic cord-forming fungi: meeting the challenge of heterogeneous environments. Mycologia 91, 13 – 32.
- Boddy L., 2000. Interspecific combative interactions between wood – decaying basidiomycetes. FEMS Microbiology Ecology 31, 185 – 194.

- Boddy L., Griffith G. S., 1989. Role of endophytes and latent invasion in the development of decay communities in sapwood of angiospermous trees. *Sydowia*. 41: 41 - 73.
- Boddy L., Rayner A.D.M., 1983. Mycelial interactions, morphogenesis and ecology of *Phlebia rufa* from oak. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 80, 437 – 448.
- Brasier C. M., Moreira A. C., Ferraz J. F. P., Kirk S., 1993. High mortality of Cork oak in Portugal associated with *Phytophthora cinnamomi*. In: Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992. Ed. by Luisi N., Lerario P. e Vannini A. 461-463.
- Bussotti F., Grossoni P., 1996. Le condizioni dei boschi in Italia: prospettive per il monitoraggio e la ricerca. *L'Italia forestale e montana*. 51: 316-332.
- Carmichael J. W., Kendrick W. B., Conner I. L., Sigler L., 1980. Genera of *Hyphomycetes*. The University of Alberta Press, Alberta, Canada, 386 pp.
- Carroll F.E., Müller E., Sutton B.C., 1977. Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers. *Sydowia*. 29: 87-103.
- Carroll G.C., Carroll F.E., 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Botany*. 56: 3034-3043.
- Cellerino G.P., Anselmi N., Esposito, L., 1990. Deperimento delle querce in Campania: problematiche, agenti fungini connessi, tentativi di interventi selvicolturali. Atti Convegno "Aspetti fitopatologici delle querce", Firenze, 19-20 Novembre. pp. 63-77.
- Cellerino G. P., Anselmi N., Esposito L., 1993. Survey on selvicultural treatment against decline of oak trees. In: Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992. Ed. by Luisi N., Lerario P. e Vannini A. pp. 229-236.
- Cellerino G.P., Gennaro M., 2000. Drought as predisposing factor in oak decline. In: Ragazzi *et al.*, 2000, pp. 159-175.
- Cheplick G. P., Clay K., 1988. Acquired chemical defences in grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos*. 52: 309-318.
- Chet I., Inbar J., Hader Y., 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In: The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationship (Wicklow D.T. and Söderström B., eds.), 165 – 184. Springer, Berlin.
- Christensen M. J., Latch M. C., 1991. Variation among isolates of *Acremonium* endophytes (*A. coenophialum* and possibly *A. typhinum*) from tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Mycol. Res.* 95: 1123-1126.
- Clay K., 1987. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *Oecologia*. 73: 358-362.
- Clay K., 1988. Fungal endophyte of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*. 69: 10-16.
- Clay K., 1989. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. *Mycological Research*. 92: 1-2.
- Claydon H.J.F., Pole M., 1985. Elm bark beetle boring and feeding deterrents of *Phomopsis oblonga*. *Phytochemistry*. 24: 937-943.
- Collado J., Platas G., Gonzáles I., Peláez F., 1999. Geographical and seasonal influences on distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New phytol.* 144: 525-532.
- Collado J., Platas G., Peláez F., 1996. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from central Spain. *Nova Hedwiga*, 63 : 3-4, 347-360.

- Cooke R. C., Rayner A. D. M., 1984. The Ecology of saprotrophic Fungi. Longman, London.
- Cubit J. D., 1974. Interactions of seasonally changing physical factors and grazing affecting high intertidal communities on a rocky shore. Ph.D. Dissertation, University of Oregon, Eugene.
- De Bary H.A., 1866. Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten (Morphology and Physiology of Fungi, Lichens, and Myxomycetes). The Clarendon Press, Oxford. 522p. 1887.
- Dreyer E., Aussenac G., eds., 1996. Ecology and physiology of oaks in a changing environment. Ann. Sci. For., Special Issue. 53: 161-800.
- Eichorn, J., Ferretti, M., Innes, J. L., Roskams, P. E Vel, E. (Eds.), 1996. Visual assessment of Tree Condition on Plots of the Intensive Monitoring, Draft sub-manual prepared for the 1996 meeting of Task Force of the ICP-Forests. Unpublished.
- Eichorn J., Szepesi A., Ferretti M., Durrant D., Roskams P., 2004. Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. Part II "Visual assessment of crown condition". United Nations Economic Commission for Europe Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution. International Co-Operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests. pp.77.
- Ellis M.B., Ellis J.P., 1985. Microfungi on land plants, an identification handbook. Expanded reprint Richmond Publ. Co., 1997. Croom Helm., London, UK, 350 pp.
- Fagioli R., 1998. "Studio sull'endofitismo di *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Mill., in tessuti sani di *Q. cerris* L.". Tesi di laurea. Dipartimento di Protezione delle Piante – Sezione di Patologia Vegetale - Università degli Studi della Tuscia di Viterbo.
- Fisher P.J., Petrini O., Petrini L.E., Sutton B. C., 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Q. ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. New Phytol. (1994), 127: 133-137.
- Fisher P.J., Petrini O., Sutton B. C., 1993. A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Eucalyptus nitens* in Australia and England. Sydowia 45: 338 - 445.
- Frisullo S., Mannerucci F., Luisi N., 1989. Funghi cromogeni associati al deperimento delle querce. Mic. Ital. 3: 77-86.
- Fröhlich J., Hyde K. D., Petrini, O., 2000. Endophytic fungi associated with palms. Mycol. Res. 104 (10): 1202-1212 (October 2000).
- Funk C. R., Halisky P. M., Johnson M. C., Siegel M. R., Stewart A. V., Ahmad S., Hurley R. H., Harvey I. C., 1983. An endophytic fungus and resistance to sod webworms: association in *Lolium perenne* L. BioTechnology. 1: 189-191.
- Gellini R., 1989. Inquinamento e condizioni di efficienza del bosco. Economia montana, Linea Ecologica, 6: 11 – 22.
- Gennaro M., 1993. Indagini sulle ruggini del pioppo da *Melampsora larici-populina* Kleb. in Italia. Tesi di Laurea, DI.VA.P.RA. – Sezione di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Torino.
- Giordano E., 1993. Silvicultural practices in oak woods for their conservation. In: Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992. Ed. by Luisi N., Lerario P. e Vannini A. pp. 323-328.
- Graf P., Basri E. e Bakri M., 1993. Cork oak decline in Morocco. In: Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceed. International Congress, Selva di

- Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992. Ed. by Luisi N., Lerario P. e Vannini A., p. 475.
- Graniti A., 2002. L'endofitismo nei funghi: un adattamento ecologico o un modo di vita? In: Atti del Convegno "L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive", Sassari, 19-21 Maggio, 11-22.
- Griffith G.S., Rayner A.D.M., Wildman H.G., 1994/a. Interspecific interactions and mycelial morphogenesis of *Hypholoma fasciculare* (Agaricaceae). Nova Hedwig. 59, 47 – 75.
- Griffith G.S., Rayner A.D.M., Wildman H.G., 1994/b. Interspecific interactions, mycelial morphogenesis and extracellular metabolite production in *Phlebia radiata* (Aphylllophorales). Nova Hedwig. 59, 331 – 344.
- Griffith G.S., Rayner A.D.M., Wildman H.G., 1994/c. Extracellular metabolite and mycelial morphogenesis of *Hypholoma fasciculare* and *Phlebia radiata* (Hymenomycetes). Nova Hedwig. 59, 311 – 329.
- Griffith G.S., Rayner A.D.M., Wildman H.G., 1994/d. Induction of metabolic and morphogenetic changes during mycelial interactions among species of higher fungi. Biochem. Soc. Trans. 22, 389 – 394.
- Guilden G., Hoiland K., 1985. The role of ectomycorrhiza in a situation of air pollution and forest death. Agarica, 6 (12): 341-347.
- Halmschlager E., 1993. Endophytic fungi and oak decline. In: Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992. Ed. by Luisi N., Lerario P. Vannini A. pp. 77-83.
- Hardy T.N., Clay K., Hammondjr A.M., 1985. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a laboratory bioassay and larval preferens study for the fungal endophyte of perennial ryegrass. J. Econ. Entomol. 78: 571-575.
- Helander M.L., Ranta H., Neuvonen S., 1993. Responses of phyllosphere microfungi to simulated nitric and sulphuric acid deposition. Mycol. Res. 97: 533-537.
- Heliövaara K., Väisänen R., Uotila A., 1989. Hysterothecia production of *Lophodermium* species (Ascomycetes) in relation to industrial air pollution. Karstenia. 29: 29-36.
- IFNI, 1985. Inventario Forestale Nazionale, 1985 "Sintesi metodologica e risultati". Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste, Direzione Generale per l'Economia Montana e per le Foreste, Corpo Forestale dello Stato. Istituto Sperimentale per l'Assestamento forestale e per l'Alpicoltura, 461 pp.
- Ippolito A., Nigro F., 1999. Applicazione di agenti di lotta biologica nella lotta contro marciumi di ortofrutticoli freschi in postraccolta. Progetto P.O.M. "Innovazioni nella difesa delle malattie di piante agrarie e forestali con mezzi di lotta biologica ed integrata". Catania, 16 dicembre 1999, 143-162.
- Jakucs P., 1985. Ecology of an Oak Forest in Hungary. Budapest: Akadémiai Kiado.
- Jeffries P., 1997. Mycoparasitism. In: The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationship (Wicklow D.T. and Söderström B., eds.), 149 – 164. Springer, Berlin.
- Jhonson J. A., Whitney N. J., 1989. A study of fungal endophytes of needles of balsam fir (*Abies balsamea*) and red spruce (*Picea rubens*) in new Brunswick, Canada, using culture and electron microscope techniques. Canadian Journal of Botany, 67: 3513-3516.
- Keddy P., 1989. Competition. Chapman and Hall, New York.
- Kowalsky T., Kehr R. D., 1997. Fungal endophytes of living branch bases in several European tree species. Pages 67-86 in "Endophytic Fungi in Grasses and Woody

- Plants – Systematic, Ecology and Evolution." Edited by Scott C. Redlin and Lori M. Carris. APS PRESS - The American Phytopathological Society, St.Paul, Minnesota.
- Lanier L., Joly P., Bondoux P., Bellemère A., 1976 - *Mycologie et Pathologie forestière*. Tome I Mycologie forestière. Masson éditeur 1976, 504 pp.
- Legault D., Dessureault M., Laflamme G., 1989. Mycoflore des aiguilles de *Pinus banksiana* et *Pinus resinosa*. I. Champignons endophytes. Can. J. Bot. 67: 2052-2060.
- Librandi I., 2001. "Variabilità genetica tra popolazioni di *Biscogniauxia mediterranea* in fase patogenetica ed endofitica su *Quercus cerris*". Tesi di laurea. Dipartimento di Protezione delle Piante – Sezione di Patologia Vegetale - Università degli Studi della Tuscia di Viterbo.
- Lockwood J.L., 1992. Exploitation competition. In: The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem (Carroll G.C. and Wicklow D.T., eds.), p. 243 – 263. Marcel Dekker, New York.
- Luisi N., Lerario O., 2000. Silvicultural practices for oak decline control. In: Decline of oak species in Italy-problems and perspectives. Ed. by Ragazzi, A. e Dellavalle, I. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze 2000 pp 157-175).
- Luisi N., Lerario P., Vannini A., eds., 1993. Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992. 541 pp.
- Luisi N., Manicone R., 1990. Aspetti epidemiologici di micromiceti associati al deperimento di querceti nell'Italia meridionale. In Proc. Aspetti fitopatologici delle Querce, Firenze, pp. 110-121.
- Magan N., McLeod A. R., 1991. Effect of atmospheric pollutant on phyllosphere microbial communities. Pages 379-400 in: "Microbial Ecology of Leaves." J. H. Anrews and Hirano, eds. Springer-Verlag, New York.
- Magurran A.E., 1988. Ecological diversity and its measurements. Croom Helm, London, 179 pp.
- Manicone R. P., Sicoli G., Luisi N., 1993. Decline control in a mixed oak wood by various thinning grades. In: Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992. Ed. by Luisi N., Lerario P. e Vannini A. pp. 345-355.
- Manion P.D., 1991. Tree disease concepts. Englewood Cliffs: Prentice Hall.
- Mazzaglia A., Librandi I., Anselmi N., 2004. Endofiti fungini in querce caducifoglie nel centro Italia. Micologia Italiana: 33, N° 2, Agosto 2004. 13 – 22.
- Mészáros J., 1991. Comparative study of healthy and declining sessile oak trees. GSF-Bericht Neuherberg b. München 24: 511-517.
- Miller I., Shriner D.S, Rizzo D., 1989. History of Hardwood Decline the Eastern United States. USDA For. Ser.Gen.Tech. Rep . NE- 126.
- Oak S.W., Tainter F.H, 1988. How to identify and control littleleaf disease.USDA For. Serv. Prot. Rep. R8-PR12. 14 pp.
- Paoletti E., ed., 1998. Stress factor and air pollution. Chemosphere, Special Issues. 36: 625-1166.
- Paoletti E., 2006. Impact of ozone on Mediterranean forests: a review. Environmental Pollution 144:463–474.
- Peng G., Sutton C.J., Kevan P.G., 1992. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. Can. Jour. Plant Pathol., 14: 117-129.

- Petrini O., 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. Pp. 175-187. In "Microbiology of the phyllosphere" Eds., N.J. Fokkema and J. van den Heuvel. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Petrini O., 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial Ecology of Leaves (ed. Andrews J. H. e Hirano S. S.). Springer Verlag: New York. pp. 179-197.
- Petrini O., Carroll G., 1981. Endophytic fungi in foliage of some *Cupressaceae* in Oregon. Can. J. Bot. 59: 629-636.
- Petrini O., Fisher P.J., 1988. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stems of *Pinus sylvestris* and *F. sylvatica*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 91: 233-238.
- Petrini O., Fisher P.J., 1990. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. Mycol. Res. 94: 1077-1080.
- Prestidge R. A., Gallagher R. T., 1988. Endophyte fungus conifers resistance to regrass: Argentine stem weevil studies. Ecol. Entomol. 13: 429-435.
- Ragazzi A., 1990. Stato attuale delle conoscenze sulle malattie della quercia in Italia. Atti Convegno "Aspetti fitopatologici delle querce", Firenze, 19-20 Novembre. pp. 37-46.
- Ragazzi A., 1993. The role of microorganism, virus and MLO in oak-decline: present knowledge in Europe and future prospect. In: Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992. Ed. by Luisi N., Lerario P. e Vannini A. pp. 11-21.
- Ragazzi A., Della Valle Fedi I., Mesturino L., 1989. The oak decline: a new problem in Italy. Eur. J. For. Path. 19: 105-110.
- Ragazzi A., Dellavalle I., Moricca S., Capretti P., Raddi P., 2000. Decline of oak species in Italy: problems and prospective. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze, Italy, pp. 257.
- Ragazzi A., Moricca S., Della Valle I., 2004. Endophytism in forest trees. Accademia Italiana di Scienze Forestali. Pp. 239.
- Rayner A.D.M., Boddy L., 1988. Decomposition of Wood: its Biology and Ecology. John Wiley, Chichester.
- Rayner A.D.M., Griffith G.S., Ainsworth A.M., 1995. Mycelial interconnectedness. In: The Growing Fungus (Gow, N.A.R. and Gadd G.M., eds.), 20 – 40. Chapman and Hall, London.
- Rayner A.D.M., Webber J.F., 1984. Interspecific mycelial interactions – an overview. In: The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium (Jennings D.H. and Rayner A.D.M., eds.), p. 383 – 417. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ravaioli F., Rocco E., Nasini M., Mazzaglia A., Anselmi N., 2006. Associazioni in *Quercus ilex* di endofiti fungini, patogeni e non, in relazione ai danni da fuoco subiti dalle piante. In Atti del XVI Convegno Unione Micologica Italiana, Firenze 4 – 6 dicembre, 47.
- Riesen T. K., Close R. C., 1987. Endophytic fungi in propiconazole - treated and untreated barley leaves. Mycologia, 79: 546 - 552.
- Rispoli M., Nicoletti R., 1999. Antagonisti fungini di *Rhizoctonia solani*. II. *Gliocladium virens*. Il Tabacco, 7(2): 1-7.
- Rodolfi M., Brandolini M.A., Lorenzi E., Rodino D., Picco A.M., 2004. *Bipolaris* spp. su seme di varietà italiane di *Oryza sativa* L. Micologia Italiana: 33, N° 2, Agosto 2004. 28 – 34.
- Rodrigues K., 1994. The foliar fungal endophyte of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. Mycologia. 86: 376-385.

- Rollinger J. L., Langenheim J. H., 1993. Geographic survey of fungal endophyte community composition in leaves of coastal redwood. *Mycologia*. 85:149-156.
- Ross, E. W., 1966. - Ash dieback etiological and developmental studies. N. Y. State Univ. Coli. For. Syracuse Tech. Pubi, 88. 80.
- Schulz B., Römmert A.K., Dammann U., Aust H.J., Strack D., 1999. The endophyte – host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research*, 103: 1275-1283.
- Schütt P., Cowling E. B., 1985. Waldesterben, a general decline of forest in Central Europe: symptoms, development and possible causes. *Plant Disease*, 69: 548 – 558.
- Sieber T., 1988. Endophytische Pilze in Nadeln von gesunden und geschädigten Fichten (*Picea abies* (L.) Karsten). *Eur. J. For. Pathol.* 18: 321-342.
- Sieber T.N., 1989. Endophytic fungi in twigs of healthy and diseased Norway spruce and white fir. *Mycological Research*, 92: 322-326.
- Sieber T., Canavesi F. e Dorworth C. E., 1991. Endophytic fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. *Can. J. Bot.* 69: 407-411.
- Siegel M. R., Johnson M. C., Varney P. R., Nesmith N. C., Buckner R. C., Bush L. P., Burrus I. P. B., Jones T. A. e Boling J. A., 1984. A fungal endophyte in tall fescue: incidence and dissemination. *Phytopathology* 74: 932-937.
- Siegel M.R., Schardl C.L., 1991. Fungal endophytes of grass: detrimental and beneficial association. In :Andrews J.H., Hirano S.S (eds), *Microbial ecology of leaves* .Springer, New York: 197-221.
- Sinclair, W.A., 1965. Comparisons of recent declines of white ash, oak, and sugar maple in northeaster woodlands. *Cornell Plant*. 20:62-67.
- Sonnenbichler J., Jurgen D., Peipp H., 1994. Secondary fungal metabolites and their biological activities, V. Investigations concerning the induction of the biosynthesis of toxic secondary metabolites in basidiomycetes. *Biol. Chem. Hoppe – Seyler* 375, 71 – 79.
- Sousa Santos M. N. D., Moura Martins A. M., 1993. Cork oak decline. Notes regarding damage and incidence of *Hypoxylon mediterraneum*. In: *Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992*. Ed. by Luisi N., Lerario P. e Vannini A. pp. 115-121.
- Spaulding P., Macaloney, H. J., 1931. A study of organic factors concerned in the decadence of birch on cut-over lands in northern New England. *J. For*, 29: 1134-1149.
- Suske J., Acker G., 1990. Host-endophyte interaction between *Lophodermium piceae* and *Picea abies*: cultural, ultrastructural and immunocytochemical studies. *Sydowia*. 42: 211-217.
- Stone J.K., Bacon C.W., White J.W.Jr., 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon C.W., White J.W.Jr. (eds.), *Microbial endophytes*. M. Dekker, Inc., New York: 3-29.
- Valentini R., Scarascia Mugnozza G., Giordano E., Vannini A., 1993. Water relations of mediterranean oaks: possible influences on their dieback. In: *Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992*. Ed. by Luisi N., Lerario P. e Vannini A. pp. 439-446.
- Vannini A., 1987. Osservazioni preliminari sul deperimento del cerro (*Q. cerris* L.) nell'alto Lazio. *Informatore fitopatologico*, 37: 39-41
- Vannini A., Valentini R., 1994. Influence of water relations in *Q. cerris* - *Hypoxylon mediterraneum* interaction: a model of drought-induced susceptibility to a weakness parassite. *Tree Physiology*. 14: 129-139.

- Vannini A., Biocca M., Paparatti B., 1996. Contributo alla conoscenza del ciclo biologico di *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Mill. su *Quercus cerris* L. *Informatore fitopatologico*. 9: 53-55.
- Vannini A., Luisi N., Manicone R. P., Sicoli G., 1993a. Preliminary studies on predisposition to decline of some mediterranean oaks in relation to drought resistance. In: *Recent Advances in Studies on Oak Decline*. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992. Ed. by Luisi N., Lerario P. e Vannini A. pp. 205-211.
- Vannini A., Valentini R., Santurbano M., Tirone G., 1993b. Possible relationship among embolism, water potential, and susceptibility to *Hypoxylon mediterraneum* of some mediterranean oaks. In: *Recent Advances in Studies on Oak Decline*. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992. Ed. by Luisi N., Lerario P. e Vannini A. pp. 449-455.
- Westing A.H., 1966. - Sugar maple decline: an evaluation. *Econ. Bot.* 20:196-212.
- White N.A., Boddy L., 1992. Extracellular enzyme localisation during interspecific interactions. *FEMS Microbiol. Lett.* 98, 75 – 80.
- White J.F., Cole G.T., 1985. Endophyte-host associations in forage grasses. In vitro inhibition of fungi by *Acremonium coenophialum*. *Mycologia*. 77: 487-489.
- Wicklow D.T., 1992. Interference competition. In: *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem* (Carroll G.C. and Wicklow D.T., eds.), p. 265 – 274. Marcel Dekker, New York.
- Williams Woodward J., 2001 - *Simplified fungi identification key*. Cooperative Extension service. College of Agricultural & Environmental Sciences, University of Georgia, Special Bulletin 37, 11 pp.
- Wilson D., Carroll G. C., 1994. An endophyte of Oregon white oak: infection studies of *Discula quercina*. *Mycologia*. 86: 635-647.

ALLEGATO 1.

Caratteristiche delle stazioni ed andamento climatico

Stazione di Sabaudia (LT)

Località: Cerasella (Parco Nazionale del Circeo); **orografia:** pianeggiante; **quota:** 17 m. s.l.m.; **zona fitoclimatica:** transizione tra macchia mediterranea e *Lauretum caldo*; **terreno:** profondo; **fitocenosi:** Cerro (*Quercus cerris* L.) e Farnia (*Quercus robur*), sottobosco: *Sorbus domestica* (sorbo domestico), *S. torminalis* (ciavardello), arricchite da elementi di macchia mediterranea.

Stazione di Castro dei Volsci (FR)

Località: Selvapiana (Parco regionale dei Monti Aurunci); **orografia:** pendenza media; **esposizione:** Sud – Ovest; **quota:** 96 m. s.l.m.; **zona fitoclimatica:** *Lauretum*, anche se si rinvencono specie arboree della fascia del *Castanetum*; **terreno:** matrice geologica argillosa; **fitocenosi:** (*Citiso – Quercetum pubescentis*) a prevalenza di Cerro (*Quercus cerris* L.), sottobosco: *Arbutus unedo* L. (corbezzolo), il *Crataegus monogyna* L. (biancospino), *Phyllirea latifolia* L. (fillirea), *Juniperus communis* L. (ginepro comune), *Ligustrum vulgare* L. (ligustro), *Viburnum tinus* L. (tino) e *Ruscus aculeatus* L. (pungitopo).

Stazione di Cori (LT)

Località: Pantanello (Comunità Montana dei Monti Lepini); **orografia:** pendenza media; **esposizione:** Sud; **quota:** 380 m. s.l.m.; **zona fitoclimatica:** *Lauretum*; **terreno:** prevalentemente argilloso; **fitocenosi:** Roverella (*Quercus pubescens* Wild.) e Cerro (*Quercus cerris* L.).

Stazione di Monte Flavio (RM)

Località: Serrericci (Parco Regionale dei Monti Lucretili); **orografia:** pendenza media; **esposizione:** Nord; **quota:** 880 m. s.l.m.; **zona fitoclimatica:** *Castanetum freddo*; **terreno:** profondo. **Fitocenosi:** cerro (*Quercus cerris* L.).

Stazione di San Gregorio da Sassola (RM)

Località: S. Gregorio (Area protetta non ancora istituita); **orografia:** pendenza media; **esposizione:** Sud – Ovest; **quota:** 942 m. s.l.m.; **zona fitoclimatica:** *Castanetum freddo – Fagetum*; **terreno:** scheletro affiorante e preponderante matrice argillosa; **fitocenosi:** Faggio (*Fagus sylvatica* L.) e cerro (*Quercus cerris* L.).

Stazione di Greccio (RI)

Località: La Scritta (Monti Sabini); **orografia:** pendenza alta; **esposizione:** Sud – Ovest; **quota:** 1000 m. s.l.m.; **zona fitoclimatica:** *Fagetum*; **terreno:** a matrice argillosa; **fitocenosi:** cerro (*Quercus cerris* L.), sottobosco dominato da *Juniperus communis* L. a quote elevate e varie latifoglie (es. l'Acero d'Ungheria) a quote inferiori.

Stazione di Ortolano (AQ)

Località: Ortolano (Parco del Gran Sasso); **orografia:** pendenza media; **esposizione:** Nord – Est; **quota:** 1050 m. s.l.m.; **zona fitoclimatica:** *Fagetum*; **terreno:** scheletro affiorante su matrice argillosa; **fitocenosi:** faggio (*Fagus sylvatica* L.) prevalente e cerro (*Quercus cerris* L.).

Stazione di Passo delle Capannelle (AQ)

Località: Passo delle Capannelle (Parco del Gran Sasso); **orografia:** pianeggiante; **quota:** 1300 m. s.l.m.; **zona fitoclimatica:** *Fagetum freddo*; **terreno:** scheletro affiorante; **fitocenosi:** faggio (*Fagus sylvatica* L.) prevalente e cerro sporadico (*Quercus cerris* L.).

Stazione di Castel Porziano (RM)

Località: Castel Porziano (Tenuta del Presidente della Repubblica); **orografia:** pianeggiante; **quota:** 5 m. s.l.m.; **zona fitoclimatica:** *Lauretum* caldo; **terreno:** profondo; **fitocenosi:** Cerro (*Quercus cerris* L.), Farnia (*Q. robur* L.), Leccio (*Q. ilex* L., Roverella (*Quercus pubescens* Wild.).

Stazione di Tre Croci (VT)

Località: Tre Croci (Comune di Vetralla – VT); **orografia:** pendenza media; **esposizione:** Sud; **quota:** 380 m. s.l.m.; **zona fitoclimatica:** *Lauretum* freddo; **terreno:** scheletro affiorante; **fitocenosi:** Roverella (*Quercus pubescens* Wild.) e Cerro (*Quercus cerris* L.).

Stazione di Monte Rufeno (VT)

Località: Monte Rufeno (Riserva Naturale di Monte Rufeno); **orografia:** pendenza media; **esposizione:** Sud - Ovest; **quota:** 650 m. s.l.m.; **zona fitoclimatica:** *Castanetum*; **terreno:** scheletro affiorante; **fitocenosi:** Roverella (*Quercus pubescens* Wild.) e Cerro (*Quercus cerris* L.).

ANDAMENTO CLIMATICO

Nelle figure vengono riportati gli andamenti climatici del biennio 2002 – 2003 delle stazioni climatiche di riferimento nel Lazio ed in Abruzzo, rispettivamente di San Gregorio, Borgo San Michele, Rieti, Isola Gran Sasso, Monte Rufeno e Castel Porziano che riteniamo rappresentativi delle stazioni da noi considerate. Da essi si può notare come l'andamento climatico pressoché in tutte le stazioni sia stato nel 2002 molto piovoso e relativamente fresco mentre nel 2003 molto siccitoso e caldo.

Figura 1. Andamenti climatici relativi alle stazione di San Gregorio (RM) durante il biennio 2002-2003.
(a) Bagnouls Gausсен, (b) andamento delle temperature medie decadali ($^{\circ}\text{C}$) ed istogrammi delle precipitazioni decadali (mm).

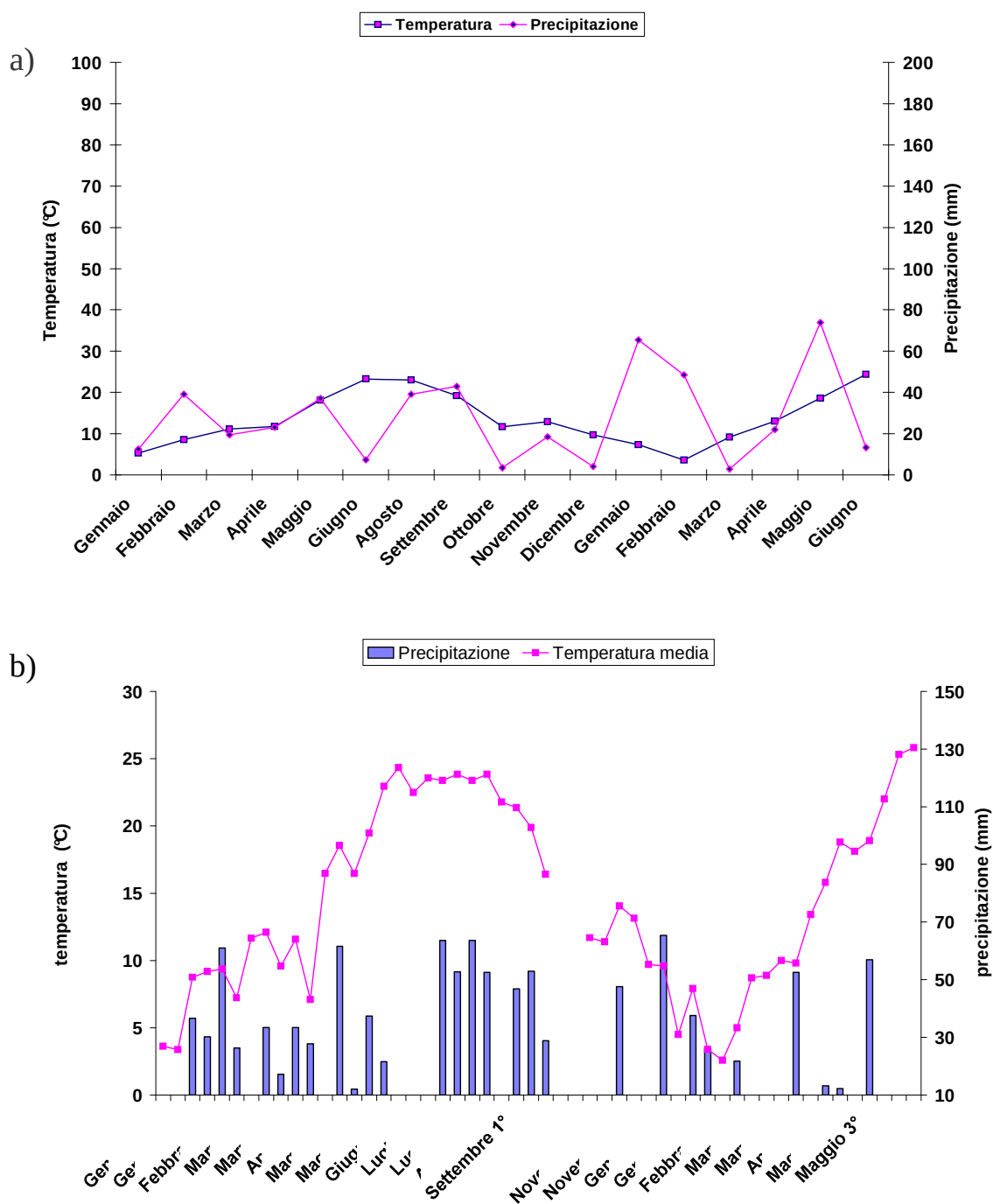


Figura 2. Andamenti climatici relativi alla stazione di Borgo San Michele (LT) durante il biennio 2002-2003. (a) Bagnouls Gausson, (b) andamento delle temperature medie decadali (°C) ed istogrammi delle precipitazioni decadali (mm).

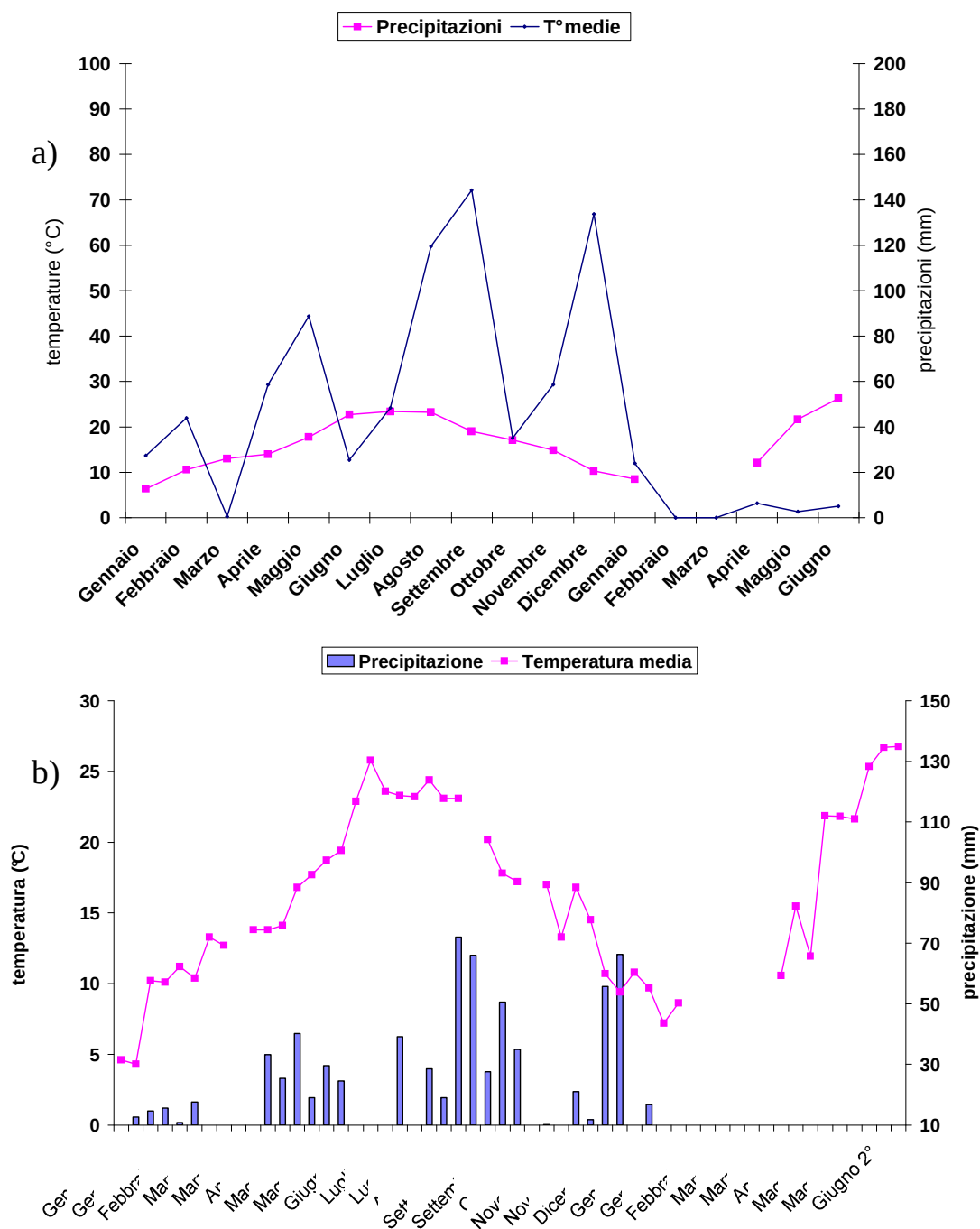


Figura 3. Andamenti climatici relativi alla stazione di Rieti durante il biennio (2002-2003). (a) Bagnouls Gausse, (b) andamento delle temperature medie decadali ($^{\circ}\text{C}$) ed istogrammi delle precipitazioni decadali (mm)

a)

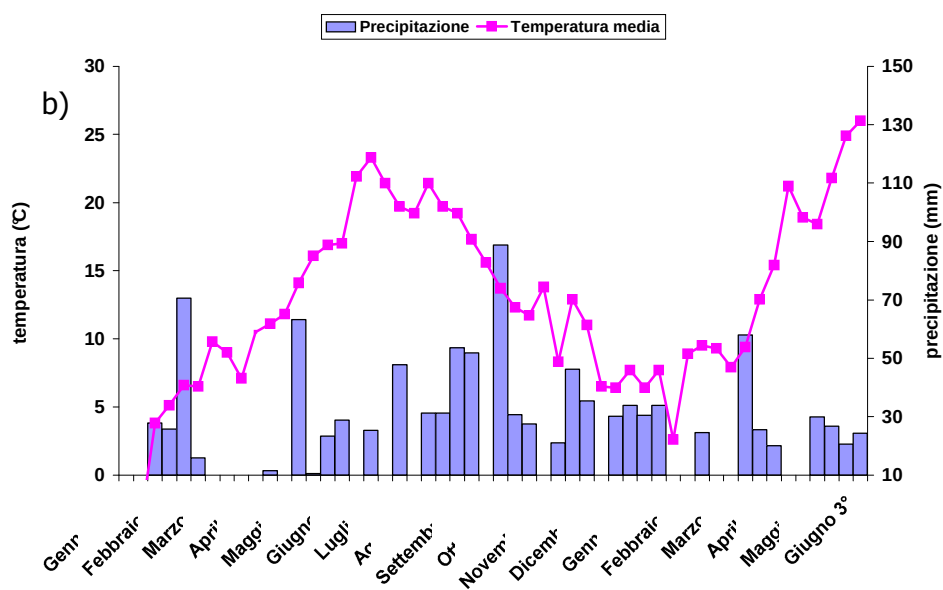
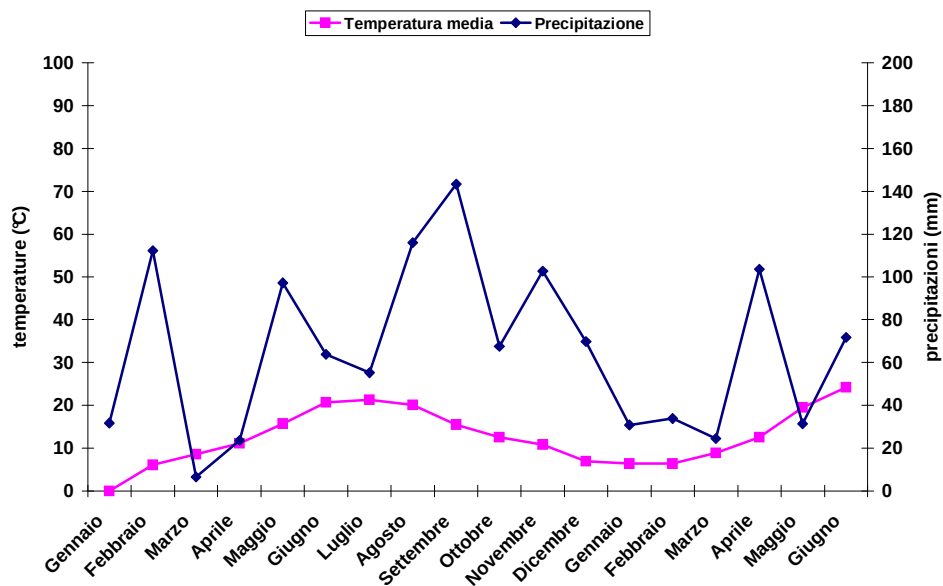


Figura 4. Andamenti climatici relativi alla stazione di Isola G.S. (TE) durante il biennio 2002 – 2003. a) Bagnouls Gaussen; b) andamento delle temperature medie decadali (°C) ed istogrammi delle precipitazioni decadali (mm).

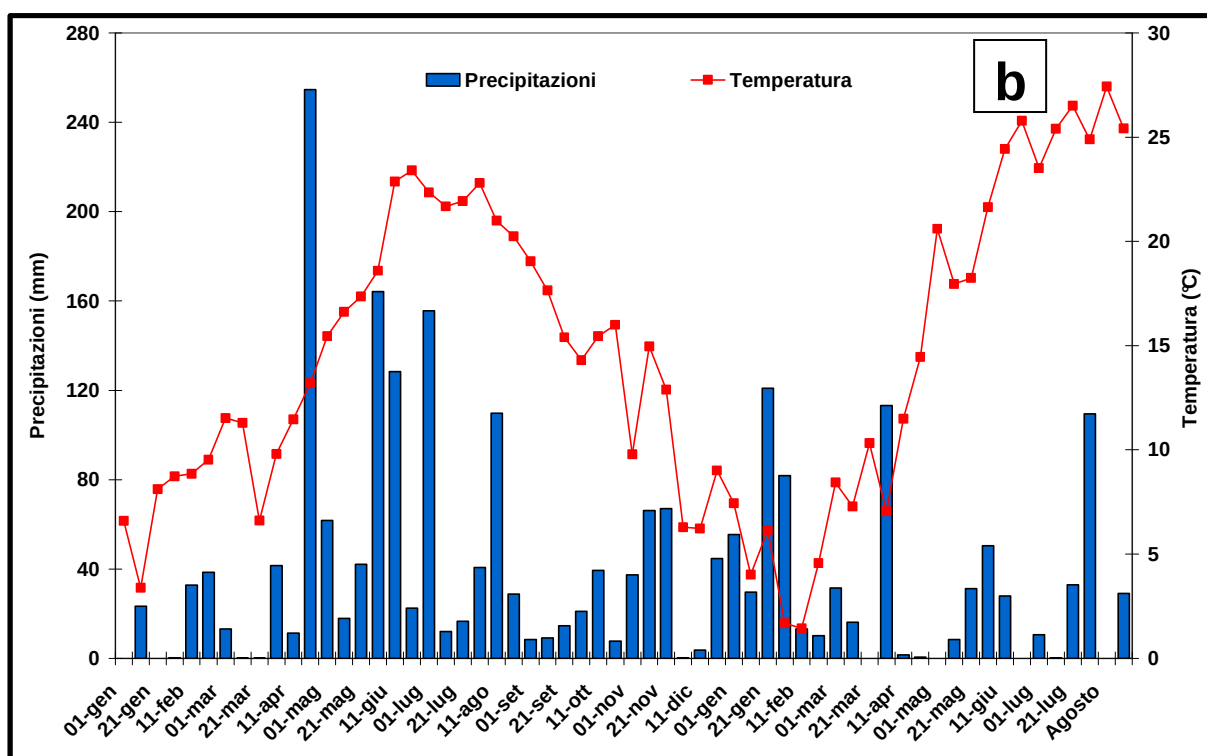
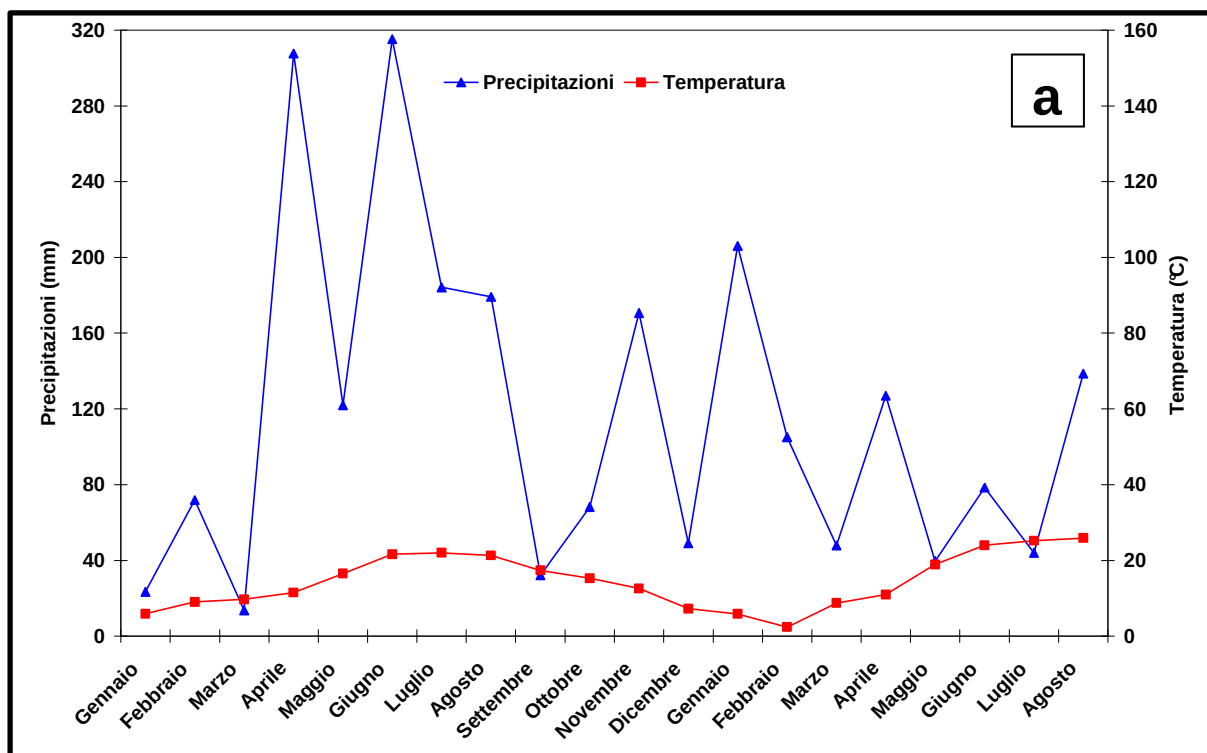


Figura 5 . Grafico Bagnouls-Gaussen relativo alla stazione di Monte Rufeno negli anni 2002-2003.

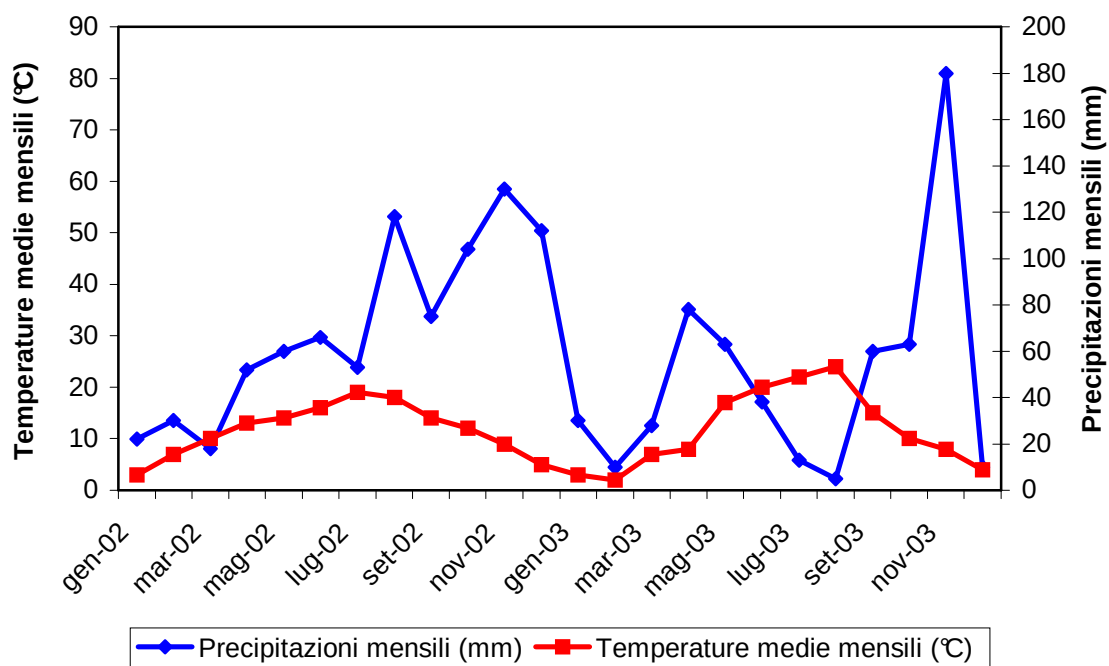
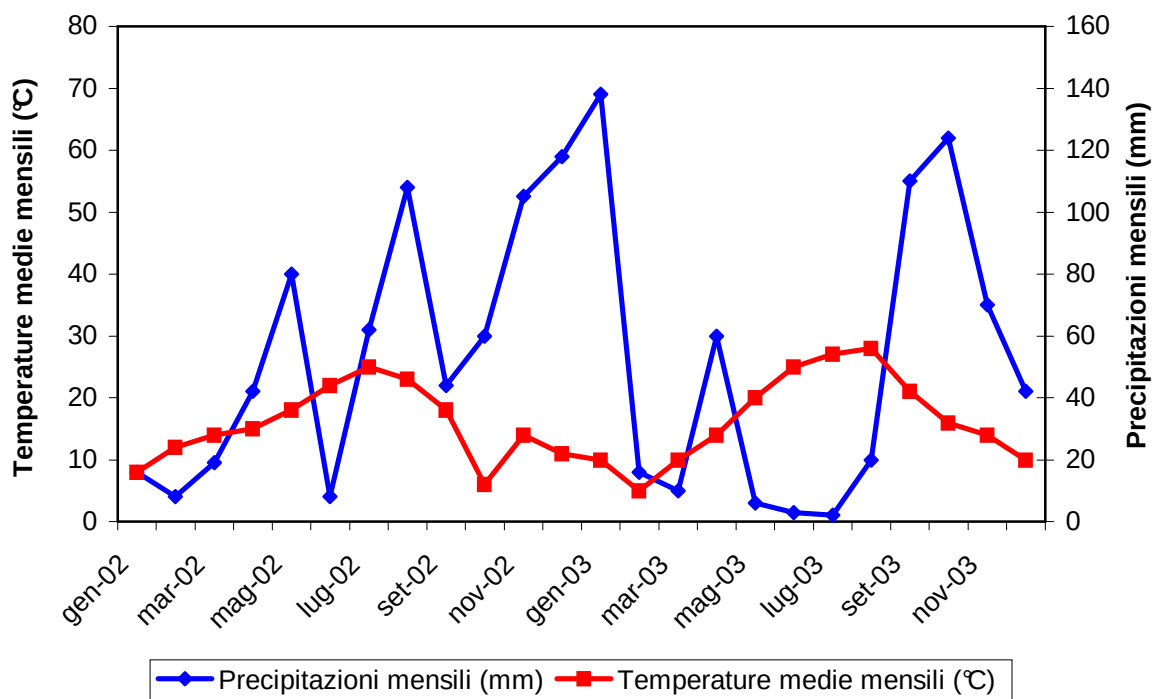


Figura 6. Grafico Bagnouls – Gaussen relativo al periodo 2002 – 2003 nella Tenuta di Castelporziano.



ALLEGATO 2

Descrizione degli organismi utilizzati nelle prove di antagonismo

PATOGENI

BISCOGNIAUXIA MEDITERRANEA (DE NOT.) KUNTZE

B. mediterranea è un fungo noto come patogeno di debolezza, agente del cancro carbonioso delle querce, appartenente alla divisione *Ascomycota*, ordine *Pyrenomycetes*, famiglia *Xylariaceae*.

In passato era stata classificata anche come *Sphaeria mediterranea* (De Not.), *Nummularia rapandoides* (Fuckel), *N. mediterranea* De Not. (Saccardo) e *Nummulariola mediterranea* De Not. (Martin); e soprattutto *Hypoxyton mediterraneum* (de not) Mill., binomio che è stato utilizzato fino a qualche anno fa, fino a quando Wall non dimostrò la preferenza verso *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) O. Kuntze.

La corrispondente forma imperfetta è stata classificata dapprima come *Botrytis sylvatica* e successivamente come *Periconiella musae* Ellis da Jong e Rogers.

Le strutture della riproduzione sessuata sono costituite da periteci globosi, grandi 0,5-1 x 0,4—0,5µm, provvisti alla sommità di un piccolo ostiolo. Nel loro interno si trovano degli aschi cilindrici (figura 3), brevemente pedunculati, contenenti otto ascospore grandi 12,5-23 x 5-10, µm di forma ellissoidale, di colore scuro e caratterizzate da una rima longitudinale.

Alla sommità degli aschi si nota un cercine ispessito la cui funzione sembra essere collegata all'espulsione delle ascospore. L'ispessimento potrebbe garantire la formazione di una pressione interna sufficiente a permettere alle ascospore di attraversarlo.

Intercalate agli aschi sono presenti anche numerose parafisi (ife sterili) che aiutano l'espulsione attiva delle ascospore attraverso l'ostiolo del peritecio.

Recenti studi hanno dimostrato come l'espulsione delle spore dagli stromi avvenga in presenza d'acqua o di alta umidità relativa durante tutto l'arco dell'anno.

Le ascospore germinano in un ampio intervallo di temperature con un optimum a 35°C. Comunque, già brevi esposizioni a temperature superiori ai 20°C innescano il fenomeno di germinazione, così come la presenza dei tessuti dell'ospite.

La germinazione delle ascospore avviene attraverso l'emissione di due tubetti germinativi in corrispondenza della rima laterale (scanalatura longitudinale) dopo che la spora si è liberata dello strato più esterno della parete, l'esosporio o perisporio, con un processo denominato "eclosione".

I periteci sono inseriti in uno pseudo-tessuto coriaceo e di colore scuro denominato "stroma"; questa matrice vegetativa ha, tra l'altro, funzione di immagazzinamento degli elementi nutritivi necessari per lo sviluppo dei corpi fruttiferi che emergono dal suo interno fino alla superficie esterna. Si tratta di una struttura comune, sebbene con morfologia estremamente variabile, presente in molti altri Ascomicota.

Il corpo dello stroma può essere suddiviso in due strati differenti: l'ectostroma, che è la porzione superficiale ed è costituito esclusivamente dalle ife del fungo, e l'endostroma, il quale si sviluppa dentro i tessuti corticali e legnosi e la cui struttura comprende sia le cellule fungine che quelle vegetali.

A testimonianza dell'importanza che assumono sia la morfologia che il colore degli stromi, vale la pena ricordare nuovamente che essi sono stati, ed in buona misura sono ancora, i criteri principali per individuare i generi e le specie appartenenti alla famiglia delle *Xylariaceae*. Nella forma conidica, i conidiofori sono grandi 200-300 x 4-6 µm ed inizialmente ialini, con il passare del tempo tendono a scurire. Essi sono spesso aggregati a formare dei tipici cuscinetti cotonosi. I conidi sono di forma ellissoidale o ovoidale, con colorazione da ialina a leggermente bruna; presentano una parete liscia e misurano 2,5-7,5 x 2,5-4 µm. La produzione di conidi sulla superficie stromatica coincide con l'inizio della formazione dei periteci nell'endostroma. È importante sottolineare che, fino ad oggi, *in vitro* è stato possibile osservare solo le strutture di riproduzione asessuata.

CORYNEUM QUERCINUM

È un fungo che appartiene alla divisione degli *Eumycota*, all'ordine delle *Melanconiales* e alla famiglia delle *Melanconiaceae*.

Il genere *Coryneum* spp. si caratterizza per la presenza di stromi conidiferi sottoepidermici discoidali o lenticolari, compatti e di colore nero. I conidi (Fig. 1) sono oblungi o fusiformi, provvisti di due o più setti trasversali, di colore fulvo o bruno.

Il *Coryneum* spp. non risulta essere un tipico fungo endofita patogeno, ma in base a quanto riportato dalla letteratura più recente sul genere *Quercus* (sughera in particolare), può provocare dei cancretti corticali, assumendo così carattere patogenetico.

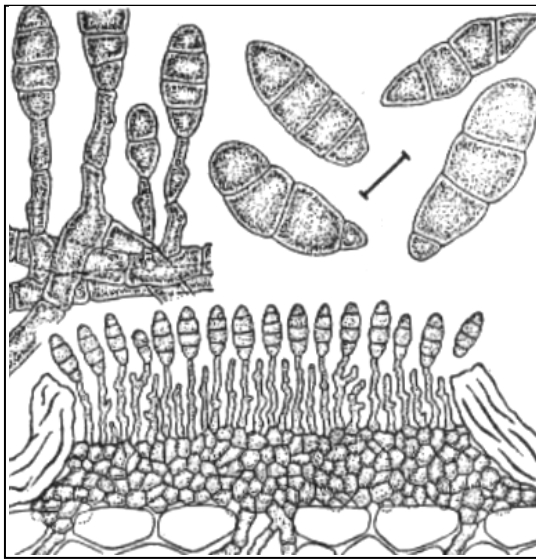


Figura 1. Caratteristiche microscopiche (conidi e conidiofori) del genere *Coryneum*.

PLEUROPHOMA CAVA

È un fungo appartenente alla divisione degli *Ascomycota*, ordine *Pleosporales*, famiglia *Pleosporaceae*.

Le ife sono di colore ialino-bruno. I picnidi, di colore scuro, sono grandi, con forma rotondeggiante-piriforme, sono caratterizzati dalla presenza di parecchie aperture chiamate ostiloli, dai quali escono i conidi verso l'esterno (Fig. 2)

Le colonie di *Pleurophoma* spp. non si sviluppano molto velocemente, sono piane e spesso assumono un aspetto polveroso e vellutato. La parte anteriore ha una colorazione scura tendente al verde.

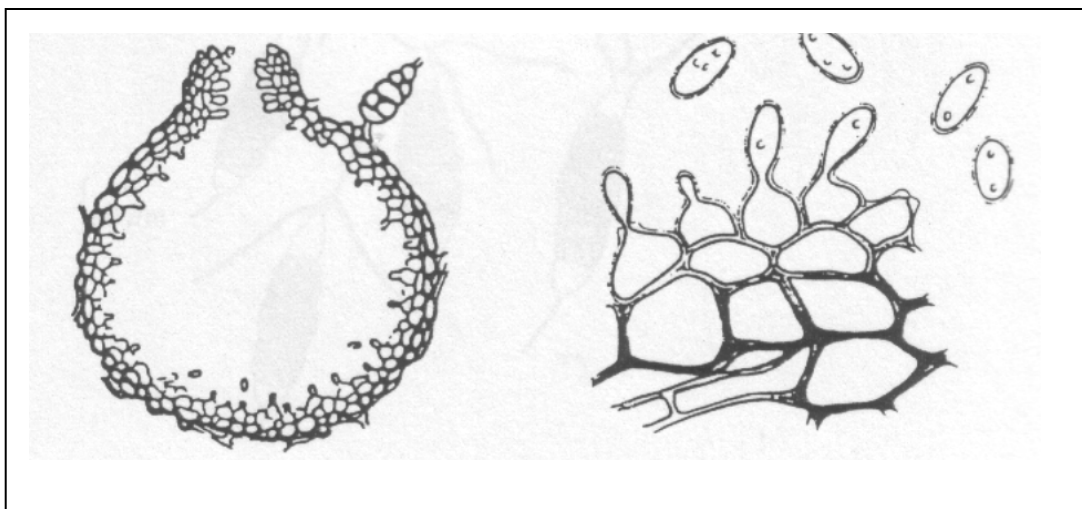


Figura 2. Caratteristiche microscopiche (picnidio e conidi) del genere *Pleurophoma* spp.

Pleurophoma cava differisce dalle altre specie di *Pleurophoma* per la struttura della parete dei picnidi, per la forma dei conidi e delle cellule conidiogene, che risultano essere più piccole e di forma allungata. Macroscopicamente la colonia si presenta compatta, di colore grigio o verde oliva, la crescita in termostato a 20°C è modesta.

ANTAGONISTI

ACREMONIUM SP.

È un fungo appartenente alla divisione degli *Ascomycota*, all'ordine *Hypocreales*, famiglia *Hypocreaceae*.

Le specie del genere *Acremonium* spp. possiedono delle ife ialine settate, generalmente molto fine e strette.

I conidiofori (Fig. 3), non ramificati e solitari sono eretti e possono formarsi lungo le ife, sulle punte delle stesse o in entrambe le posizioni, sono separati dalle ife da un caratteristico setto. Al loro apice sono inseriti i conidi, generalmente unicellulari, ma non è raro trovarne di bicellulari, sono ialini ed hanno una dimensione di 2-3 x 4-8 µm. Compaiono generalmente in serie, a formare delle sfere o più raramente delle fragili catenelle, in ogni caso sono avvolti da una sostanza mucillaginosa ed hanno una forma variabile: fusiforme, leggermente curvato o a mezza luna.

L'accrescimento delle colonie di *Acremonium* sp. è inizialmente lento, poi diviene più veloce, raggiunge la maturità in 5 giorni, quando il diametro della colonia è di 1-3 cm, cresciuto su substrato agarizzato ed a una temperatura di 20-25 °C.

Dall'osservazione delle caratteristiche macroscopiche si nota una struttura umida, compatta e polverulenta, quando la colonia invecchia assume una consistenza più lanosa, dovuta alla sovrapposizione delle ife.

Il colore della colonia varia, a seconda della specie dal bianco, al rosa fino all'arancio; il retro è generalmente incolore.

CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES

C. cladosporioides è un fungo appartenente alla divisione degli *Eumycota*, ordine *Hyphales* e alla famiglia *Dematiaceae*.

Il genere *Cladosporium* comprende circa 500 specie ed ha una distribuzione praticamente ubiquitaria su tutto il globo.

Le caratteristiche microscopiche (Fig. 4) sono molto variabili a seconda della specie, ma tutte producono delle ife marroni settate con conidiofori eretti ed una pigmentazione verde scura che portano alla loro estremità i conidi riuniti in tipiche catenelle a formare un mazzetto.

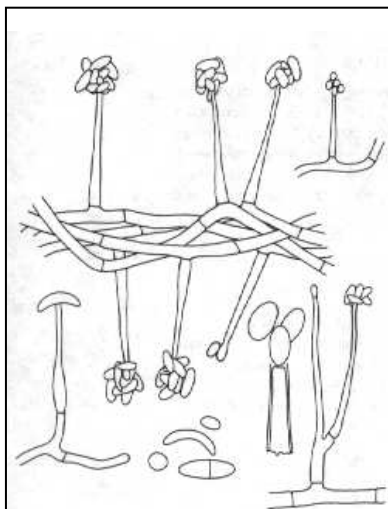


Figura 3. Caratteristiche microscopiche (ife, conidiofori e conidi) del genere *Acremonium* sp.

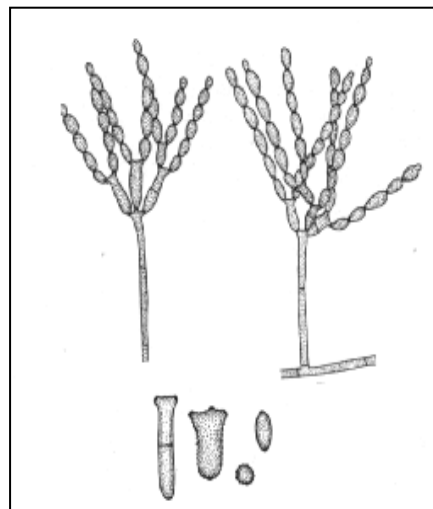


Figura 4. Caratteristiche microscopiche (conidiofori e conidi) del genere *Cladosporium* sp.

I conidi di *C. cladosporioides* monocellulari o bicellulari sono rotondeggianti-ovali ed hanno una dimensione di 3-6x3-5 μ m, la parete è liscia e solo occasionalmente risulta essere rugosa. Le colonie appaiono olivacee-verdastre ed ovaliformi, hanno un tasso di accrescimento abbastanza sostenuto su substrato agar a 20-25°C, presentano una struttura polverulenta e vellutata. La maggior parte delle specie non si sviluppa a temperature superiori a 30-35°C.

EPICOCCUM NIGRUM LINK

Il genere *Epicoccum*, appartenente all'ordine *Tuberculariales*, famiglia *Tuberculariaceae*, presenta sporodochi globosi e glabri. I conidiofori sono tozzi, assai corti e tortuosi, di tinta scura. I conidi terminali (Fig. 5) sono globosi o ellissoidali, semplici o pluricellulari, molto scuri, spesso echinulati o reticolati.

Questo genere comprende sia specie a carattere emiparassitario, capaci di svilupparsi a carico di organi deperienti, sia specie a prevalente attitudine saprofitaria.

Epicoccum nigrum Link, i cui conidi, a colorazione bruno-nera, presentano una superficie reticolata del diametro di circa 23 μ , risulta essere una specie diffusissima su svariati organi deperienti o morti, oltre a rappresentare un endofita piuttosto comune nei

nostri boschi di querce. Per esso è da tempo accertata la capacità di produrre sostanze antibiotiche capaci di inibire altri agenti fungini, oltre che ostacolare gli attacchi di nematodi fitopatogeni.

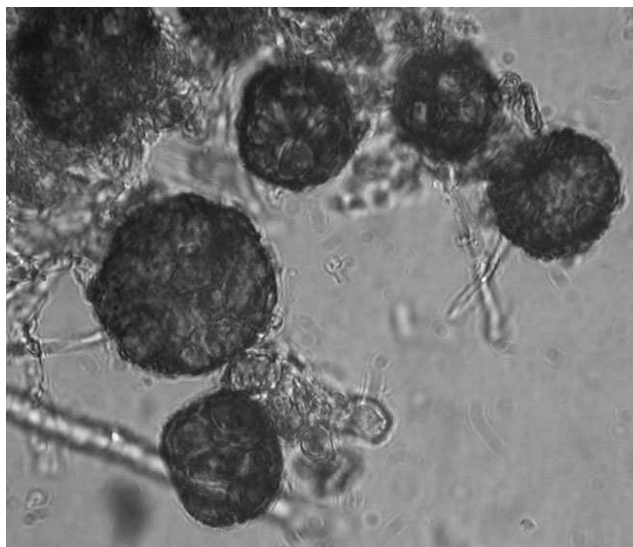


Figura 5. Caratteristiche microscopiche (conidi) di *Epicoccum nigrum*

GLIOCLADIUM ROSEUM.

È un fungo appartenente alla divisione *Ascomycota*, ordine *Hypocreales*, famiglia *Hypocreaceae*.

È filamentoso, produce ife settate e ialine, i conidiofori sono eretti e ramificati al loro apice. Le ramificazioni terminali hanno una caratteristica forma di fiaschetta.

I conidi sono unicellulari, ovali o cilindrici accumulati in una singola sfera terminale abbastanza grande (Fig. 6).

Le colonie di *Gliocladium roseum* crescono abbastanza velocemente su terreno agar a 20-25°C ed hanno una consistenza cotonosa, la colorazione è varia, dal bianco al giallo al rosa al verde. La parte posteriore è, in genere giallo biancastra.

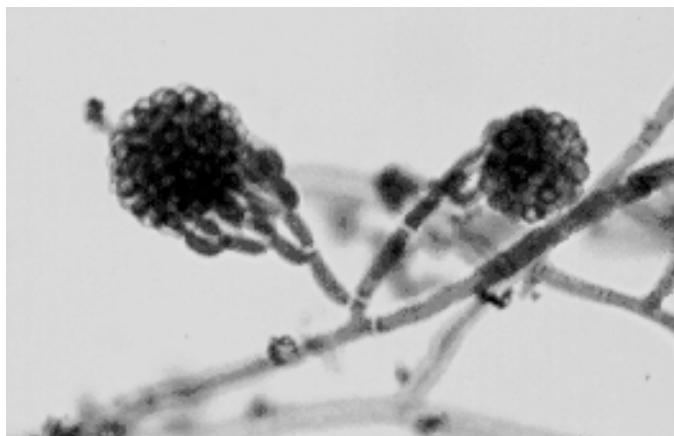


Figura 6. Caratteristiche microscopiche (ife, conidiofori e conidi) del genere *Gliocladium*.

PENICILLIUM SPP.

Il genere *Penicillium* appartiene alla divisione *Ascomycota*, ordine *Plectascales*, famiglia *Plectascaceae*. È caratterizzato da micelio pulverulento, rami conidiofori con catena dalla forma a pennello (Fig. 7). I conidiofori sono eretti, settati, risolvendosi apicalmente in un certo numero di branche, le quali tornano poi a ramificarsi una o più volte, dando luogo ad una struttura avente l'aspetto di un pennello. I rami terminali sono costituiti da elementi claviformi (fialidi) portanti ciascuno una catena di conidi. I conidi sono globosi od ovoidali, unicellulari, ialini o variamente colorati.

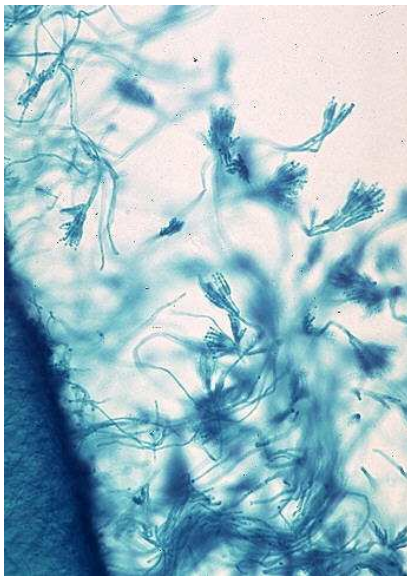


Figura 7. Numerosi rami conidiofori con conidi in catena dalla tipica forma a pennello del genere *Penicillium* spp..

In certe condizioni, ed in certe specie, i conidiofori tendono a riunirsi in formazioni coremiali.

I *Penicillium* formano delle muffe molto diffuse in natura e, pur non assumendo mai vere attitudini parassitarie, sono spesso causa di marciumi molli, soprattutto di frutti carnosì.

TRICHODERMA VIRIDE

Il genere *Trichoderma viride*, appartenente all'ordine *Hyphales* e alla famiglia delle *Moniliaceae*, presenta conidiofori poco differenziati, ramosi o semplicemente forcuti, con le estremità delle ramificazioni talvolta risolvendosi in elementi filiformi e quivi portanti dei glomeruli di conidi. Questi ultimi sono sempre molto piccoli, unicellulari, ialini o leggermente colorati.

Le specie di questo genere presentano carattere saprofitario. In particolare *Trichoderma viride*, risulta essere una specie estremamente diffusa e polifaga. In Italia la specie è segnalata come agente cromogeno superficiale del legname.

Su qualsiasi matrice naturale, il *T. viride* produce abbondantissime fruttificazioni conidiche (Fig. 8) notevolmente polimorfe, ma rappresentate comunque da conidiofori sempre ramosi, portanti alle estremità delle ramificazioni, dei guppi compatti (spesso di alcune decine di elementi) di conidi ialini, tendenzialmente sferici del diametro di 3-4 μ .

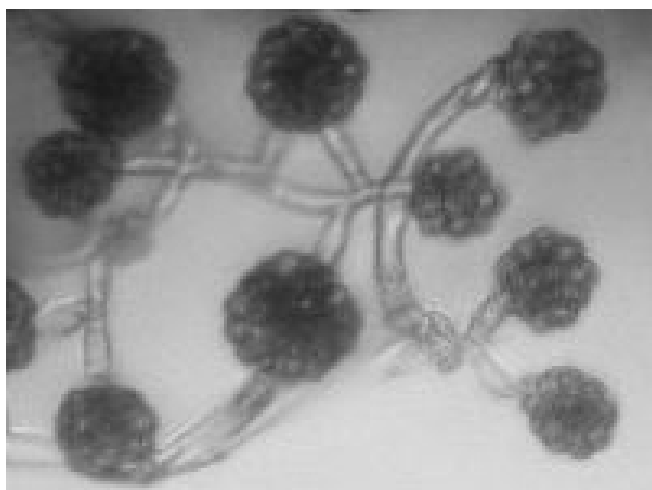


Figura 8. Caratteristiche microscopiche (conidi) del genere *Trichoderma*.

VERTICILLIUM SPP.

Verticillium lecanii è un fungo filamentoso che si caratterizza per l'avere conidiofori ialini, disposti a verticillo, e conidi ialini e settati.

I conidiofori sono in genere molto lunghi, possono essere semplici o ramificati.

La ramificazione si presenta sempre in verticilli (dalla quale il nome del genere) e si può sviluppare in vari livelli (Fig. 9).

All'apice del conidioforo si nota un restringimento, alla fine del quale sono inseriti i conidi che hanno una dimensione di 2-13 μ m, possono essere ialini o avere una colorazione brillante. I conidi sono nella maggioranza dei casi unicellulari, hanno una forma ovale o periforme, sono riuniti in gruppi a formare delle teste appiccicose, avvolte da sostanze mucillaginose.

Le colonie di *Verticillium lecanii* si sviluppano lentamente, vengono poste in crescita in substrato agar a 20-25°C. La consistenza risulta vellutata e la colorazione biancastra. Nella parte anteriore invece si nota una colorazione inizialmente bianca poi diviene giallo-rosata.

Esistono numerose specie di *Verticillium* patogene, tra cui sono particolarmente note *V. albo-atrum* e *V. dahliae*, agenti di tracheomicosi. Il *Verticillium lecanii*, probabilmente ad habitus aereo, è conosciuto per essere un entomopatogeno.

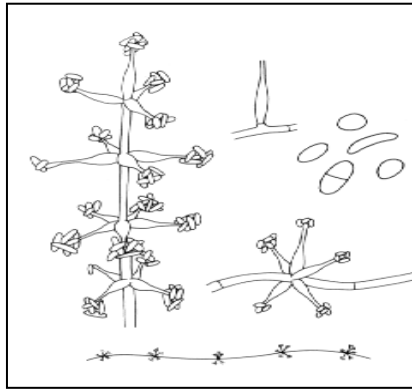


Figura 9. Caratteristiche microscopiche (conidiofori e conidi) del genere *Verticillum*.