

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
Tuscia

FACOLTÀ DI AGRARIA

DIPARTIMENTO DI PROTEZIONE DELLE PIANTE

DOTTORATO DI RICERCA IN PROTEZIONE DELLE PIANTE
-XXI CICLO-

Settore disciplinare AGR/012

Curriculum: Malattie ad eziologia complessa

TESI DI DOTTORATO

**“INDAGINI SULL’EZIOLOGIA DEL CANCRO CORTICALE
DEL NOCE DA LEGNO, SUI FATTORI CONDIZIONANTI E
SULLA RESISTENZA GENETICA DI *JUGLANS*.”**

Dottorando
Dott. Fulvio Ravaioli

Tutore
Prof. Naldo Anselmi

Co-Tutore
Dott. Alfredo Fabi

Coordinatore
Prof. Leonardo Varvaro

A.A. 2008-2009

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag.5
1.1. L'ARBORICOLTURA DA LEGNO	pag.5
1.2. IMPORTANZA DELLE LATIFOGIE DI PREGIO	pag.7
1.3. NORMATIVE COMUNITARIE E AGEVOLAZIONI ECONOMICHE	pag.9
1.4. IL GENERE JUGLANS	pag.12
1.5. IBRIDIZZAZIONE TRA SPECIE DI <i>JUGLANS</i>	pag.13
1.6. PRINCIPALI SPECIE DI <i>JUGLANS</i> E GENERI AFFINI	pag.15
1.6.1. NOCI DEL CENTRO AMERICA	pag.15
1.6.2. NOCI DEL NORD AMERICA	pag.17
1.6.3. NOCI INDOEUROPEI	pag.20
1.7. <i>JUGLANS REGIA</i>: NOCE NOSTRANO DA LEGNO	pag.22
1.7.1. ASPETTI BOTANICI	pag.22
1.7.2. ESIGENZE AMBIENTALI	pag.23
1.7.3. UTILIZZAZIONE DEL LEGNO	pag.26
1.7.4. POTENZIALITÀ PRODUTTIVE	pag.27
1.8. JUGLANDETI	pag.31
1.9. PROBLEMATICHE FITOPATOLOGICHE DEL NOCE DA LEGNO	pag.32
1.9.1. DANNI DA INSETTI	pag.32
1.9.2. MALATTIE DI ORIGINE ABIOTICA	pag.33
1.9.3. MALATTIE DI ORIGINE BIOTICA	pag.34
1.9.3.1. Marciumi radicali	pag.35
1.9.3.2. Antracnosi del noce	pag.37
1.9.3.3. Macchie bianche delle foglie	pag.38
1.9.3.4. Maculatura batterica	pag.39
1.9.3.5. Cancri rameali	pag.41
1.9.3.6. Cancro corticale del fusto	pag.43
1.10. CENNI SULL'ENDOFITISMO DEI FITOPATOGENI	pag.45
2. OBIETTIVI DELLA TESI	pag.47
3. MATERIALI E METODI	pag.49
3.1. INDAGINI SULL'EZIOLOGIA DEL CANCRO CORTICALE DEL FUSTO	pag.49

3.1.1. MICRORGANISMI PATOGENI PRESENTI NEI CANCRI	pag.49
3.1.1.1. Cancri da zone geografiche diverse	pag.49
3.1.1.2. Isolamenti in epoche diverse	pag.52
3.1.1.3. Cancri da fenotipi diversi	pag.52
3.1.1.4. Cancri da cultivars o cloni di <i>Juglans regia</i> diversi	pag.52
3.1.1.5. Cancri in diverso stadio evolutivo	pag.52
3.1.1.6. Isolamento, identificazione e quantificazione dei microrganismi	pag.55
3.1.2. INDAGINI SULLA PATOGENICITÀ DEI MICRORGANISMI RISCONTRATI	pag.58
3.1.3. ANALOGIA CON I PATOGENI ASSOCIATI AI CANCRI RAMEALI	pag.61
3.1.4. <i>HABITUS</i> ENDOFITICO DEI PRESUNTI AGENTI DEL CANCRO DEL FUSTO	pag.63
3.1.5. ANTAGONISMO TRA I MICRORGANISMI RISCONTRATI NEI CANCRI	pag.65
3.1.5.1. Saggi con colture duali	pag.65
3.1.5.2. Saggi con filtrati Colturali	pag.66
3.2. INDAGINI SUI FATTORI PREDISPONENTI LA MALATTIA	pag.67
3.2.1. DENSITÀ DELLE PIANTE	pag.67
3.2.2. CONCIMAZIONI ED IRRIGAZIONI	pag.69
3.2.3. ALTRI FATTORI	pag.71
3.3. INDAGINI SULLA RESISTENZA GENETICA ALLA MALATTIA	pag.72
3.3.1. RILIEVI IN CAMPO	pag.72
a) Impianto sperimentale di San Matteo delle Chiaviche di Mantova	pag.72
b) Impianto pluriclonale di Rieti	pag.72
c) Confronti tra <i>Juglans regia</i> e <i>Juglans nigra</i>	pag.73
3.3.2. VALUTAZIONI ATTRAVERSO INOCULAZIONI ARTIFICIALI IN SERRA	pag.74
a) Resistenza di cultivars diverse di <i>Juglans regia</i>	pag.74
b) Resistenza di <i>Juglans nigra</i> in confronto con <i>Juglans regia</i> e relativi ibridi	pag.74
c) Resistenze di specie diverse di <i>Juglans</i> in confronto con due generi similari, <i>Carya</i> e <i>Prerocarya</i>	pag.74
3.3.2.1. Patogeni considerati e metodologie per le inoculazioni e per i Controlli	pag.75
4. RISULTATI	pag.77
4.1. QUADRO SINTOMATOLOGICO DELLA MALATTIA	pag.77

4.2. INDAGINI SULL'EZIOLOGIA DELLA MALATTIA	pag.83
4.2.1. MICRORGANISMI RISCONTRATI NEI CANCRI	pag.83
4.2.1.1. Zone geografiche diverse	pag.83
4.2.1.2. Epoche differenti	pag.92
4.2.1.3. Fenotipi diversi	pag.93
4.2.1.4. Cultivars e cloni di <i>Juglans regia</i> diversi	pag.96
4.2.1.5. Cancro in diverso stadio evolutivo	pag.98
4.2.2. INDAGINI SULLA PATOGENICITÀ DEI MICRORGANISMI RISCONTRATI NEI CANCRI	pag.102
4.2.3. ANALOGIA CON I PATOGENI ASSOCIATI AI CANCRI RAMEALI	pag.105
4.2.4. <i>HABITUS</i> ENDOFITICO DEI PRESUNTI PATOGENI	pag.108
4.2.5. PROVE DI ANTAGONISMO	pag.114
4.2.6. PROBABILE QUADRO EZIOLOGICO DELLA MALATTIA	pag.122
4.3. INDAGINI SUI FATTORI PREDISPONENTI LA MALATTIA	pag.123
4.3.1. DENSITÀ DELLE PIANTE	pag.123
4.3.2. CONCIMAZIONI ED IRRIGAZIONI	pag.126
4.3.3. FATTORI VARI	pag.129
4.4. RESISTENZA GENETICA ALLA MALATTIA	pag.131
4.4.1. ANALISI DELLA RESISTENZA IN CAMPO	pag.131
4.4.2. INDAGINI SULLA RESISTENZA ATTRAVERSO INOCULAZIONI ARTIFICIALI IN SERRA	pag.134
4.4.2.1. Resistenza di cultivars diverse di <i>Juglans regia</i>	pag.135
4.4.2.2. Resistenza di <i>Juglans nigra</i>, <i>Juglans regia</i> e relativi ibridi	pag.139
4.4.2.3. Resistenze di specie diverse di <i>Juglans</i> in confronto con due generi simili, <i>Carya</i> e <i>Prerocarya</i>	pag.141
5. SINTESI E CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	pag.144
6. BIBLIOGRAFIA	pag.147
ALLEGATO A	pag.153
RINGRAZIAMENTI	pag.158

1. INTRODUZIONE

1.1. L'ARBORICOLTURA DA LEGNO

Con il termine “arboricoltura da legno” si definisce l’occupazione temporanea e reversibile di terre a vocazione agricola, con l’impianto di specie arboree, destinate alla produzione di masse legnose finalizzate al prevalente utilizzo industriale o da lavoro.

Con tale termine possono essere compresi impianti di conifere e di latifoglie a rapido accrescimento, piantagioni di latifoglie con legno di pregio, impianti a turno breve per la produzione di biomassa e l’agroselvicoltura. Tutti questi modelli colturali sono comunque caratterizzati da specifiche tecniche, finalità produttive e ricadute ambientali (MINOTTA, 2003). L’arboricoltura da legno è un settore della selvicoltura la cui rapida evoluzione degli ultimi anni ha rappresentato la risposta ai cambiamenti socio-economici che a loro volta hanno mutato i rapporti fra l’uomo e l’ambiente (BAGNARESI E GIANNINI, 1997).

La crisi dell’agricoltura, l’abbandono delle colture e delle aziende agricole, il prevalere delle attività turistiche, industriali, artigianali o comunque di altre attività più remunerative, hanno reso disponibili nuovi spazi per le colture forestali; l’arboricoltura da legno, pertanto, è diventata uno strumento utile di “riconversione colturale”, in quanto sistema artificiale temporaneo o transitorio che, in taluni casi ed in determinate condizioni, può rappresentare la capacità di evoluzione verso un ecosistema forestale.

L’arboricoltura da legno ha numerose finalità, fra le più significative ricordiamo: la valorizzazione dei fattori naturali di produzione; il riflesso sull’aumento della produzione legnosa, che consente di attenuare la pressione di utilizzazione nei boschi esistenti; la costituzione di una copertura arborea che rivaluta l’ambiente ed il paesaggio, la rete ecologica e la tutela dell’assetto del territorio, con la contemporanea eliminazione, nel caso degli impianti sostitutivi delle colture agrarie, dei danni ecologici conseguenti all’uso-abuso di concimi e di presidi fitoiatrici; ancora, l’arboricoltura da legno contribuisce alla riduzione delle produzioni agricole in eccesso, alla creazione di redditi alternativi per le aziende e ad una minore dipendenza dall’estero per le forniture di legname.

L’arboricoltura da legno può certamente portare un contributo significativo all’economia interna del nostro Paese, attraverso diverse forme applicative mirate a

sfruttare e soddisfare l'ampia varietà delle situazioni ambientali ed infrastrutturali tipiche del nostro territorio, realizzabili con tecniche a basso impatto ambientale e che conducono alla produzione di una materia prima *“ancora lungi dall'essere eccedentaria sia in Italia che in Europa”* (MINOTTA, 2003).

Non bisogna tuttavia sottovalutare che, per ottenere assortimenti di qualità soprattutto per gli impianti con latifoglie, è necessario adottare cicli piuttosto lunghi, con costi sensibili e conseguente “immobilizzazione” del fattore terra per lunghi periodi, con rischi alquanto elevati.

In Italia, come in altri Paesi europei, negli ultimi anni si è assistita ad una generale rivalutazione dell'arboricoltura da legno, delle cosiddette “produzioni legnose fuori foresta”, nel quadro delle attività produttive del settore primario.

I principali fattori che hanno portato a ciò sono: le sempre maggiori importazioni italiane ed europee di materia prima legno per soddisfare le crescenti esigenze dell'industria del settore; l'opportunità di alleviare la pressione antropica sulle foreste allo scopo di favorire un graduale miglioramento degli ecosistemi forestali; le opportunità legate alla possibilità di contribuire al riequilibrio ecologico e paesaggistico di tante aree agricole intensamente coltivate: l'opportunità di destinazioni alternative per molti terreni agricoli in fase di abbandono colturale, soprattutto di quelle collinari e montane; l'occasione di creare una copertura arborea che rivaluta l'ambiente e il paesaggio; l'opportunità di creare occasioni di lavoro.

Questa situazione ha determinato, quindi, lo sviluppo di un'arboricoltura da legno basata su criteri diversi dal passato, dando importanza, oltre all'aspetto produttivo, anche all'aspetto ambientale e paesaggistico (MINOTTA, 2003).

Il ruolo positivo che la moderna arboricoltura da legno può svolgere a sostegno dello sviluppo sostenibile del territorio rurale è stato ben recepito a livello legislativo nazionale ed internazionale, così come si evince dai sussidi previsti dai regolamenti comunitari per il rimboschimento dei terreni agricoli (vedi poi).

1.2. IMPORTANZA DELLE LATIFOGIE DI PREGIO

L'arboricoltura da legno con latifoglie di pregio è una coltura di alberi con legname di alto valore tecnologico e viene pertanto destinato a lavorazioni altamente remunerative, in particolare trancatura, sfogliatura, segagione.

E' un tipo di coltura che presenta esigenze edafiche piuttosto elevate, con vegetazione, allo stato più o meno sporadico, nell'ambito di foreste mesofile più evolute, e le è universalmente riconosciuta una significativa importanza non solo dal punto di vista naturalistico, ma anche sotto il profilo estetico (MERCURIO E MINOTTA, 2000).

In Italia tale arboricoltura si è sviluppata a partire dagli anni Novanta, con l'attuazione del Reg. CEE 2080/92, che prevedeva cospicui aiuti per gli agricoltori intenzionati a convertire i terreni agricoli in piantagioni forestali a ciclo medio-lungo.

Tra il 1994 e il 2000 sul territorio nazionale sono stati realizzati in totale oltre 100.000 ettari di impianti con specie forestali: di questi, circa 70.000 appartengono all'arboricoltura con latifoglie di pregio, soprattutto di noce e ciliegio (SITO WEB: WWW.AIP.IT). La coltivazione delle latifoglie di pregio può efficacemente contribuire a diminuire il deficit comunitario e nazionale della materia prima legno (soprattutto nel settore del mobile e dell'arredamento), riducendo, contemporaneamente, la pressione dell'uomo sulle foreste naturali; questo tipo di arboricoltura può concorrere alla riconversione produttiva, in special modo di quei terreni agricoli nei quali non è più conveniente attuare le colture tradizionali.

Il risultato finale include anche un valido contributo a mantenere la vitalità occupazionale e imprenditoriale del mondo rurale.

Le piantagioni di latifoglie pregiate consentono, inoltre, di ridurre l'apporto di concimi, antiparassitari e diserbanti rispetto alla tradizionale agricoltura intensiva, in quanto i moduli colturali attuali escludono sostanzialmente l'uso indiscriminato di prodotti chimici. Nel contempo si realizza una copertura arborea di interesse ambientale e paesaggistico: infatti, nei terreni declivi, queste piantagioni possono esercitare anche una valida azione di difesa del suolo, riducendo l'effetto battente della pioggia e contribuendo in tal modo al contenimento dell'erosione superficiale, pur favorendo l'infiltrazione dell'acqua nel suolo (MINOTTA, 2003).

Altro aspetto importante da valutare è l'azione di queste coltivazioni sull'effetto serra, infatti è noto che il progressivo aumento della concentrazione atmosferica di anidride

carbonica, determinato dall'impiego dei combustibili fossili, è considerato tra i maggiori responsabili di tale effetto e dei cambiamenti climatici su scala planetaria, che si ipotizzano derivanti da tale fenomeno. Le piantagioni da legno possono contribuire all'assorbimento della CO₂ atmosferica, immobilizzando il carbonio nella biomassa legnosa e nel suolo, contrastando il progressivo aumento del livello di CO₂ in atmosfera, e favorendo, così, il conseguimento degli obiettivi previsti dal protocollo di Kyoto (SCARASCIA *ET AL.*, 1998).

Tra le specie più importanti utilizzate per l'arboricoltura di pregio rientrano: il noce comune (*Juglans regia* L.), il ciliegio selvatico (*Prunus avium* L.), l'acero montano (*Acer pseudoplatanus* L.), il frassino maggiore (*Fraxinus excelsior* L.), la rovere (*Quercus petraea* Matt.-Liebl.), la farnia (*Quercus robur* L.), l'ontano napoletano (*Alnus cordata* Loisel.). Tuttavia, come già accennato, il genere più utilizzato in Italia è sicuramente lo *Juglans*, soprattutto *J. regia*, genere su cui si incentra la tesi di Dottorato. Per quanto riguarda i modelli colturali hanno prevalso gli impianti puri, ma c'è una buona percentuale d'impianti noce-ciliegio e di impianti misti di latifoglie varie. Tale circostanza rappresenta una novità assoluta rispetto al passato ed è frutto della buona divulgazione dei risultati recentemente acquisiti dalla ricerca italiana sui benefici degli impianti misti nell'arboricoltura delle latifoglie di pregio: miglioramento quantitativo dell'accrescimento della specie principale, riduzione e semplificazione di alcune pratiche colturali, maggiore resistenza a danni biotici, maggiore valenza ambientale e paesaggistica (MINOTTA, 2003).

1.3. NORMATIVE COMUNITARIE E AGEVOLAZIONI ECONOMICHE

Dai primi anni '80, grazie ai ripetuti interventi legislativi e agli incentivi provenienti dalla politica agraria comunitaria (P.A.C.), si è sviluppata sempre di più una produzione legnosa “fuori foresta” mediante ripetuti interventi che hanno permesso di sviluppare, insieme alla aumentata disponibilità di superfici caratterizzate da buoni livelli di fertilità agronomica, un'ampia rete di impianti specializzati per la produzione di legname pregiato (BURESTI 2001; BURESTI *ET AL.*, 2001).

In particolare si possono citare: REG.269/79, con il quale venivano finanziate azioni di imboschimento e di miglioramento delle superfici forestali nelle zone del bacino del mediterraneo; REG. n.269/79, azione di rivalutazione forestale in alcune zone mediterranee della comunità, tramite la realizzazione di alcuni specifici obiettivi, tra i quali l'imboschimento e il ripristino di foreste degradate; REG.2088/85, consentiva miglioramenti delle superfici boscate e favoriva la forestazione con prevalente indirizzo protettivo specialmente nell'Italia centro-meridionale; REG.797/85 (set aside), incentivava l'imboschimento delle superfici agricole; REG.1760/87, ampliava il raggio dei possibili beneficiari degli incentivi per il rimboschimento di superfici agricole; REG.1094/88, concedeva un aiuto quinquennale per le superfici precedentemente condotte a seminativi lasciate o a set aside nudo o con copertura forestale; REG.2328/91, migliorava l'efficienza delle strutture agricole tramite la sottrazione al circuito produttivo di terreni destinati alle attività agrarie e zootecniche per destinarli ad altri usi, quali la forestazione. (da cui il regolamento 2080/92 prende direttamente spunto) (COLLETTI 1991; COLLETTI, 1998); REG.2078/92, prevedeva un regime di aiuti economici rivolti alla diffusione di tecniche di coltivazione compatibili con le esigenze di protezione e tutela ambientale e con la cura dello spazio rurale; REG. 2080/92, istituiva un regime comunitario di aiuti alle misure forestali nel settore agricolo proponendo, di fatto, una serie di incentivi per alleviare il deficit di risorse forestali e contenere la produzione agricola. Pertanto, le azioni previste dal regolamento hanno il compito di rafforzare le relazioni tra agricoltura e settore forestale e tra questo e l'industria del legno, di potenziare il sistema forestale, di incrementare i redditi degli imprenditori agricoli attraverso i prodotti della selvicoltura e di migliorare la situazione del mercato del lavoro in agricoltura.

In particolare, l'adozione di tale regolamento prevede il conseguimento sei seguenti obiettivi: l'utilizzazione alternativa delle superfici agricole mediante sottrazione al circuito produttivo di terreni precedentemente coltivati; lo sviluppo delle attività forestali ed il miglioramento delle risorse forestali; la corretta gestione dello spazio naturale in armonia con l'ambiente; la regimazione delle acque meteoriche e la prevenzione dei fenomeni erosivi; il contenimento del processo di spopolamento delle zone rurali attraverso l'incremento dei livelli di occupazione nel comparto forestale; il rispetto degli impegni per la salvaguardia degli ambienti naturali assunti dalla Comunità durante la Seconda Conferenza Mondiale sull'Ambiente e lo Sviluppo di Rio de Janeiro del 1992.

Per il raggiungimento dei predetti obiettivi il Reg. 2080 prevede compensi per i seguenti interventi:

1. Imboschimento delle superfici agricole, compresa la manutenzione degli stessi per cinque anni successivi a quello di impianto;
2. Miglioramento delle superfici boscate esistenti.

Per quel che riguarda le misure di imboschimento, vengono erogati premi per la realizzazione di impianti boschivi (utilizzando vari tipi di specie arboree), per l'effettuazione di cure colturali nei cinque anni successivi all'impianto di dette specie ed infine per l'integrazione della perdita di reddito per un periodo massimo di vent'anni (COLLETTI, 1998).

Gli interventi di rimboschimento devono essere realizzati previa un'accurata analisi delle condizioni climatiche e pedologiche. Pertanto nelle zone montane più sfavorevoli si attueranno impianti aventi scopo protettivo mentre in collina ed in pianura sarà possibile orientare l'intervento verso l'arboricoltura da legno con le latifoglie di pregio (noce e ciliegio) e la pioppicoltura, incrementando la produttività.

Le tipologie d'impianto previste comprendono: rimboschimenti a finalità multiple con latifoglie autoctone e pregiate, anche micorrizzate; rimboschimenti con conifere scelte in funzione delle caratteristiche della zona; rimboschimenti misti con conifere e latifoglie con almeno il 75% di latifoglie; rimboschimenti a ciclo breve (pioppi, ontano, robinia, douglasia, pino insignè, pino strobo).

Le principali operazioni effettuabili prima o durante la realizzazione dell'impianto, ammesse a beneficiare del regime di aiuti sono: decespugliamento, spietramento, aratura del terreno, lavorazioni localizzate (a gradoni, a strisce, a buche), tracciamento dei sestri d'impianto, sistemazione idraulica superficiale, messa a dimora delle piantine e recinzione della piantagione. Per quanto riguarda le cure colturali (risarcimenti, asportazione della vegetazione infestante, irrigazioni di soccorso, trattamenti antiparassitari), necessarie nella fase immediatamente successiva all'impianto e protratte per un periodo massimo di cinque anni, è previsto un compenso atto a coprirne i costi.

Gli interventi tesi al miglioramento delle superfici boschive dovranno invece essere condotti privilegiando i principi della selvicoltura naturalistica e mireranno all'esaltazione dell'efficienza dell'ecosistema bosco. Tali interventi dovranno favorire l'evoluzione delle formazioni boschive verso popolamenti più equilibrati come composizione e come struttura e perciò capaci di rispondere al meglio alle aspettative odierne dei proprietari e della società. Le azioni finanziabili del Reg.2080/92 sono: la conversione dei boschi cedui degradati e non produttivi in fustaie, privilegiando i cedui invecchiati; l'arricchimento di formazioni monospecifiche mediante l'inserimento di specie forestali di maggior interesse economico; la ricostituzione dei boschi rari e danneggiati da cause antropiche; gli sfolli e i diradamenti dei rimboschimenti abbandonati; sistemazione di fasce frangivento; il rinnovamento e il miglioramento delle sugherete; il ripristino e/o la costruzione di strade forestali; la creazione di fasce tagliafuoco e punti d'acqua.

Con le nuove normative REG.1257/99 e Agenda 2000, la Commissione propone di mantenere le misure di sostegno alla forestazione, previste dal Reg. 2080/92, di integrarle nel più ampio contesto di sviluppo rurale, tenendo conto delle considerazioni ambientali e promuovendo una gestione sostenibile delle foreste nelle zone svantaggiate, mantenendo la stabilità ecologica e ricostituendo quelle danneggiate.

1.4. IL GENERE JUGLANS

Il genere *Juglans* (*Jovis glans* = ghianda di Giove) comprende circa 60 specie diffuse longitudinalmente dal sud-ovest europeo fino all'estremo oriente asiatico, e nelle Americhe, latitudinalmente dal nord-est statunitense fino al sud-ovest americano. Per quanto riguarda gli aspetti botanici hanno tutte foglie composte, pennate, alterne. Sono piante monoiche con fiori unisessuali (maschili in amenti e femminili raggruppati solitamente in coppie), le noci sono commestibili e la corteccia si presenta generalmente liscia in età giovanile e fessurata in età adulta. Le specie d'interesse forestale come produttrici di legno più conosciute sono principalmente il noce comune (*Juglans regia*), il noce nero (*J. Nigra* L., gli ibridi interspecifici (*J. nigra* x *J. regia* e *J. regia* x *J. major* Torr.) e *J. Cinerea* L.. Vari autori hanno studiato tale genere, in particolari le chiavi per il riconoscimento specifico. Di seguito verranno riportati, in ordine cronologico, i più importanti. La chiave di Dode del 1909 ripartisce il genere *Juglans* in 3 sezioni: *Dioscaryon*, *Cardocaryon* e *Rhysocaryon*. Alla sezione *Dioscaryon* afferiscono le specie asiatiche *J. regia*, *J. Duclouxiana* Dode e *J. Kamaonia* Dode, alla sezione *Cardocaryon* appartengono i noci accomunati dalla forma cordiforme dei frutti e dalla corteccia di colore grigio, tra le più note *J. cordiformis* Wangenh e *J. cinerea*. La maggior parte di queste noci sono originarie della Cina, Giappone e Manciuria. Infine nella sezione *Rhysocaryon* sono comprese una ventina di specie tutte di origine americana che hanno in comune i frutti rugosi e corredo cromosomico $2n=32$, la specie più conosciuta è *J. nigra* (PEYRE E LANCOSME, 1941). Whitehead nel 1965 ha proposto una filogenesi per le *Juglandacee* basandosi sulla sequenza evuzionistica del polline che prevede per i noci più primitivi granelli pollinici più piccoli e/o dotati di pochi pori. Le specie più recenti come *J. regia* e *J. nigra*, hanno rispettivamente granelli pollinici di dimensioni superiori e con maggior numeri di pori (FUNK, 1970). Più recentemente (FUNK ET AL. 1979) ripartisce il genere *Juglans* in tre sezioni: 1) i noci neri (black walnut) *J. californica* Swats; *J. hindsii* J. R. Griffin and W. B. Critchfield; *J. major*; *J. Microcarpa* Berl.; *J. nigra*; 2) i noci grigi (butternut) *J. Cathayensis* Dode; *J. cinerea*; *J. cordiformis*; *J. cordiformis aillantifolia* (= *J. Sieboldiana* Maxim; *J. cordiformis aillantifolia* (= *J. sieboldiana*) Var. *cordiformia*; *J. Mandshurica* Maxim; 3) il noce bianco (persian/carpathians) *J. regia*.

1.5. IBRIDIZZAZIONE TRA SPECIE DI JUGLANS

Nella figura 1 si riportano le possibilità di ibridizzazione tra specie appartenenti al genere *Juglans*. Le specie appartenenti alla Sezione dei noci neri sono disposte sopra la linea tratteggiata, quelli appartenenti alla Sezione dei noci cinerini sotto la linea punteggiata. Compreso tra le due linee è *J. regia* appartenente alla Sezione dei noci bianchi (FUNK ET AL. 1979).

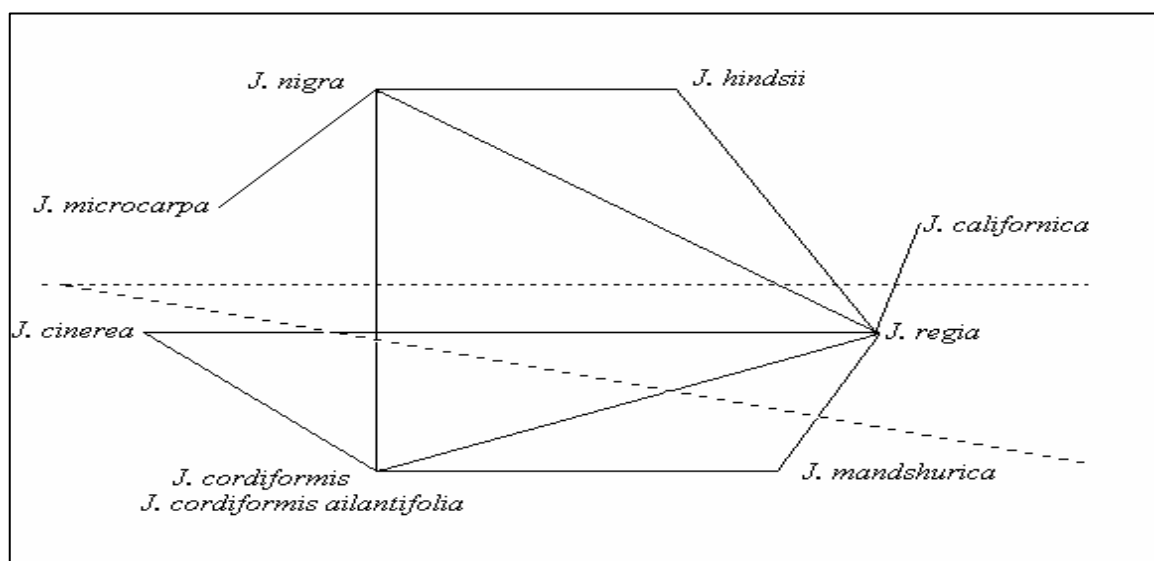


Fig.1.Ibridizzazione tra le specie appartenenti al genere *Juglans*, secondo lo schema proposto da Funk nel 1979.

In generale è possibile ottenere ibridi dalla combinazione dell'incrocio *J. nigra* fecondato da polline di *J. Regia* (ibrido NG23) L'inverso è ancora oggi più difficile (BERNHARD, 1981). Certi noci neri presentano una attitudine specifica all'ibridazione e si lasciano ibridare dal polline del noce comune. Le piante di noce nero che danno discendenza ibrida vengono denominate dai francesi "ibridifere" o "ibridogene" (GARAVEL, 1972). Si possono così selezionare dei noci ibridogeni che generano dei noci ibridi. Garavel nel 1972 riconosce nell'ibrido francese tra *J. nigra* x *J. regia* (NG23) il prototipo del "noce da legno" per le sue numerose caratteristiche. Questo, oltre a quelle riguardanti la qualità del legname, considerato dagli utilizzatori dotato di colorazione ottimale, è apprezzato soprattutto per il vigore. Tale super-vigore così evidente nei giovani soggetti sembra mantenersi anche oltre lo stato giovanile; l'ibrido

presenta comunque l'inconveniente di essere poco fecondo. L'autore segnala anche un particolare interesse dovuto alla rusticità (maggior resistenza al freddo e ai marciumi radicali). Nella maggior parte dei casi gli ibridi sono quindi dotati di buon vigore e sono superiori in accrescimento e forma rispetto ai parentali. In particolare, l'accrescimento superiore rende possibile una utilizzazione precoce delle piantagioni (turni intorno ai 40 anni) e un interessante impiego in frutticoltura come portainnesto di varietà a fruttificazione laterale molto produttive. Sembra siano dotati di maggiore plasticità, specialmente in condizioni ambientali mediocri. I soggetti più promettenti presentano sovente rami sottili, forte dominanza apicale che rende superflue le potature di formazione e fogliazione tardiva che preserva da danni da gelate tardive. Inoltre sono spesso poco fecondi e presentano una buona resistenza alle malattie, in particolare ad *Armillaria mellea* e virus CLRV, se confrontati con il noce comune al quale, per le qualità del legno appaiono più prossime.

Esiste anche un altro ibrido, costituito sempre dai francesi tra *J.regia* e *J. major* che viene denominato MJ 209, quest'ultimo insieme all'ibrido MG23 è stato oggetto delle ricerche in questa tesi di Dottorato.

1.6. PRINCIPALI SPECIE DI *JUGLANS* E GENERI AFFINI

Verrà di seguito riportata una breve descrizione delle principali specie e generi affini di *Juglans* che sono state oggetto della tesi di Dottorato verrà seguita una distinzione in funzione della località geografica di provenienza.

Per le immagini relative agli areali ed alle più salienti caratteristiche botaniche si rimanda alla tavola n°1 e 2 alla fine di questo capitolo.

1.6.1. NOCI DEL CENTRO AMERICA

Appartengono a questo gruppo *Juglans major*, *Juglans microcarpa* e *Carya illinoensis*.

***Juglans major* Torr.**

L'areale si estende da Sonora e Chihuahua, a Durango. Pianta di dimensioni piccole a grandi, talvolta con portamento policormico. Rami giovani da color chiaro a marrone scuro, finemente ghiandolosi e dotati di lenticelle prominenti. Foglie composte-pinnate con fogliolina terminale solitamente presente, rachide ghiandoloso-pubescente raramente glabro. Foglioline da 9-15 (raramente 17) opposte o alternate, subsessili o con piccolo picciolo, da oblunghe-lanceolate a ovali, le più ampie di 2-3,4 cm di larghezza (raramente 1,5-1,9 cm) e 6-11,5 (raramente 13) di lunghezza, acuminate all'apice e serrate ai margini. Amenti maschili lunghi 7-17 cm, sottili, con brattee fiorali piccole; stami da 30 a 50; fiore pistillato usualmente solitario. Frutto globoso o piuttosto ovale, mallo sottile poco verrucoso, di 2,3-3 (raramente 1,9) cm di diametro.

Manning nel 1957 divide *J. major* in due razze principali: una settentrionale, *J. major* var. *stellata*, con foglioline piuttosto tomentose e una meridionale, *J. major* var. *glabrata*, con foglie glabre e ampie e frutti più grandi.

Il legno non trova particolari impieghi per le sue scarse caratteristiche tecnologiche.

***Juglans microcarpa* Berl.**

Occupava un areale che si estende da Nuovo Leon a Coahuila. Si presenta come una piccola pianta a portamento per lo più arbustivo, con abbondante ramosità e chioma espansa. Rami rosso-arancio, finemente lenticellati, foglie tendenti al piccolo, composto-pinnate, foglioline 19-23 (raramente 17) opposte alterne, subsessili, lanceolate di 1-1,5 cm di larghezza (1,9 in var. *stewartii*) e 5-8 cm di lunghezza,

arrotondate alla base, serrate, raramente glabre. Amenti staminali lunghi 7-11 cm, molto sottili con brattee fiorali piccole, bianco-tomentose alla base dei fiori; stami da 20 a 30; fiori pistillati da solitari a pochi. Frutto globoso o subgloboso, pubescente di 1,2-2,1 cm di diametro. Tra le specie del genere *Juglans*, è sicuramente quella a dimensioni più contenute e con frutti piccoli. Per queste caratteristiche unitamente alle foglioline strette e ai frutti di piccole dimensioni è facilmente distinguibile dalle altre specie di *Juglans* del Messico.

Anche questa specie non risulta avere buone caratteristiche tecnologiche del legno, pertanto non trova particolari impieghi.

***Carya illinoensis* K. Koch**

L'areale primario occupa il bacino del Mississippi, basso Ohio, basso Missouri, basso Red- Rivers, in terreni alluvionali, l'area di origine si estende però dall'Iowa (USA) al sud del Messico.

Gli alberi sono longevi (200-300 anni), la forma dei fusti è abbastanza regolare e la chioma è inserita piuttosto in alto; le dimensioni possono arrivare ai 30-40 m con diametro a petto d'uomo di 60-90 cm e più. La specie presenta una forte dominanza apicale. La gemma terminale di solito evolve a frutto, mentre quelle laterali, in funzione del grado di fruttificazione laterale della varietà, evolvono in senso vegetativo o a frutto (GELLINI E GROSSONI, 1997).

Le gemme ascellari di questa pianta sono perulate, in gruppi da 2 a 5 a seconda della varietà, le foglie alterne, imparipennate, composte da 11 a 15 foglioline.

La specie è monoica, quindi i fiori maschili e femminili sono separati, ma sulla stessa pianta; gli amenti maschili si presentano in gruppi di 3 ed i fiori femminili in racemi terminali di 2-10 elementi. Esiste, nella maggioranza delle varietà, una forte dicogamia, la fioritura maschile e femminile, che comunque ha inizio nei primi giorni di aprile, ed è sfalsata nel tempo, di conseguenza è necessaria l'impollinazione incrociata, nonostante la specie sia autocompatibile. La disseminazione del polline è anemofila.

Il frutto ha mallo deiscete che si apre in quattro valve; la drupa è indeiscete, a buccia liscia ed ha grandi qualità organolettiche: presenta un contenuto di olio superiore al 75%, con una percentuale di acidi grassi insaturi del 93% circa, la quale causa una certa facilità all'irrancimento.

Per quanto riguarda il legno, le sue caratteristiche e gli utilizzi si possono riassumere come segue: colore largo alburno biancastro, screziato a volte di bruniccio, differenziato dal durame bruno-chiaro o bruno-rossastro; *tessitura* da media a grossolana; *fibratura* diritta. Gli impieghi più ricorrenti sono: attrezzi sportivi, manichi, pezzi torniti, lavori da carradore, liste da pavimento, mobili (sia massicci che impiallacciati), legna da ardere, ottimo per cucinare alla brace.

1.6.2. NOCI DEL NORD AMERICA

Appartengono a questo gruppo *Juglans cinerea*, *Juglans hindsii* e *Juglans nigra*.

***Juglans cinerea* L.**

Juglans cinerea è una pianta tipica del New Brunswick, Georgia, Dakota e Arkansas (USA), essa può raggiungere grandi dimensioni (occasionalmente alta 30 m), si presenta con una corteccia grigia, giovani rametti villosi e ghiandolosi. Foglioline da 11 a 19, oblungo-lanceolate, acuminate, serrate. Frutti portati in racemi con superficie esterna glutinosa e viscida, noce oblunga e ovoidale con 4 nervature molto pronunciate e altre 4 meno evidenti. Le noci presentano guscio molto duro difficilmente apribile in due metà. La noce tagliata trasversalmente è materia prima per la fabbricazione di gioielli di artigianato popolare. Particolarmente resistente al freddo (GARAVEL, 1960).

Il legno di *J. cinerea* è di tessitura analoga a quella del noce nero ma è molto più chiaro e leggero. Come il noce nero è di facile lavorazione e trova pertanto impieghi simili soprattutto per la costruzione di mobili.

***Juglans hindsii* J. R. Griffin and W. B. Critchfield**

J. hindsii (= *J. californica* var. *hindsii*). È una pianta tipica del centro della California. Impiegata come pianta ornamentale in alberature stradali o come portainnesto per varietà di noce comune da frutto. Presenta una chioma arrotondata, alta 9-12 m con fusto slanciato e rametti abbondantemente pubescenti e piccioli villosi. Le foglioline si presentano in numero di 15-19 (talvolta 19), ovato-lanceolate a lanceolate, acuminate, arrotondate alla base ed il frutto abbastanza globoso. La noce è di buona qualità ma piccola. La varietà "quercina" (*J. californica quercina*; *J. quercifolia*) è una particolare forma con 1-5 foglioline (più spesso 3) a volte sessili, ovate ed oblunghie, ottuse, serrate.

Il legno di *J. hindsii* presenta durame bruno con variegature a strisce e macchie varie più cupe rispetto al noce nero con analoghe caratteristiche e usi identici. In genere viene impiegato nelle produzioni artistiche come statue e oggetti intagliati, oggetti da regalo, cruscotti e pomelli d'auto (PETILLO, 1993).

***Juglans nigra* L.**

Lo *Juglans nigra* ha diversi nomi comuni: "noyer noir", "nogal negro", "black walnut", "Schwarze Walnuss", "Nucul negru", "Fekete diò", "Oreh cerni". Si presenta come un albero di prima grandezza, il noce nero può raggiungere e superare i 40 m di altezza e 1-2 m di diametro. E' di rapida crescita (almeno in fase giovanile) e longevo. Raggiunge la maturazione a 150 anni ma alcuni esemplari possono vivere fino a 250 anni (BRINKMAN, 1957; GELLINI E GROSSONI, 1997).

Allevato in bosco denso, il fusto assume forma ancora più diritta e cilindrica mentre la chioma si fa raccolta e stretta conferendo all'insieme grande importanza selvicolturale sicché risulta cospicua la produzione di legname da lavoro rispetto alla massa totale del tronco (MERENDI, 1956).

La corteccia è sottile e reticolata in gioventù, poi spessa e profondamente solcata in età avanzata. Di colore nerastra e bruno-rossastra in sezione. Le foglie sono caduche, composte, lunghe da 30 a 60 cm, imparipennate, anche se talvolta la fogliolina terminale è mancante soprattutto in soggetti anziani, con (5) 7-11 (12) paia di foglioline. La lunghezza delle foglioline è di 7-10 cm e la larghezza di 2-3 cm, opposte, ovato-lanceolate, serrate, non infrequentemente asimmetriche alla base, a punta sfuggente, subsessili, sottili, color verde-giallo lucido, glabre superiormente e munite di una morbida pubescenza piuttosto rada lungo le nervature della pagina inferiore (MERENDI, 1956; GARAVEL, 1960).

I fiori sono monoici, quelli maschili riuniti in amenti flessuosi e penduli, lunghi (5) 8-13 (15) cm, singoli o abbinati sui rami dell'anno precedente, con 20-30 stami, antere e polline gialli, quelli femminili invece sono riuniti in gruppi da 2 a 5, verdastri, si sviluppano all'estremità dei rami che portano i fiori maschili, con ovario infero e stigmi bianchi, divaricati. Dei fiori femminili solo 1 o 2, più raramente 3, per gruppo si evolvono a frutto (GELLINI E GROSSONI, 1997). Il fiore del noce nero è notevolmente suscettibile alle basse temperature e ne risulta danneggiato -2,2°C (TRYON E TRUE,

1964). Climi molto secchi possono ridurre i giorni di ricettività mentre condizioni di freddo umido possono prolungarla (MASTERS, 1974).

Secondo Garavel i frutti sono solitamente riuniti a 2-4, di forma variabile per lo più globosa o leggermente piriforme, del diametro di 3-5 cm o di 4-6 cm con epicarpo (mallo) prima verde-giallo piuttosto chiaro, poi bruno-nerastro, verrucoso, non facilmente separabile dall'endocarpo (noce), dallo spessore di circa 10 mm. I frutti persistono sull'albero generalmente più a lungo delle foglie. La noce, essa pure di forma varia da subsferica a piriforme, è provvista di guscio nero piuttosto spesso con numerose creste rugose che protegge il seme (gheriglio) 4-loculare, strettamente concamerato, commestibile e oleoso. La noce tagliata trasversalmente è materia prima per la fabbricazione di gioielli di artigianato popolare (fig. 19).

La fruttificazione è annuale e piuttosto abbondante (MERENDI, 1956). La maggior parte dei noci neri produce semi in annate alterne; solo pochi individui fanno eccezione.

Molte piante in foresta, con tronchi ampi e chiome limitate possono produrre quantitativi molto piccoli o addirittura nulli di semi anche per alcuni anni consecutivi. Al contrario, piante cresciute in spazi aperti producono regolarmente da alcune centinaia a 2-3 mila semi/anno/pianta con un massimo fino ad ora riportato di 6.000 semi per una pianta nel Tennessee di 71 cm di diametro. I frutti raggiungono la grandezza definitiva verso la fine di agosto, la maturazione a settembre-ottobre (FOWELLS, 1965).

La grandezza dei frutti varia considerevolmente ed è in funzione del vigore della pianta, della natura del suolo e del clima (WRIGHT, 1954). Pianta di noce nero cresciute in spazi aperti possono fruttificare in età giovanile (2-3 anni) soprattutto nella parte meridionale dell'areale mentre la maggior parte raggiunge una produzione adeguata non prima di 10-12 anni. Pianta innestate generalmente fruttificano 3-4 anni dopo l'impianto. Le migliori produzioni si raggiungono a 30 anni e possono continuare anche fino a 100 anni (ROGER, 1949; FUNK, 1970; RINK, 1985).

Il legno del noce nero (SKOLMEN, 1968) è duro e pesante, molto stabile dopo la stagionatura, immarcescibile nell'acqua, di facile lavorazione sia alla sega sia alla trancia; ha un alburno bianco-giallognolo, ben differenziato dal durame che è di colore bruno-porporino tendente al violaceo e variegato. Frequenti sono le pigmentazioni scure a strisce irregolari e le marezzature. La tessitura è da media a grossolana e la

fibratura da diritta a varia o molto irregolare nelle radici. Il legno di *J. nigra* è anatomicamente quasi uguale a quello del noce comune, dal quale si distingue per essere più scuro fino a intensità nere violacee; ha pressappoco le stesse caratteristiche fisiche e meccaniche di quello di *J. regia* anche se viene considerato più duraturo e più resistente alle lavorazioni; trova i medesimi impieghi per i lavori fini di mobilia, calci di fucile, casse armoniche, arredamenti, oggetti fini di lusso, pannelli, compensati, impiallaccature, liste da pavimento, costruzioni navali e aeronautiche ecc. (SKOLMEN, 1968) trova delle notevoli similitudini tra il legno di *J. nigra* e quello di *Acacia koa*, una latifolia nativa dell'Hawaii, sia per le proprietà tecnologiche sia per i possibili usi. Il legno del noce nero attualmente spunta prezzi inferiori rispetto al noce comune ma gli accrescimenti superiori compensano largamente questo inconveniente che è attribuibile alla minore buona conoscenza dell'albero da parte degli utilizzatori.

In realtà il legno di noce nero è molto conosciuto sui mercati internazionali, anche europei, per le forti importazioni che si fanno dagli Stati Uniti dove peraltro le intense utilizzazioni fatte sin dal secolo scorso e la conseguente diminuzione delle disponibilità naturali lo hanno reso più costoso. E' questo uno dei motivi per cui, negli Stati Uniti, gli utilizzatori di legname preferiscono al noce nero il pecan (*Carya illinoensis*).

1.6.3. NOCI INDOEUROPEI

Vengono annoverati sotto questo gruppo, oltre *Juglans regia* e *Juglans sieboldiana* e due specie appartenenti ad un genere affine a *Juglans*, *Pterocarya*, e precisamente *P. fraxinifolia* e *P. stenoptera*.

***Juglans regia* L. (vedi poi)**

***Juglans sieboldiana* Maxim.**

J. sieboldiana (= *J. ailantifolia*). Specie di origine asiatica a chioma espansa, alta 17 metri, rametti pubescenti, foglioline da 11 a 17 da ovali a oblunghi-ovali. Frutti in lunghi racemi qualche volta 20, da globosi a ovato-oblunghi con mallo pubescente e vischioso, noce più o meno globosa.

Visto le sue scarse caratteristiche tecnologiche il legno non trova particolari impieghi.

***Pterocarya fraxinifolia* Spach.**

La *Pterocarya fraxinifolia* è un albero originario del Caucaso, con areale che si estende dall'Iran del nord all'Ucraina, fino al Giappone. Più comune in montagna, ma può essere rinvenuto anche in pianura, è la specie asiatica più diffusa nei nostri paesi. Considerata rustica con fruttificazioni abbondanti e regolari nei climi miti. Ama la luce, preferisce suoli freschi e l'accrescimento è abbastanza rapido. Piantata spesso come ornamento nei giardini, ha un legno piuttosto leggero e viene utilizzato per ebanisteria e lavori da tornio (KRUSMANN, 1984-1986). L'albero è alto 15-20 m, il tronco è spesso diviso sin dalla base e la corteccia è grigio scura e fessurata; i giovani rami sono precocemente glabri.

Le gemme sono per lo più prive di perule (nude), color bruno rossastro, le laterali peduncolate. Le foglie, non aromatiche, sono lunghe 20-40 cm; il rachide, cilindrico e glabro, sostiene 11-21 foglioline lunghe 8-12 cm, ottuse, dentellate al margine e glabre, tranne ciuffi di peli all'ascella delle nervature nella pagina inferiore. I fiori femminili sono in amenti molto lunghi (20-45 cm) (fig. 26). I frutti hanno diametro di 1.5-2 cm, sono asimmetrici e dotati di due ali semicircolari.

Visto le sue scarse caratteristiche tecnologiche il legno non trova particolari impieghi.

***Pterocarya stenoptera* C. DC.**

La *Pterocarya stenoptera* è originaria della Cina. Tale albero è alto mediamente 15-30 m e la larghezza della chioma raggiunge i 12-21 m. Si propaga per seme e per polloni. Preferisce i terreni umidi ma è abbastanza tollerante alla siccità. Sopporta gli inverni rigidi ma è suscettibile ai freddi tardivi. Le radici si espandono in superficie. I giovani germogli sono densi, bruno- giallognoli, pubescenti o quasi glabri. Le foglie, lunghe 20-40 cm, pennate, con rachide alato ed ali a margine normalmente serrato, comprendono 11-21 foglioline con quella terminale spesso assente. Esse sono dentate, oblunghie e le venature della pagina inferiore sono leggermente pubescenti. Le infiorescenze maschili e femminili sono separate. I frutti, in gruppi lunghi 20-30 cm, hanno ali erette ed oblunghie. La ramificazione è pendente.

Visto le sue scarse caratteristiche tecnologiche il legno non trova particolari impieghi.

1.7. JUGLANS REGIA: NOCE NOSTRANO DA LEGNO

Il noce comune, *Juglans regia*, è una specie con origini molto antiche: specie affini al noce furono già trovate in terreni dell'epoca quaternaria o antropozoica.

Molti studiosi ritengono che sia una specie originaria della Cina o del massiccio dell'Himalaya, di qui passò in India, Persia, Grecia e Italia, donde si diffuse, successivamente, negli altri paesi europei.

Reintrodotta in epoca remotissima, il noce da legno è presente in gran parte dell'Europa e del territorio italiano e la sua diffusione è dovuta, per larga parte, a cause antropiche. Si tratta, dunque, di un'entità quanto meno eurasiatica scomparsa dall'Europa centro-occidentale al termine dell'era glaciale. Attualmente è diffuso allo stato spontaneo nella Penisola Balcanica, in Asia minore, nella regione himalayana e in estremo oriente (BANFI ET AL., 1996).

Reintrodotta in epoca remotissima, il noce è presente in gran parte dell'Europa e del territorio italiano e la sua diffusione è dovuta, per larga parte, a cause antropiche.

L'habitat della specie va dalla zona climatico-forestale del *Lauretum* sino alla zona del *Castanetum* (FORTE, 1993).

Verranno di seguito riportati, analiticamente, tutti gli aspetti più importanti relativi alla botanica ed alla coltivazione di questa pianta.

1.7.1. ASPETTI BOTANICI

Il noce comune è una delle specie legnose più importanti sia per i frutti che per il legname. E' un albero che può raggiungere i 25-30 metri di altezza e diametri fino a circa 1 metro. E' una specie relativamente longeva, potendo arrivare a 300-400 anni (GELLINI E GROSSONI, 1997) e presenta un fusto diritto, cilindrico, con una chioma ampia e arrotondata. La corteccia rimane per lungo tempo liscia e di colore bianco argenteo opaco, poi si fessura longitudinalmente. I rami dell'anno sono grossi, glabri, bruno-lucenti, con grandi cicatrici fogliari trilobate; la gemma apicale, molto più grande delle laterali, è globosa e coperta esternamente da 2-3 perule; le gemme laterali sono piccole e alterne.

Le foglie sono alterne, caduche, composte, lunghe fino a 35 cm, imparipennate, con 5-9 foglioline ellittiche, glabre, a margine intero, coriacee a maturità, di colore verde chiaro e aromatiche; la fogliolina apicale è molto più grande delle laterali.

Specie monoica con fiori unisessuali; quelli maschili compaiono sui rametti dell'anno precedente, prima o contemporaneamente all'emissione delle foglie; piccoli e numerosi (100-160), sono portati in amenti solitari penduli lunghi 5-15 cm, sono verdi, con il calice formato dai 4 sepali concresciuti con due brattee e hanno numerosi stami gialli (6-30); quelli femminili compaiono al momento dell'antesi, sono solitari (più comunemente in coppie) terminali sul ramo dell'anno, formati da un ovario e da uno stigma bilobato sessile. La fioritura avviene ad aprile-maggio a seconda delle cultivar e delle condizioni ambientali.

Il frutto che matura nell'anno (ottobre), a distanza di 19-20 settimane dalla fioritura, è una drupa ovoide lunga 2,5-3 cm, con epicarpo (mallo) carnoso, verde, ricco di tannino che si distacca a maturità; l'endocarpo legnoso (noce) è formato da due valve rugose non deiscenti a maturità; il seme (gheriglio) cerebriforme, diviso in 2-4 lobi molto solcati, è costituito da due grossi cotiledoni, carnosi, oleosi, coperti da una sottile pellicola rosso bruna (BOSCO *ET AL.*, 1997).

L'embrione è dormiente e il seme richiede un periodo di chilling di 1-5 mesi per germinare. La germinazione è ipogea (GELLINI E GROSSONI, 1997).

Le foglie primarie della plantula sono alterne e imparipennate, le prime sono composte da 5 foglioline sessili e glabre di cui quella apicale è più grande; le foglioline hanno il margine ondulato-dentato e sono profumate; le successive hanno 7 foglioline; l'epicotile è glabro (GELLINI E GROSSONI, 1997).

L'apparato radicale è inizialmente un grosso fittone sul quale successivamente prendono il sopravvento le radici laterali; si espande notevolmente pur rimanendo piuttosto superficiale (80-90 cm).

Il nocce comune si propaga per seme; dopo pochi anni la pianta perde la capacità di rinnovarsi per pollone (GELLINI E GROSSONI, 1997).

1.7.2. ESIGENZE AMBIENTALI

Grazie alla prelibatezza del suo frutto e alle qualità tecnologiche del suo legno, il nocce è stato ampiamente coltivato, anche in ambienti estremamente diversi tra loro. Di seguito verranno riportati, analiticamente, tutti i parametri, podologici ed ambientali per una corretta coltivazione di questa specie.

CLIMA: Il noce presenta una grande plasticità nei confronti del clima, ciò può anche essere connesso ad una differenziazione in diversi ecotipi con diverse possibilità adattative (BOSCO *ET AL.*, 1997).

In generale, il noce comune vegeta in ambienti con temperatura media annua compresa tra 10 e 17°C. Si tratta di una specie piuttosto esigente di calore durante la stagione vegetativa: sono necessari almeno 5 mesi con temperatura media superiore ai 10°C. La resistenza alle basse temperature varia in rapporto alle diverse entità sottospecifiche, alla fase vegetativa e all'età: da giovane il noce è sensibile alle gelate tardive anche di modesta intensità (-3°C), mentre da adulto, in fase di riposo vegetativo, possono essere sopportate anche temperature prossime ai -30°C. Le gelate primaverili costituiscono un grave problema, perché il noce è caratterizzato dall'avere un precoce risveglio dell'attività vegetativa. Anche le gelate precoci possono essere molto dannose in quanto i germogli dell'ultimo anno, scarsamente lignificati, in vegetazione fino al tardo autunno, sono particolarmente suscettibili ai danni da freddo.

Per quanto riguarda il fabbisogno idrico, il noce necessita di un quantitativo d'acqua piuttosto elevato: almeno 700-800 mm annui. Una certa aridità può essere tollerata a patto che l'apporto di acqua non scenda al di sotto dei 100-150 mm durante il periodo estivo. Una siccità particolarmente prolungata nel periodo primaverile - estivo può provocare una scarsa pezzatura dei frutti e una defogliazione anticipata.

Da quanto esposto emerge chiaramente che, qualora si intenda procedere all'impianto di noceti specializzati per la produzione di legno, bisogna evitare zone di fondo valle per ridurre il rischio dei danni da freddo precoce o tardivo. La coltivazione del noce da legno deve essere concentrata nell'ottimo climatico poiché è solo in queste condizioni che può essere esaltata la rapidità di accrescimento. Inoltre poiché non possono essere tollerate malformazioni del fusto causate da danni da gelate, viene raccomandata l'esclusione della fascia montana e comunque delle aree collocate al di sopra dei 700 m s.l.m.

SUOLO: Per quanto riguarda il terreno, il noce può, senza dubbio, essere definito come specie esigente per tutte le condizioni ad esso inerenti (BOSCO *ET AL.*, 1997).

Per quanto riguarda la tessitura i suoli più adatti al noce sono quelli definiti franchi. Si tratta di suoli aventi un contenuto di argilla inferiore al 25%, dal 30 al 50 % di limo e dal 30 al 50% di sabbia. La possibilità di svincolarsi o di attenersi strettamente ai

suddetti limiti dipende molto dalle altre caratteristiche ambientali, con particolare riferimento alla piovosità. Tanto maggiori sono le precipitazioni, tanto meno un elevato contenuto di argilla può essere tollerato dal noce. Per contro i suoli marcatamente sabbiosi o ad elevata percentuale di sabbia grossolana, pur non avendo problemi di aerazione, sono caratterizzati dall'avere un drenaggio troppo rapido ed uno scarso contenuto in elementi nutritivi. Se l'insufficiente potere di trattenuta dell'acqua non è compensato da un clima piuttosto piovoso o da frequenti irrigazioni, l'accrescimento del noce viene fortemente compromesso. Le potenzialità produttive di un suolo sabbioso possono essere aumentate dalla presenza di una vegetazione di accompagnamento che arricchisca il terreno di humus e/o ricorrendo a concimazioni organiche (BOSCO ET AL., 1997). Il noce è una specie con apparato radicale fortemente fittonante, tanto che la profondità raggiunta dalle radici è sovente limitata da caratteristiche del suolo, come l'impenetrabilità meccanica, la difficoltà per i movimenti dell'acqua e l'insufficiente grado di aerazione. In condizioni ideali le radici si possono spingere fino alla profondità di 3 m circa. Nella coltivazione si deve ritenere indispensabile una profondità del suolo minima pari a 0.8-1.0 m.

Generalizzando si può affermare che in montagna la scarsa profondità del suolo può essere di impedimento alla coltura; in terreni di collina, su pendici piuttosto acclivi, il limite esplorabile dalle radici è definito dalla presenza della roccia madre; in suoli di pianura destinati da lungo tempo all'agricoltura il limite è costituito dalla presenza di un orizzonte cementato, dovuto anche al succedersi di innumerevoli lavorazioni eseguite alla medesima profondità. Questo non costituisce in genere un ostacolo insormontabile, in quanto, con opportune lavorazioni profonde, può essere notevolmente aumentata la porzione di terreno esplorabile dalle radici. Se tale strato è costituito da una notevole percentuale di argilla, esso può, in periodi piovosi, causare indesiderati ristagni d'acqua con conseguenti fenomeni di marcescenza delle radici dovuti a *Armillaria mellea* (Vahl.) Quèl. e *Phytophthora cactorum* L.C. Schroet (BELISARIO ET AL., 1997).

Un altro aspetto di notevole importanza è rappresentato dalla profondità della falda, l'eccesso di acqua o addirittura la sommersione delle radici provoca, come già accennato, notevoli problemi all'apparato ipogeo, tuttavia occorre tenere presente che innalzamenti della falda durante la fase di riposo vegetativo, possono essere tollerati in quanto determinano danneggiamenti nettamente inferiori rispetto a ciò che si

osserverebbe se il fenomeno si verificasse alla ripresa vegetativa. L'entità del danno dipende dalla durata del periodo di sommersione e, inoltre, un aspetto non trascurabile è rappresentato dal fatto che falde che presentano un certo scorrimento dell'acqua sono molto meno dannose di falde stagnanti. In tali situazioni svantaggiate è necessario intervenire con opere di drenaggio. Notevoli miglioramenti possono essere raggiunti realizzando una semplice affossatura aperta, senza ricorrere a costosi metodi di drenaggio che prevedono l'impiego di tubature sotterranee (BOSCO *ET AL.*, 1997).

Il pH deve essere compreso fra 6 e 7,5. I terreni acidi (pH 4,5-5) risultano poco adatti in quanto determinano varie anomalie, come ad esempio il guscio dei frutti troppo tenero e valve insufficientemente saldate. In condizioni di elevata alcalinità (pH 7,8-9) sono stati frequentemente rilevati fenomeni di clorosi ferrica (ANSELMi, 2001). La percentuale di calcare attivo non deve superare il 5-6%.

Il noce è una specie molto esigente per quanto riguarda la fertilità del suolo. La quasi costante carenza di elementi nutritivi, soprattutto per quanto riguarda l'azoto, non costituisce un grave impedimento alla coltivazione, in quanto il noce dimostra di reagire positivamente alle concimazioni (BOSCO *ET AL.*, 1997).

1.7.3. UTILIZZAZIONE DEL LEGNO

L'utilizzazione finale delle piante di noce prevede due differenti destinazioni: la tranciatura, operazione industriale che permette di ricavare fogli di legno (comunemente detti impiallaccature), di ridotto spessore, utilizzati per "nobilitare" manufatti realizzati con legni meno pregiati, o la segagione mediante la quale vengono prodotti elementi in legno massiccio impiegati in falegnameria o in ebanisteria. La scelta dell'una o dell'altra destinazione è legata alle dimensioni della pianta, alla conformazione del fusto, alla presenza di difetti. Nel caso di materiale destinato alla tranciatura, i tronchi devono essere diritti, non presentare difetti rilevanti, avere una lunghezza superiore a 2,5 m e diametri possibilmente superiori a 35-40 cm. I tronchi che presentano difetti rilevanti e che non possono essere quindi avviati alla tranciatura, come pure i grossi rami, vengono destinati alla segagione, generalmente effettuata fino ad un diametro minimo di 20 cm.

Il legno di noce è uno dei più apprezzati legnami del mondo per le sue caratteristiche fisiche, meccaniche ed estetiche; omogeneo, di media densità, di facile lavorazione

anche da stagionato, si può portare ad ottima finitura; tenace e resistente allo spacco è insuperabile per la costruzione di calci di fucile. È molto adatto ad essere piegato, stagiona senza presentare grossi inconvenienti e una volta in opera «muove» poco. Queste qualità, unite al suo aspetto estetico, lo hanno reso il legname preferito per la costruzione di mobili di classe per rivestimenti e per arredamento in generale.

Attualmente, pur essendo costantemente impiegato in realizzazioni di pregio, esistono usi e mercati differenziati in funzione del colore e dei disegni che il legno presenta. A livello commerciale, infatti, si è soliti separare il noce chiaro dal noce con tonalità più scure e ricco di venature. Il secondo è particolarmente richiesto a livello artigianale e dalla piccola industria; mentre il primo è apprezzato e ricercato dalla media e grande industria, la quale è avvantaggiata dalla possibilità di lavorare materiale meno disomogeneo, almeno dal punto di vista del colore.

Numerose esperienze mostrano che il colore del legno è influenzato, oltre che dalla stazione di crescita, anche dall'età delle piante: le colorazioni chiare sono generalmente abbinate a individui giovani. Ciò dovrebbe essere tenuto in considerazione al momento di decidere sulla destinazione del materiale ritraibile da impianti realizzati per la produzione legnosa, magari con cicli brevi intorno ai trenta anni.

In linea generale, i migliori risultati possono essere raggiunti riducendo l'incidenza dei difetti attraverso il miglioramento genetico, eliminando i danni provocati da stress biotici ed abiotici, applicando tecniche di coltivazione in grado di stimolare nelle piante una crescita equilibrata e costante per tutto il periodo della coltivazione (BERTI, 1997).

1.7.4. POTENZIALITÀ PRODUTTIVE

Riguardo ai tempi di ottenimento degli assortimenti commercializzabili, vari autori hanno riscontrato una diffusa carenza di conoscenze degli operatori (GIANNINI E MERCURIO, 1997; NATALE, 1993; BERTOLOTTO *ET AL*, 1996; CORONA E LUCIANI, 1997). In effetti anche in letteratura il quadro informativo sulle reali capacità produttive delle piantagioni specializzate di noce da legno è relativamente poco esauriente, a causa della scarsa disponibilità di sperimentazioni dendroauxonometriche ad hoc (CORONA *ET AL*, 2000). In Italia le informazioni riguardo la produzione legnosa di piantagioni di noce comune sono molto scarse. Esse derivano per lo più da valutazioni produttive, che sono il risultato di estrapolazioni di stime relative a singoli alberi e riferite ad ipotetici

popolamenti, la cui densità è determinata con il sesto di impianto. Le osservazioni dirette della massa legnosa presente nel tempo in piantagioni sufficientemente estese sono ridottissime. In alcuni impianti dell'Italia centrale realizzati con densità comprese tra 200 e 330 alberi per ettaro, alcuni autori (MERCURIO E TABACCHI, 1997; BERTI, 1997) hanno stimato a 20 anni volumi ad ettaro di 40-50 m³, per tronchi da lavoro con diametro medio compreso tra 19 e 24 cm.

Per quanto riguarda la lunghezza del ciclo colturale da adottare per il noce comune le opinioni sono contrastanti. Fino a circa vent'anni fa era sostenuta la tesi di turni molto lunghi (60-90 anni), mentre indagini più recenti, che tengono conto delle azioni concomitanti dovute alla crescita delle piante in piccoli impianti e del beneficio dell' "effetto coltivazione", fanno intravedere un abbassamento dei cicli colturali a 40-50 anni. Corona (1997) indica in 55-60 anni la lunghezza del ciclo produttivo a cui approssimativamente corrisponde la culminazione dell'incremento medio annuo di massa totale.

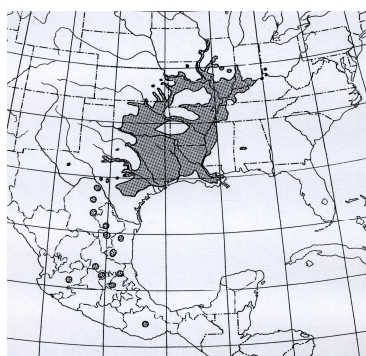
Sarebbe utile, ai fini della pianificazione e progettazione di piantagioni forestali, disporre di modelli di stima della capacità produttiva delle piantagioni in funzione dei caratteri stazionali (CORONA ET AL, 1998).

Oltre all'aspetto quantitativo occorre tener presente anche gli aspetti qualitativi: il valore degli assortimenti varia in maniera considerevole indipendentemente dalle dimensioni dei fusti. I principali criteri di valutazione dei tronchi sono: fusto lungo almeno 3 m, diametro maggiore di 30 cm, dritto, di colore chiaro; non devono essere presenti i seguenti difetti: nodi, danni al fusto, fibra torta, attacchi parassitari, rami laterali e innesti.

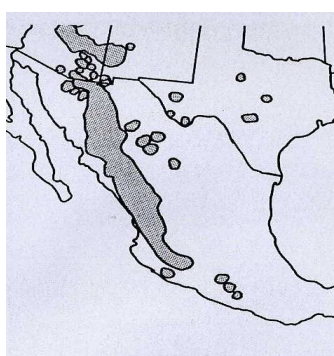
TAVOLA 1. AREALI DI ALCUNE SPECIE DI *JUGLANS*, *CARYA* E *PTEROCARYA*



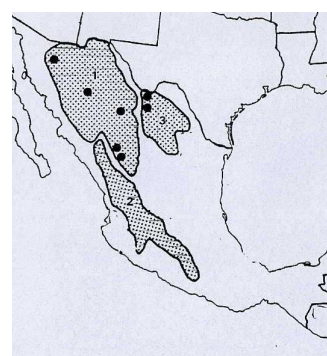
Areale di distribuzione del genere *Juglans*



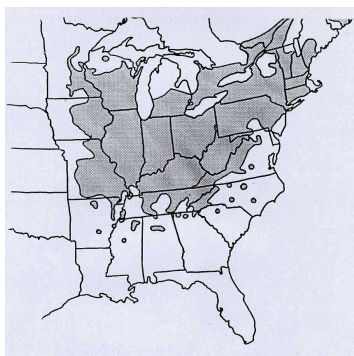
Carya illinoensis



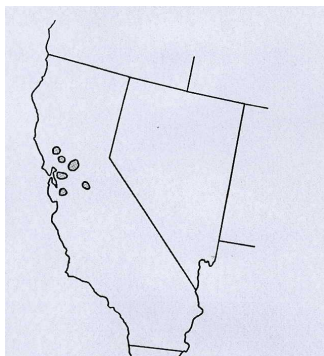
Juglans major



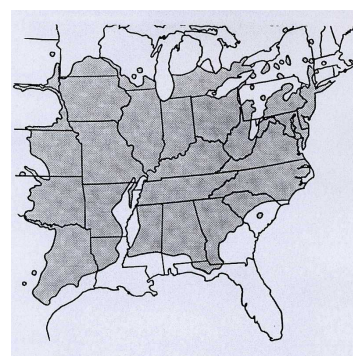
Juglans microcarpa



Juglans cinerea



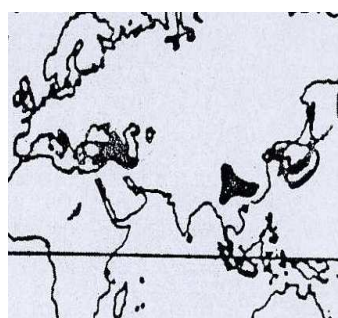
Juglans hindsii



Juglans nigra



Juglans seboldiana

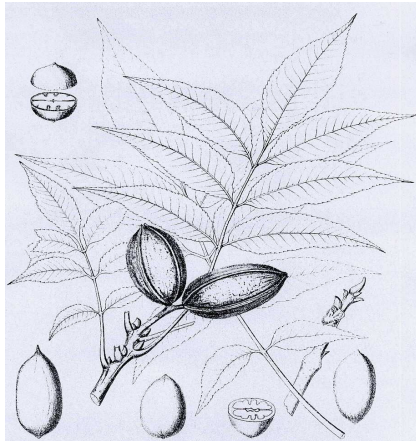


Genere *Pterocarya*



Juglans regia

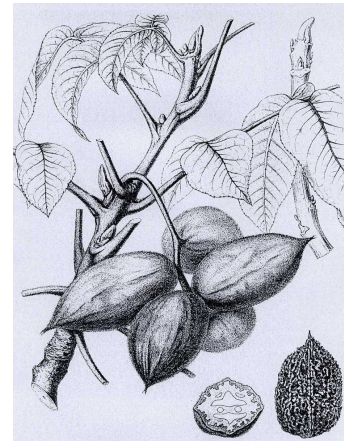
**TAVOLA 2. SALIENTI CARATTERI BOTANICI DI ALCUNE SPECIE DI
JUGLANS, CARYA E PTEROCARYA**



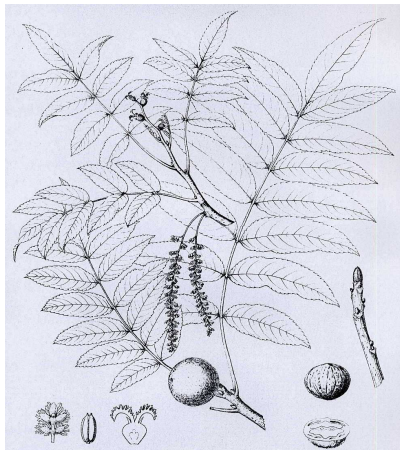
Carya illinoensis



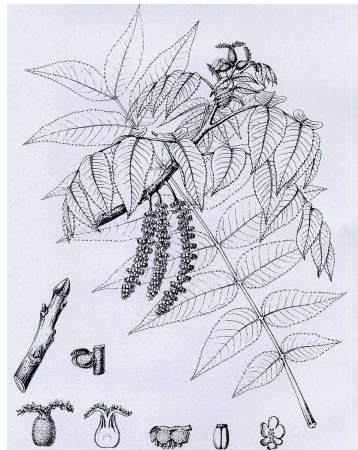
Juglans microcarpa



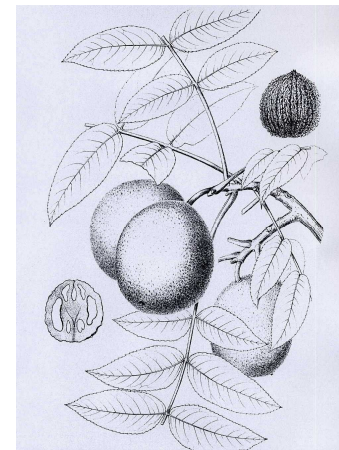
Juglans cinerea



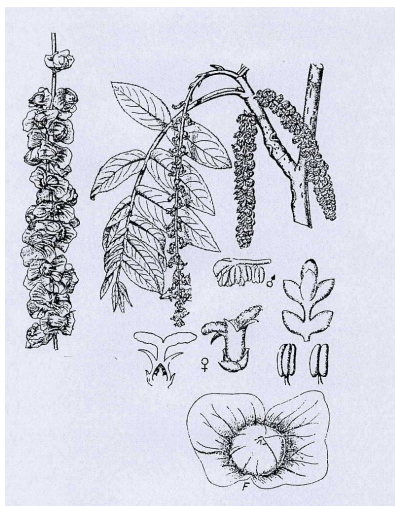
Juglans hindsii



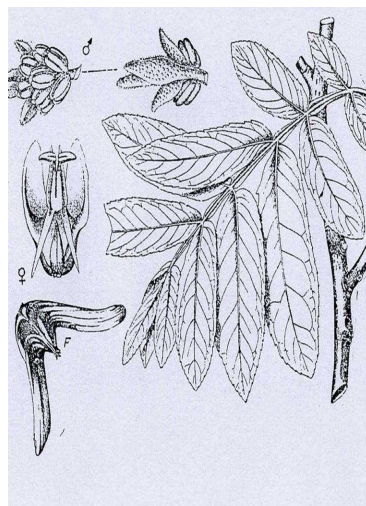
Juglans nigra



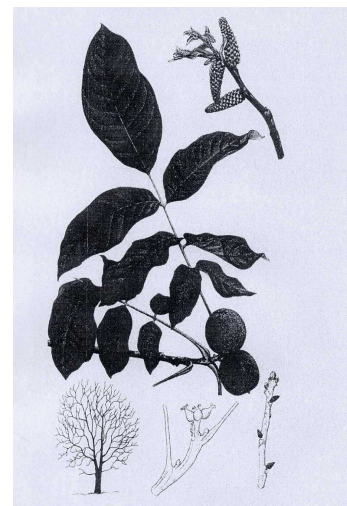
Juglans seboldiana



Pterocarya fraxinifolia



Pterocarya stenoptera



Juglans regia

1.8. JUGLANDETI

La forte antropizzazione nei secoli di specie agronomicamente importanti, come il noce, tramite la diffusione di poche cultivar da frutta (mediante propagazione vegetativa o per seme di cultivar strettamente imparentate tra loro) ha contribuito all'erosione delle specie e, conseguentemente, ha causato l'omogeneizzazione delle popolazioni residue e la perdita di gran parte della biodiversità utile, che la natura aveva sviluppato nel corso dei millenni. Ne deriva che uno dei più importanti aspetti del miglioramento genetico di queste specie consista nella conservazione quanto più ampia possibile della loro variabilità genetica. Infatti, il miglioramento genetico degli alberi forestali è un processo a lungo termine per cui si è spesso soggetti alla possibilità di un cambiamento degli obiettivi di selezione nel corso di un programma, in risposta per esempio a un'evoluzione della richiesta. L'adozione, quindi, di nuovi criteri di selezione è resa possibile proprio dalla disponibilità di un'ampia gamma di geni in seno alla popolazione di base. In questo contesto, il mantenimento a livello delle popolazioni di base di una quota importante di variabilità genetica appare quindi essere il solo mezzo valido per far fronte ai rischi sanitari e climatici e per riorientare, se necessario, gli obiettivi di produzione. In quest'ottica risulta evidente la salvaguardia del germoplasma mediante la conservazione del pool genico con collezioni *in situ* o *ex situ*.

Da qui la costituzione in vari paesi, Italia compresa, di Juglandeti, che vanno a rappresentare un importante patrimonio genetico. Essi oltre a conservare *ex situ* la biodiversità di alcune specie appartenenti alla famiglia delle *Juglandaceae*, rappresentano una fonte di materiale unica per studi di varia natura, primo tra tutti quello sulla variabilità genetica di alcuni caratteri come accrescimento, caratteristiche del legno, resistenza alle malattie, al freddo, ecc. che sono alla base per una corretta impostazione di miglioramento genetico.

In allegato "A" si riporta una descrizione ben dettagliata dello Juglandetum sito presso l'Azienda Cesurni deln CRA (MIPAF) di Tivoli (Roma).

1.9. PROBLEMATICHE FITOPATOLOGICHE DEL NOCE DA LEGNO

Essendo l'arboricoltura da legno un settore nuovo, in divenire, esistono notevoli difficoltà per una razionale gestione dei relativi impianti. Tra gli aspetti che più preoccupano gli agricoltori e gli operatori del settore, ai primi posti risulta quello fitosanitario, anche perché in più casi, oltre a ridurre lo sviluppo delle piante, andrebbe a peggiorare la qualità del legno (ANSELMi, 2001a).

Una non corretta valutazione dell'aspetto fitosanitario potrebbe infatti incidere non solo sullo sviluppo delle piante, con conseguente decremento della massa legnosa, ma anche sul peggioramento della qualità del legname, provocando forti perdite economiche (ANSELMi, 2001b).

Di seguito vengono brevemente illustrate le principali avversità del noce, facendo un cenno sui danni causati da insetti, per proseguire con le malattie ad eziologia sia abiotica sia, soprattutto biotica.

1.9.1. DANNI DA INSETTI

L'intensificarsi degli impianti di noce comune e, il conseguente aumento di disponibilità di tale latifolia, ha favorito la diffusione o lo sviluppo di popolazioni anche di specie fitofaghe in precedenza segnalate solo occasionalmente.

In base alle modalità di alimentazione possiamo distinguere insetti fitomizi, xilofagi e defogliatori:

Fitomizi. Rientrano in questo gruppo le specie dotate di apparato boccale pungente e succhiante. Sul noce, per la diffusione degli attacchi, si ricordano in particolare: due afidi callafididi, *Callaphis juglandis* Goeze e *Chromaphis juglandicola* Kaltenbach, monofagi sulla *Juglandaceae*, e un rincote omottero flatide di origine americana, *Metcalfa pruinosa* Say, riscontrato in Italia a partire dai primi anni '80 e rapidamente diffusosi in tutta la penisola. La *M. pruinosa* può determinare un anomalo accrescimento dei getti, tale da costituire un pericolo per le giovani piante. Le sue infestazioni possono infatti causare inconvenienti, dovuti alla produzione di abbondante melata e di secrezioni cerosi che imbrattano gli organi vegetali e li predispongono a attacchi fungini.

Defogliatori. Fanno parte di questo raggruppamento i fitofagi provvisti di apparato boccale masticatore e che si nutrono degli organi verdi della pianta. La loro attività

trofica risulta dannosa poiché, riducendo la massa fogliare, riducono la capacità fotosintetica dei soggetti attaccati e quindi lo sviluppo delle piante. Delle numerose specie osservate su noce, i lepidotteri apparsi più frequentemente sono state le specie: *Lymantria dispar* L. ed *Hyphantria cunea* Drury. Introdotta accidentalmente in Italia una ventina di anni fa dal Nord-America, quest'ultima è risultata finora particolarmente dannosa soprattutto in Piemonte, dove la seconda generazione ha lasciato gli impianti completamente defogliati già nel mese di agosto. Le defogliazioni inducono la pianta ad emettere ricacci autunnali, che sono poi difficilmente lignificabili e quindi predisposti a danni da freddo. Inoltre, la riduzione delle sostanze di riserva invernali nel legno, dà spesso luogo a stati di sofferenza più o meno accentuati nelle piante, facilitando attacchi da parte di patogeni di debolezza (NICCOLI E TIBERI, 1997).

Xilofagi. Tra le numerose specie che vivono a scapito della parte legnosa del noce, le più pericolose per diffusione ed entità dei danni sono due lepidotteri della famiglia dei cossidi, *Zeuzera pyrina* L. (rodilegno giallo) e *Cossus cossus* L. (rodilegno rosso). Questi insetti scavano gallerie all'interno del fusto, debilitando l'ospite dal punto di vista biologico, ma soprattutto inducendo notevoli deprezzamenti alla produzione legnosa. Per questi lepidotteri è consigliata la distruzione delle piante molto infestate e, nel caso di bassi livelli di infestazione, il ricorso al controllo biologico attraverso trappole sessuali a feromone tipo MassTrap[®]. Un altro insetto xilofago è il platipotide *Platypus sulcatus* Chapuis, coleottero recentemente riscontrato in Italia nelle vicinanze di Cassino (ALLEGRO E DELLA BEFFA, 2001), notoriamente polifago, potendo attaccare, oltre al noce, anche il pioppo, il melo e altre latifoglie. I suoi attacchi sembrerebbero tuttavia rimasti circoscritti.

1.9.2. MALATTIE DI ORIGINE ABIOTICA

Rientrano tra le malattie ad eziologia abiotica quelle così definite “non parassitarie”, tra cui, su noce da legno, spiccano la clorosi ferrica, danni da freddo e danni da inquinamento atmosferico (ANSELMINI, 2001b).

La clorosi ferrica è una fisiopatia che si verifica su terreni particolarmente ricchi di calcare, dove quest'ultimo immobilizza il ferro nel suolo, rendendolo indisponibile per la pianta.

I sintomi si manifestano più marcatamente nelle giovani foglie con un passaggio progressivo da verde chiaro a verde giallognolo, fino a biancastro. Il problema può essere ovviato evitando di costituire impianti in suoli a rischio, visto che trattamenti in grado di contrastare il fenomeno (es. con chelati di ferro) sarebbero sicuramente antieconomici (ANSELMi, 2001b).

I danni da freddo sono frequenti in varie aree dell'Italia centro-settentrionale e sono più gravi nei fondovalle e nelle zone meno ventilate dove è solita condensarsi aria più fredda. In particolare, quando l'abbassamento della temperatura è forte e si protrae per alcune ore, si possono osservare allessamento e necrosi dei getti nuovi, non ben lignificati, mentre quando l'abbassamento è di entità minore, vengono danneggiate solo le foglioline più giovani, che si presentano necrosate e con il margine sfrangiato. Seri problemi sono creati dalle gelate primaverili, che possono provocare gravi danni ai nuovi germogli, con rallentamento dello sviluppo della pianta (ANSELMi *et al.*, 2003).

1.9.3 . MALATTIE DI ORIGINE BIOTICA

Numerose sono le malattie di origine biotica del noce, si possono manifestare sia con attacchi alle radici, quali i marciumi radicali, che alla parte epigea, come l'antracnosi, le macchie bianche e la maculatura batterica, i cancri rameali ed il cancro al tronco.

Sorvoliamo sulle virosi (CLRV -Cherry Leav Roll Virus), sulle fumaggini e sul tumore radicale del colletto da *Agrobacterium tumefaciens* Smith and Townsend, 1907, che in piantagioni produttive, solo raramente possono creare qualche problema.

Un cenno meritano le carie causate prevalentemente da Basidiomiceti appartenenti ai generi *Fomes*, *Ganoderma*, *Polyporus*, *Trametes*, *Inonotus*, *Laetiporus*, *Collibia*, *Pleurotus* e *Pholiota* (Anselmi, 2001a), che su piante non vecchie, quali quelle delle piantagioni industriali, possono provocare qualche danno solo in caso di potature effettuate con grossi tagli.

La lotta contro gli agenti di carie è essenzialmente preventiva e si basa sull'applicazione di pratiche colturali che favoriscano il vigore vegetativo della pianta e riducano al minimo il rischio di ferite su organi lignificati. Pertanto la potatura va fatta quando i rami sono ancora piccoli, cercando di evitare i grossi tagli (LUISI E MAGNANO DI SAN LIO, 1997).

1.9.3.1. Marciumi radicali

Sono causati da patogeni in genere caratterizzati da una presenza endemica nei più vari ambienti, da una diffusione a macchia d'olio a partire da focolai iniziali, da una gravità di incidenza spesso legata alla massa d'inoculo.

Fra i fattori a cui è stata riconosciuta un'azione favorente, ricordiamo i ristagni idrici, l'eccessiva compattezza dei terreni con conseguente "asfissia", i periodi prolungati di siccità, precoci defogliazioni indotte da altri parassiti. Tutte queste condizioni stressano la pianta predisponendola così agli attacchi da parte di questi patogeni.

Tra i sintomi possiamo annoverare clorosi fogliare, microfillia, rarefazione della chioma, seccumi, disseccamento di intere branche, fino alla morte della pianta.

I principali agenti di marciumi radicali sono: *Rosellinia necatrix* (Prill.), *Armillaria spp.* e *Phytophthora spp.*

Rosellinia necatrix è un ascomicete spiccatamente polifago caratteristico, che non risale lungo il fusto ma si ferma al colletto. Esso può rimanere a lungo allo stato saprofitario sui residui radicali nel suolo. Per questo risulta particolarmente pericoloso in piantagioni realizzate su ex frutteti ed ex vigneti. La presenza dell'infezione sulla pianta è spesso denunciata da una forte proliferazione dei rami epicormici nella sua parte basale. Altri sintomi che indicano l'attacco sono generalmente rappresentati da chioma clorotica con diminuzione della sua densità, minore produzione in frutti, microfillia. Tuttavia i segni della malattia si vedono soprattutto nelle radici: queste sono marcescenti e circondate da una rete di micelio lanoso, con viraggi di colore che vanno dal bianco al grigio-bruno. Il fungo si trova più facilmente in zone con presenza di umidità e con molta sostanza organica parzialmente decomposta.

Armillaria, è un Basidiomycete estremamente polifago, causa del marciume radicale fibroso. Le piante colpite mostrano sintomi di deperimento, quali disseccamenti dei rami apicali, ingiallimento delle foglie, filloptosi precoce e produzione abbondante di frutti, che però rimangono piccoli e cadono anticipatamente.

Gli attacchi sono facilmente diagnosticabili in autunno, quando compaiono alla base del fusto i corpi fruttiferi alla base del fusto, noti come "famigliole buone" o "chiodini" eduli e ottimi dal punto di vista culinario.

Rimuovendo la corteccia del colletto o delle radici, all'altezza della zona cambiale si sente un piacevole odore "di fungo", proveniente dai ventagli di feltro miceliare bianco

(BELISARIO, 1996). Se il micelio del fungo invade tutta la circonferenza del tronco la pianta non viene più alimentata e finisce per morire. *Armillaria spp.* infetta per contatto radicale o tramite le rizomorfe, pertanto il contagio avviene, generalmente, tra piante contigue. Le basidiospore, essendo evanescenti e presenti in un periodo ristretto dell'anno, hanno un ruolo secondario nelle infezioni; trasportate dal vento e dall'acqua su ceppaie morte, esse assicurano tuttavia la disseminazione dell'agente patogeno. Tra le *Armillaria* la specie più diffusa su noce è *Armillaria mellea* Gillet., che infetta principalmente piante vetuste o deboli, ma può attaccare anche giovani piantine allorquando si trova a contatto di grandi quantitativi di inoculo (es.: presenza di ceppaie infette di ex impianti arborei).

Le misure di lotta da attuare contro i marciumi radicali sono soprattutto a livello preventivo, utilizzando materiale di impianto sano, certificato, scegliendo suoli idonei, ben sistemati e drenati, eliminando residui radicali infetti o piante colpite.

Phytophthora spp. è l'agente del mal del pedale, una delle più gravi e temibili malattie del noce.. In Italia gli agenti eziologici più comuni di questa malattia sono rappresentati da *P. cactorum* L. et C. e secondariamente *P. cambivora* Petri.

Le piante infette, in vivaio, mostrano marciume delle radici, clorosi fogliare e filloptosi anticipata; alla base del tronco si osserva una necrosi della corteccia, che appare imbrunita e depressa mentre le giovani piantine attaccate dalla malattia muoiono rapidamente. Le piante adulte mostrano sintomi generici di deperimento, che interessano tutta la chioma o settori di essa, quali disseccamenti dei rametti apicali, ingiallimento delle foglie e filloptosi precoce.

In fase più avanzata della malattia, alla base del tronco si osservano imbrunimenti e fessurazioni della corteccia, dalle quali gema un liquido vischioso, di colore nerastro.

L'alterazione inizia generalmente dalle radici, che marciscono, risale lungo la porzione basale del tronco (BELISARIO A, 2004).

Il marciume della corteccia nella regione del colletto è causa talora di colpi apoplettici delle piante, che muoiono rapidamente. Le piante gravemente malate spesso mostrano un'abbondante fruttificazione, ma i frutti cadono precocemente oppure rimangono piccoli e si atrofizzano. Il decorso della malattia su piante adulte è cronico, con esito in genere letale (ANSELMINI *et al.*, 2003). La malattia è più frequente negli impianti irrigui e nei terreni con insufficiente drenaggio.

1.9.3.2. Antracnosi del noce

E' la malattia fogliare più comune nel noce ed è diffusa in tutte le aree di coltivazione di questo genere. Essa colpisce sia le giovani piante in vivaio, sia quelle adulte in pieno campo. L'agente causale dell'antracnosi è il fungo *Marssoniella* (*Marssonina*) *juglandis* Lieb. (fam. *Melanconiaceae*), avente come forma ascofora *Gnomonia leptostyla* Fr. Ces. et de Not (fam. *Gnomoniaceae*). Gli attacchi si hanno a partire dal mese di maggio e risultano essere più gravi in siti caratterizzati da elevata umidità atmosferica e in annate piovose ad andamento caldo umido. Il patogeno può attaccare le foglie, i piccioli, i rametti ancora erbacei e i frutti. Sulle foglie compaiono piccole maculature, bruno-nerastre, variamente localizzate (ma spesso, nelle infezioni primarie, ubicate all'apice o ai margini delle foglioline o anche sulla nervatura primaria), rotondeggianti, isolate o confluenti, alonate di tessuto clorotico. In caso di condizioni particolarmente favorevoli alla malattia, le macchie si espandono fino ad occupare un'ingente percentuale della superficie fogliare e determinando numerose lacerazioni della lamina.

Se le foglie attaccate sono giovani, esse appaiono increspate e accartocciate (ANSELM, 2001a), mentre in caso di forti attacchi si possono verificare intense e precoci defogliazioni. Sui giovani rami si rinvencono tacche necrotiche di colore bruno scuro, generalmente isolate, di forma allungata, che evolvono fino a formare dei piccoli cancri di pochi centimetri di lunghezza. Se il cancreto si estende sino a circondare il ramo, la parte distale dello stesso muore (ANSELM *et al.*, 2003).

Quando attacchi intensi si ripetono per più anni successivi, le piante si indeboliscono e sono predisposte all'attacco di patogeni e insetti di debolezza (BELISARIO, 1996).

Sui frutti si osservano delle maculature rotondeggianti, isolate o variamente confluenti, di colore bruno-rossastro, che intaccano profondamente il mallo, raggiungendo spesso anche l'endocarpo e il seme, il quale atrofizza.

Il fungo sverna nella forma sessuata nelle foglie marcescenti cadute a terra. Durante l'inverno maturano i periteci, che i contengono aschi claviformi con all'interno ascospore bicellulari, fusiformi, misuranti $16-26 \mu \times 2-6 \mu$, le quali, a primavera vengono liberate e vanno a colonizzare i tessuti erbacei dell'ospite, dando origine all'infezione primaria. Successivamente si sviluppa la forma conidica del fungo che provoca infezioni per tutta l'estate fino all'autunno successivo quando ricompare la forma ascofora. Gli acervuli, corpi fruttiferi della forma conidica *Marssonina juglandis*,

si differenziano sulle lesioni della pagina inferiore del lembo fogliare e sono costituiti da piccoli corpiccioli, visibili ad occhio nudo, grigio-nerastri. Negli acervuli, invischiati da una sostanza mucillaginosa, si trovano conidi ialini, arcuati, acuminati alle estremità, dapprima unicellulari poi unisetati, della lunghezza di 19-28 μ . In occasione di una abbondante pioggia, la sostanza mucillaginosa si scioglie e libera i conidi che vanno a propagare l'infezione (LUISI E MAGNANO DI SAN LIO, 1997).

La lotta contro questo patogeno è prevalentemente agronomica e si attua con l'abbruciamento o l'interramento delle foglie cadute a terra e con la monda di tutti i rami con cancretti che possono annidare micelio o stromi del fungillo.

La lotta con i mezzi chimici (prodotti rameici allo 0.4-0.5% prima dell'inizio della stagione vegetativa) viene effettuata soprattutto in vivaio, dal momento che questi trattamenti in piantagione, oltre che presentare implicazioni di carattere ecologico, non appaiono in genere economicamente convenienti.

1.9.3.3. Macchie bianche delle foglie

Questa malattia è denominata anche seccume lanuginoso, è causata da *Microstroma juglandis* Berenger, patogeno fogliare in continuo incremento, in particolare su *Juglans regia*. Esso viene considerato un basidiomicete, anche se non è nota la forma perfetta. Gli attacchi, che si manifestano con tipiche macchie biancastre sulle foglie sono diffusi a, con maggiore frequenza, nelle regioni italiane del centro-sud e nelle zone vallive. Gli organi colpiti sono quasi esclusivamente foglie e germogli, più raramente frutti e giovani rami. I sintomi sono inconfondibili e consistono in macchie angolari, coperte da un'efflorescenza biancastra costituita dal micelio del fungo e dalle spore prodotte in abbondanza, che compaiono sulla pagina inferiore della foglia; in corrispondenza di esse, sulla pagina superiore del lembo fogliare, si osservano delle aree clorotiche (ANSELMi, 2001a).

Tali aree successivamente disseccano assumendo una colorazione bruna e lasciando lacerazioni sulla lamina fogliare. Sebbene in condizioni favorevoli al proprio sviluppo (alte temperature accompagnate da abbondanti precipitazioni), il patogeno possa provocare defogliazioni e cascola dei frutti, su impianti da legno, esso non costituisce quasi mai, negli impianti adulti, un pericolo da giustificare specifici interventi di difesa.

Ciò è dovuto anche al fatto che il periodo infettivo si limita alla tarda primavera-inizio estate. Una riduzione delle infezioni è stata notata in impianti già trattati con prodotti rameici contro la Maculatura batterica del noce.

1.9.3.4. Maculatura batterica

Tra i patogeni più pericolosi negli impianti di noce da legno emerge il batterio *Xanthomonas campestris* pv. *Juglandis* (Pierce) Dye: in Italia le prime descrizioni della malattia provengono dalla penisola Sorrentina e risalgono al 1884.

L'identificazione del batterio e il suo riconoscimento come responsabile delle "macchie nere del noce" avvennero successivamente, prima in Val di Susa e poi in diverse regioni italiane. La malattia può interessare tutti gli organi verdi della pianta, sui quali induce i seguenti sintomi: sugli amenti, imbrunimenti, disseccamenti e deformazioni; sul fiore femminile, che per caratteristiche strutturali è particolarmente recettivo, maculature o striature nerastre, avvizzimento e distacco; sulle foglie, che vengono colpite in qualsiasi stadio di sviluppo, piccole macchie clorotiche con contorno angolare, che successivamente necrotizzano, causando deformazioni e lacerazioni del lembo; sul rachide, sul picciolo e sulla nervatura principale, piccole tacche allungate nerastre; sui germogli, tacche necrotiche più o meno allungate, con contorno irregolare, che possono portare anche al disseccamento del germoglio. Sui rami, le infezioni verificatesi quando non erano ancora lignificati, causano cancri allungati, che quando circondano completamente l'organo ne possono causare il disseccamento della parte distale; sui frutticini, macchie idropiche, rotondeggianti e leggermente depresse, del diametro di 3-4 mm. Le infezioni più tardive provocano tacche depresse sul mallo, che col tempo tendono ad assumere una colorazione nerastra; se l'infezione si approfondisce, anche il guscio presenta macchie nerastre che lo deprezzano ed i gherigli anneriscono ed assumono una consistenza molliccia.

L'agente della maculatura batterica del noce penetra nell'ospite attraverso le ferite (via di penetrazione più frequente), gli stigmi (la disseminazione del batterio può avvenire per mezzo del polline), gli stomi o le cicatrici fogliari. Attraverso quest'ultima via il batterio può invadere lo xilema e colonizzare le gemme. *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* sopravvive sulla superficie delle foglie durante la stagione primaverile-estiva, in attesa di condizioni favorevoli alle infezioni. Durante l'inverno si conserva nei frutti a

terra, nei cancri rameali e soprattutto nelle gemme. Le prime infezioni si verificano in primavera, poco dopo la ripresa vegetativa, quando il patogeno colonizza gli amenti e le giovani foglie, mentre le infezioni secondarie si hanno per mezzo di essudati batterici che fuoriescono dalle aree necrotiche.

I principali vettori del patogeno sono: la pioggia, che oltre a favorire la disseminazione dell'inoculo, facilita la penetrazione del batterio nei tessuti; il vento, gli insetti, gli acari ed infine l'uomo, che consente la penetrazione del batterio utilizzando portainnesti, marze o strumenti cesori infetti, oppure per mezzo di una raccolta traumatica dei frutti.

Inoltre *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* è uno dei pochi agenti patogeni delle piante trasmessi con il polline (LUISI, MAGNANO DI SAN LIO, 1997).

Sono favorevoli allo sviluppo ed alla diffusione della malattia, temperature comprese tra i 4 e i 30°C, con optimum tra i 20 ed i 28°C, umidità relativa elevata, la presenza di un velo liquido sull'ospite per un tempo minimo di 5-10 minuti ed il turgore dei tessuti. In presenza di queste condizioni, si possono verificare infezioni nell'arco delle 24-48 h.

Per prevenire gli attacchi di *X. campestris* pv. *juglandis*, sarebbe opportuno utilizzare materiale di propagazione sano (materiale certificato), evitare l'irrigazione durante la fioritura, non utilizzare sistemi di irrigazione che bagnino le foglie e, infine, potare la pianta in modo da favorire la circolazione dell'aria. Possono essere effettuati trattamenti chimici preventivi con prodotti a base di rame (200 g/hl di p.a.), sia in vivaio che in campo, nella fase di schiusura delle gemme.

Negli impianti adulti i trattamenti possono essere eseguiti in autunno, durante la caduta delle foglie e in primavera, alla schiusura delle gemme, con poltiglia bordolese neutra (1-3 trattamenti per ciascuna epoca, distanziati di 7-10 giorni); a causa della sensibilità al rame dei fiori, è sconsigliabile eseguire i trattamenti in piena fioritura. Recentemente è stato dimostrato che l'aggiunta di ferro ai composti rameici ne aumenta l'efficacia: il ferro infatti altererebbe la fisiologia del batterio rendendolo più sensibile agli ioni rame.

1.9.3.5. Cancri rameali

Sono segnalati su noce svariati patogeni fungini, agiti di necrosi corticale quali: *Phomopsis juglandina* Fuck., *Botryosphaeria ribis* Grosse et Duggar, *Melanconis juglandis* G.H. Otth, *Cytospora* spp. e *Nectria* spp..

Si tratta prevalentemente di patogeni di debolezza, che attaccano la pianta ed i rami generalmente quando sono in stato di sofferenza. Essi possono colpire piante di tutte le età, causano seccumi alla chioma e deperimenti più o meno intensi, con danni economici spesso rilevanti.

Il patogeno *Phomopsis juglandina* (teleomorfo *Diaporthe medusae* (Fr.: Fr.) Fuckel), colpisce perlopiù impianti sofferenti e poco vigorosi, determinando la morte dei rametti lignificati. I danni più consistenti si hanno generalmente durante la fase di germogliazione delle piante, con la formazione di macchie bruno-rossastre, depresse, che con il tempo si estendono fino a circondare il ramo. La malattia si diffonde lentamente dai rami periferici fino all'interno della chioma determinandone un forte dirado. I picnidi si formano verso febbraio-marzo e, spesso aggregati in cirri, emettono conidi ialini e unicellulari, di due differenti tipi: uno ellissoidale e l'altro allungato e ricurvo ad un'estremità; essi sono dispersi principalmente dall'acqua e dal vento.

Il patogeno penetra attraverso le ferite di varia natura e l'infezione è favorita da condizioni di debilitazione della pianta.

Botryosphaeria ribis (anamorfo *Dothiorella ribis* (Fuckel) Petr.), produce avvizzimenti delle foglie seguiti da disseccamento dei giovani rametti o germogli non ramificati circondati dalle lesioni. Sulla corteccia, sono visibili tacche ellissoidali, lunghe 2-3 cm, di color rosso-violaceo, in genere in corrispondenza di soluzioni di continuità (BELISARIO, 1996).

In corrispondenza delle tacche corticali il legno si fessura e trasuda una sostanza vischiosa, i rami infetti, in sezione trasversale, mostrano imbrunimenti che si incuneano nel cilindro centrale e sui frutti, talvolta, si osservano piccole tacche scure depresse sul mallo (LUISI E MAGNANO DI SAN LIO, 1997). Il patogeno sverna tramite micelio nei cancri rameali, sui quali si formano i periteci, dai quali escono le ascospore fusiformi, che causano l'infezione primaria. Sugli organi colpiti il patogeno, in condizioni ambientali favorevoli, differenzia le fruttificazioni agamiche, i picnidi, che a maturità erompono per lacerazione dell'epidermide e liberano numerosi conidi ialini che hanno il

compito di diffondere la malattia. L'attività di questo patogeno raggiunge il massimo nei mesi primaverili, piovosi e umidi.

Il celomicete *Cytospora* spp. si manifesta inizialmente sui rami con tacche irregolari, depresse, di colore bruno-rossastro, la necrosi interessa i tessuti corticali e si approfondisce poi fino al legno.

Le lesioni si allargano piuttosto rapidamente fino ad interessare l'intera circonferenza del rametto, la cui parte distale dissecca. La malattia può manifestarsi anche sui rami grossi e sulle branche: la porzione distale del ramo corrispondente alla parte sana, continua ad accrescersi, mentre quella corrispondente alla parte infetta è meno vigorosa, perde resistenza meccanica e il ramo stesso finisce per spezzarsi (BELISARIO, 1996).

Le infezioni avvengono in autunno, tramite i conidi che fuoriescono dai picnidi. In presenza di acqua o di umidità elevata, i conidi germinano ed emettono un ifa micelica, che penetra nei tessuti della pianta attraverso ferite di qualsiasi tipo. *Cytospora* spp. si insedia su piante già debilitate per altre cause, presenta maggiore virulenza nelle regioni umide e fresche, con temperature inferiori a 15° C. Il patogeno durante l'inverno sopravvive generalmente sotto forma di picnidi o di micelio, nei tessuti infetti dell'ospite (LUISI E MAGNANO DI SAN LIO, 1997).

Il melanconiale *Melanconis juglandis* (teleomorfo *Diaporthe juglandis*) presenta sintomi molto simili a quelli prodotti da altri miceti lignicoli, quali *Botryosphaeria ribis* e *Phomopsis juglandina*. Provoca disseccamenti sui rami che progrediscono dall'apice verso la base.

Sul ramo infetto in sezione trasversale, si notano imbrunimenti che si incuneano nel cilindro centrale. Nel caso di forte attacco si osserva il disseccamento di quasi tutta la fronda; l'albero reagisce emettendo nuovi getti dalla base dei rami o dal tronco.

Con valori di umidità atmosferica maggiori del 50% si ha produzione di conidi, questi danno luogo alla formazione di un micelio aereo abbondante inizialmente grigio e successivamente diventa giallastro. Sulla corteccia dei rami morti si differenziano gli acervuli che appaiono come pustole rotondeggianti, nere e sporgenti. Da essi fuoriescono conidi che si cementano tra loro, formando cirri neri, contorti e cerosi. Questo fungo è considerato generalmente un patogeno da ferita, poiché la sua penetrazione nell'ospite avviene attraverso lesioni della corteccia.

In generale la lotta contro tali malattie deve essere basata soprattutto su misure preventive, volte a minimizzare i fattori predisponenti, quali in particolare le cause di stress delle piante. Buon materiale d'impianto, oculata scelta della stazione, razionale messa a dimora, adeguate cure colturali, lotta contro i parassiti primari, rappresentano i principali elementi che, evitando stati di sofferenza alle piante, riducono l'incidenza di buona parte degli agenti di cancro corticale.

In presenza di attacchi potrebbe risultare conveniente la rimonda delle parti colpite, onde ridurre la pressione d'inoculo, ma anche interventi idonei a rimuovere le cause di stress ed a rinvigorire le piante, quali le irrigazioni, il diserbo, le concimazioni, la lotta contro i parassiti primari. Non sono consigliati, anche per motivi economici, i trattamenti chimici.

A conclusione di questo capitolo merita sottolineare come per alcuni patogeni dello stesso genere o di specie affini a quelli sopra elencati, sia stata dimostrata la capacità di vivere lungamente allo stadio asintomatico (endofitico) nei tessuti di piante sane passando alla colonizzazione patologica solo in caso di stress delle piante.

1.9.3.6. Cancro corticale del fusto

Da qualche anno, negli impianti di noce da legno (*Juglans regia*) in Italia si stanno evidenziando gravi danni da cancro corticale al fusto (NARDI E ROSSINI, 2003) ed a grossi rami, con notevoli alterazioni al legno e riduzioni del relativo valore commerciale (ANSELMi 2001A; ANSELMi 2001B; ANSELMi ET AL., 2003; GONZALEZ ET AL., 2002; ANSELMi ET AL., 2004).

Nella fase iniziale la malattia si manifesta con delle tacche color bruno, leggermente concave, che evolvono in evidenti cancro corticale con fessurazioni alla corteccia lunghe fino a 20 cm ed abbondante produzione di essudati nerastri.

I tessuti al di sotto del ritidoma sono fortemente anneriti e, solitamente, separati da una precisa linea di demarcazione dai tessuti sani. La degenerazione dei tessuti può approfondirsi radialmente fino ad interessare il cambio. Nei casi più gravi le macchie, soprattutto se numerose e vicine tra loro, possono confluire arrivando ad interessare ampie zone del fusto. Qualora venga attaccata l'intera circonferenza, la pianta può andare incontro a forti deperimenti, talora fino alla morte.

Sebbene in passato l'eziologia di queste alterazioni sia stata imputata a specie batteriche (SACCARIDI *ET AL.*, 1998; MORONE *ET AL.*, 1998; SCORTICHINI *ET AL.*, 1998; SCORTICHINI 1999; CARRELLA *ET AL.*, 2003) del genere *Brenneria* (*B.nigrifluens* (Wilson et al. 1957) Hauben et al. 1999 o *B. rubrifaciens* (Wilson et al. 1967) Hauben et al. 1999), recenti lavori (MAZZAGLIA *ET AL.*, 2004; MAZZAGLIA *ET AL.*, 2004) hanno evidenziato una matrice più complessa, con ricorrenti presenze anche di agenti fungini, quali in particolare *Botryosphaeria* spp., *Fusarium* spp.e *Phomopsis* spp. alcuni già citati come agenti di cancri rameali. L'eventuale coinvolgimento nella malattia di tali ptogeni fungini restava tuttavia da chiarire. Non è escluso peraltro che tali agenti fungini possano essere caratterizzati da fenomeni di endofitismo, rendendo ancora più complesso il quadro fitopatologico.

A fronte di una pericolosità e dannosità della malattia particolarmente gravi, le conoscenze sulla sua origine erano pertanto scarse, così come quelle relative alle condizioni che ne favoriscono lo sviluppo erano estremamente scarse.

Con questa tesi di Dottorato si è voluto indagare sui questi aspetti della malattia, che possono essere di aiuto a comprenderne l'origine e le condizioni di sviluppo ed a prevenirne o ridurre gli effetti degli attacchi.

1.10. CENNI SULL'ENDOFITISMO DEI FITOPATOGENI

Con il termine endofita si considera un microrganismo che passa almeno una parte del suo ciclo vitale asintomaticamente all'interno dei tessuti dell'ospite (PETRINI, 1991).

Gli endofiti sono stati isolati da diverse piante, quali conifere (CARROLL 1978, SIEBER, 1988), graminacee (CLAY, 1988), felci (PETRINI, 1988) e numerose latifoglie, dal seme, radici, foglie e tessuti legnosi (SIEBER *ET AL.*, 1991).

Tassonomicamente i funghi endofiti segnalati dalla letteratura appartengono all'ordine degli *Ascomycota*, *Basidiomycota*, ai funghi mitosporici ed infine agli *oomyceti* (Petrini, 1988). Esistono funghi che passano l'intera esistenza all'interno della pianta ospite senza mai creare danni o manifestare all'esterno sintomi particolari; la presenza di detti funghi è a volte vantaggiosa per la pianta a tal punto da poterne migliorare la vita e l'adattamento all'ambiente (CLAY, 1988). Queste piante mostrano spesso un accrescimento migliore e una maggiore resistenza agli insetti (FUNK *ET AL.*, 1983).

Tuttavia ci sono endofiti che, al verificarsi di determinate condizioni fisiologiche della pianta ospite, come ad esempio l'insorgere di stress o il raggiungimento della senescenza, modificano la loro facies, cominciando a colonizzare i tessuti finendo per risultare patogeni per l'ospite, da cui il nome di "endofiti patogeni".

L'ultimo ventennio è stato testimone di numerosi studi sugli endofiti patogeni, in particolare quelli fungini agenti di necrosi corticale.

Da tali studi è emerso altresì che buona parte di tali endofiti corticali a carattere patogeno sono inquadrabili tra i patogeni di debolezza, che attaccano la pianta solo quando sotto stress.

Per essi l'endofitismo sembrerebbe rappresentare una vera e propria strategia di sopravvivenza, permettendo loro di superare condizioni non favorevoli al loro sviluppo patogenetico quando le piante si trovano in buone condizioni fisiologiche. La loro presenza endofitica nei tessuti sani renderebbe pronti tali patogeni a colonizzazioni qualora si presentassero condizioni sfavorevoli di stress delle piante (es: piante senescenti, piante dominate ecc.) o di loro branche (es: rami adugiati), incrementando la pressione di inoculo e la relativa diffusione nel tempo.

In Italia buona parte degli studi sugli endofiti patogeni hanno riguardato i parassiti fungini di debolezza coinvolti nel deperimento del bosco, querce in particolare. Sui tessuti corticali di tali piante, sia deperienti che sane, si annoverano numerose specie

fungine sia patogene (*Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze, *Phoma cava* Schulzer, *Coryneum* spp.) (ANSELM ET AL, 2004; RAGAZZI ET AL, 2004) che apparentemente innocue (*Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries, *Verticillium* spp., *Gliocladium roseum* Bainier e *Acremonium* spp. etc.).

La loro incidenza nei vari organi e le loro associazioni reciproche sembrerebbero variare, oltre che della specie ospite, anche in funzione delle aree territoriali, delle condizioni climatiche e della pianta ospite.

Come già accennato, è probabile che alcuni dei patogeni annoverati su noce, quali agenti di cancro corticali, presentino lunghe fasi endofitiche nelle piante sane.

Parimenti, anche i funghi segnalati nel cancro del tronco, il cui coinvolgimento nella malattia è tuttavia da dimostrare, sono rappresentati da generi e specie che potrebbero presentare un *habitus* endofitico. Anche lo studio di questo aspetto rientra tra quelli previsti dalla tesi.

2. OBIETTIVI DELLA TESI

Come precedentemente accennato, il cancro del tronco rappresenta una delle più gravi malattie del noce da legno, vuoi perché, in casi gravi, può addirittura portare a morte la pianta, vuoi perché le alterazioni indotte al fusto sono in genere causa di un forte deprezzamento del legname. Quantunque attualmente, le segnalazioni della malattia in Italia siano in numero limitato, esse sembrerebbero aumentare notevolmente di anno in anno in varie regioni Centro-Settentrionali. L'avvento del cancro del fusto ha in più casi vanificato il lavoro di anni condotto nelle piantagioni colpite, per le assai rilevanti perdite economiche indotte.

Scarse sono purtroppo le conoscenze sulla malattia, sia a livello eziologico ed epidemiologico, sia relativamente ai fattori che la predispongono ed agli indirizzi di lotta. Di qui le notevoli preoccupazioni degli agricoltori e dei tecnici del settore, che non trovano indicazioni su come prevenire la malattia o ridurne i danni.

Era pertanto molto sentita la necessità di far luce sul problema, al fine di poter individuare idonee strategie di difesa, sia preventive che curative, contro questa temibile fitopatia.

Le indagini relative a questa tesi di dottorato avevano l'obiettivo di apportare chiarimenti sugli agenti causali del cancro del noce, sulle condizioni che ne favoriscono lo sviluppo e sulla predisposizione agli attacchi da parte di diverso materiale genetico.

Più in particolare, oltre a seguire con dettaglio i vari sintomi della malattia e la relativa evoluzione nel tempo, scopi della ricerca erano quelli di:

- 1- chiarire la reale eziologia della malattia attraverso: a) isolamenti da materiale sintomatico proveniente da aree geografiche, matrici ospiti e cancri diversi; b) inoculazioni artificiali su pianta dei vari agenti patogeni riscontrati, isolatamente o combinati tra loro; c) confronto tra i patogeni presenti nei cancri del fusto con quelli che si riscontrano nei vari cancri rameali; d) rilievi sull'eventuale insediamento endofitico (asintomatico) dei presunti agenti patogeni nei tessuti di piante sane; e) verifica delle possibili reciproche interazioni tra i vari microrganismi, patogeni e non, riscontrati nelle lesioni. Sulla base dell'insieme dei risultati, formulare un attendibile modello eziologico in grado di rispondere alle varie realtà osservate;

- 2- verificare l'azione predisponente gli attacchi da parte di diversi fattori, quali in particolare la densità e la promiscuità (consociazione) degli impianti, la qualità delle concimazioni e delle irrigazioni, nonché altri eventuali cause di stress evidenziabili negli impianti colpiti;
- 3- valutare il comportamento verso la malattia e verso gli eventuali suoi diversi agenti da parte di cultivar o cloni diversi di *Juglans regia*, di specie diverse del genere *Juglans* o loro ibridi, nonché di due genere affini, *Carya* e *Pterocarya*.

3. MATERIALI E METODI

3.1. INDAGINI SULL'EZIOLOGIA DEL CANCRO CORTICALE DEL FUSTO

Al fine di rilevare l'agente o gli agenti eziologici della malattia, in primo luogo (1) si è proceduto all'isolamento dei microrganismi insediati nei tessuti malati di piante di *Juglans regia* sintomatiche riscontrate in ambienti diversi, anche in relazione all'epoca di isolamento, al fenotipo ed alla cultivar ospite ed allo stadio evolutivo del cancro; indi (2) è stata indagata la patogenicità su pianta dei potenziali patogeni risultati più ricorrenti; (3) si è poi cercato di verificare l'analoga di tali patogeni con quelli coinvolti nei cancri rameali e l'eventuale loro *habitus* endofitico in piante sane o comunque in tessuti asintomatici; infine (4) si è indagato sull'eventuale antagonismo o meno tra i vari microrganismi associati alla malattia patogeni e non.

3.1.1. MICRORGANISMI PATOGENI PRESENTI NEI CANCRI

Allo scopo di verificare la variabilità e la frequenza dei vari microrganismi presenti nei cancri e comprenderne il reale coinvolgimento nell'eziologia della malattia, sono stati innanzitutto effettuate serie di isolamenti da cancri su piante presenti in noceti di zone geografiche differenti e/o su materiale genetico diverso, indagando poi sulle associazioni e sull'incidenza dei vari patogeni in mesi diversi dell'anno ed in cancri con diverso stadio evolutivo.

3.1.1.1. Cancri da zone geografiche diverse

Nel corso del triennio 2006-2008 sono stati prelevati reperti di corteccia malata da svariate piantagioni di zone geografiche differenti dell'Italia centrale e settentrionale (Fig. 2). Più in particolare sono state considerate, nell'Italia del Nord, le stazioni di Sezzadio (AL) in Piemonte, San Matteo delle Chiaviche (MN), Gazzuolo (MN) e Commessaggio (MN) in Lombardia, Ravenna in Emilia Romagna; nel Centro Italia, le stazioni di Cisterna di Latina (LT), Rieti e Roma nel Lazio, Loreto (AN) e Fermo (AP) nelle Marche (Tab.1). Tutti i suddetti impianti erano colpiti dalla malattia, alcuni (es: Loreto e Fermo) in uno stadio molto avanzato, altri in fase di minore evoluzione.

Salvo casi di studio particolari, in ogni impianto sono state considerate 10 piante, scelte *at random* e, per ogni pianta, circa 5 cancri nello stadio apparentemente più attivo. Per

ciascuna piantagione (o gruppo di piante), al momento del prelievo, sono state rilevate condizioni edafiche e climatiche della stazione, specie, cultivar o clone ospite, provenienza del materiale messo a dimora, età e spaziatura dell'impianto, trattamenti selvicolturali, epoca dei prelievi del materiale destinato agli isolamenti, nonché ogni eventuale fattore che poteva essere di influenza sulla malattia (Tab.1).



Fig. 2. Piantagioni di *Juglans regia* colpite da cancro corticale del fusto considerate per gli isolamenti.

CARATTERISTICHE DELL' IMPIANTO					CARATTERISTI CHE DELLE PIANTE			DATI SULLA MALATTIA			
Località	Tipo di impianto	Consociazioni	Sesto d'impianto (m x m)	Fattori di stress alle piante	Età	Vigore	Diametro medio (cm)	Incidenza	Data dei prelievi	Anno di comparsa	Stadio evolutivo dei cancri
Cisterna di Latina (LT)	Commerciale Monocultivar	-	7 x 7	Densità delle piante* Sress idrico* Carenze nutritive*	15	++ --	25	Molto elevata	07/2007	2004	Vario
Roma	Sperimentale Multicultivar	-	6 x 6	Terreno ostile	16	+	19	Modesta	06/2007	2006	Iniziale
Rieti	Commerciale Multiclonale	-	7 x 7	Terreno ostile	8	--	9,5	Elevata	09/2007	2007	Iniziale
Loreto (AN) *	Commerciale Monocultivar	-	4 x 4	Densità delle piante	15	+	24	Molto elevata	09/2004	2001	Evoluto
Fermo (MC) *	Commerciale Monocultivar	-	6 x 6	Densità delle piante	15	+	27	Sporadica	09/2004	2001	Evoluto
Sezzadio (AL)	Sperimentale Monocultivar	-	8 x 8	-	13	+	15	Irrisoria	10/2007	2006	Vario
		<i>Prunus,Alnus, Sambucus,</i>	4 x 2	Densità delle piante				Elevata			
S. Matteo delle Chiaviche (MN)	Sperimentale Pluricultivar	-	8 x 8	-	12	+	23	Elevata	09/2006	2003	Vario
		<i>Alnus,Eleagnus, Sambucus, Fraxinus</i>	4 x 4 4 x 2	Densità delle piante Allagamento suolo				Molto elevata			
Gazzuolo (MN)	Piante isolate Monocultivar	-	Ampio	-	30	+	40	Sporadica	09/2006	2005	Vario
Commessaggio (MN)	Piante isolate Monocultivar	-	Ampio	-	25	+	40	Sporadica	09/2006	2006	Iniziale
Ravenna	Sperimentale Pluricultivar	-	5 x 5	Densità delle piante	15	+	23	Sporadica	07/2007	2007	Iniziale

* in alcune aree.

Tab.1. Rilievi sugli impianti di *Juglans regia* colpiti da cancro del fusto.

3.1.1.2. Isolamenti in epoche diverse

Al fine di indagare la variabilità quali-quantitativa dei microrganismi fungini e batterici associati a cancri attivi sul fusto di piante di noce nel tempo, presso l'impianto commerciale di Cisterna di Latina, durante la stagione vegetativa 2007, sono stati effettuati isolamenti *ad hoc* di batteri e funghi da cancri attivi nei mesi di Aprile, Maggio, Giugno, Luglio, Agosto, Settembre e Novembre. In particolare sono considerati 10 cancri per pianta e 30 frammenti di tessuto in via di colonizzazione per ciascun cancro.

3.1.1.3. Cancri da fenotipi diversi

Al fine di verificare l'eventuale variabilità quali-quantitativa dei microrganismi presenti nei tessuti malati in relazione ai singoli fenotipi (piante), nella piantagione di Cisterna di Latina, da 20 individui distinti di *Juglans regia* scelti *at random* si è proceduto ad isolamenti considerando 10 cancri per pianta e 30 frammenti di tessuto in via di colonizzazione per ciascun cancro.

3.1.1.4. Cancri da cultivars o cloni di *Juglans regia* diversi

Allo scopo di valutare l'influenza della cultivar o del clone di *J. regia* sulle associazioni e/o sull'incidenza dei vari patogeni responsabili dei processi cancerosi, sono stati condotti appositi isolamenti da cancri riscontrati su piante appartenenti a: a) nove cultivars diverse di *J. Regia*, presenti all'impianto sperimentale di San Matteo delle Chiaviche, costituito nel 1996 dall'Istituto Sperimentale per la Selvicoltura (CRA) di Arezzo, e precisamente: Lilli, Dronero, Garfagnana, Sorrento Boschi, Bosco Fontana, Mulino e Mosceta; b) quattro cloni diversi di *J. Regia*, presenti in un impianto commerciale in Rieti, costituito nel 2000 e precisamente: Umbra, Parisienne, Franquette e Midland. Per ogni cultivar o clone sono state scelte 10 piante, su ciascuna delle quali sono stati considerati 5 distinti cancri ed utilizzati 10 frammenti di tessuto in via di colonizzazione per cancro.

3.1.1.5. Cancri in diverso stadio evolutivo

Nella stagione vegetativa 2007, dall'impianto di Cisterna di Latina sono stati prelevati svariati campioni di tessuto alterati, relativi a cancri in diverso stadio evolutivo. Tali lesioni, in funzione della loro morfologia e della loro età presunta sono stati suddivisi in

4 differenti morfotipi (Tab.2; Figg.3-4-5), e precisamente: cancri iniziali (2-4 mesi), evoluti (1 anno), molto evoluti (2 anni) e terminali (3 anni o più). Da tasselli di detti tessuti, prelevati nella zona del fronte di avanzamento della malattia, sono stati effettuati isolamenti *ad hoc*, sia di batteri che di funghi, allo scopo di poter valutare la differenza quali-quantitativa dei microrganismi associati alla lesione in funzione dello stadio evolutivo del cancro. Nel complesso sono stati esaminati 10 cancri per stadio evolutivo. Una così accurata analisi dei cancri ci ha peraltro permesso una approfondita disamina sulla sintomatologia della malattia.

CANCRO	DESCRIZIONE
Iniziale (2-4 mesi)	Piccole tacche color bruno di 2-4 cm di diametro, leggermente concave, associate a piccole emissioni di linfa: lesioni sottocorticali estese per pochi cm appena sotto il ritidoma.
Evoluto (1 anno)	Piccole fessurazioni estese per aree di circa 5-10 cm, appiattite o avvallate, con abbondante emissione di linfa. Le necrosi sottocorticali intaccano l'intera profondità della corteccia fino, in qualche caso, ad interessare leggermente il legno sottostante.
Molto Evoluto (2 anni)	Profonde fessurazioni longitudinali ampie 10-15 cm, associate a forte emissione di linfa. I tessuti sottostanti risultano fortemente anneriti. La necrosi incidono fortemente sui tessuti legnosi al di sotto degli strati corticali.
Terminale (3 anni)	Profonde fessurazioni longitudinali anche di 20-25 cm, con segni o meno di cicatrizzazione; zona necrosata fortemente annerita, approfondita fino al sottostante legno.

Tab.2. Tipologie di cancri considerati per rappresentare i diversi stadi evolutivi.

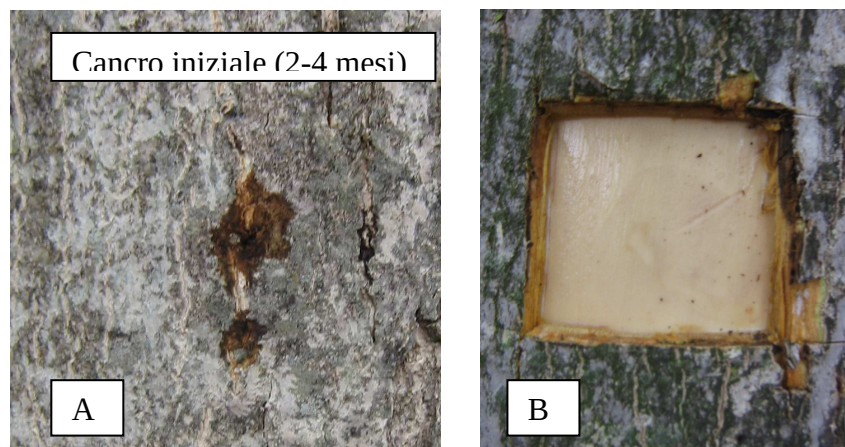


Fig.3. Cancro iniziale su fusto di *Juglans regia* (A). In (B) zona corrispondente al cancro decorticato.

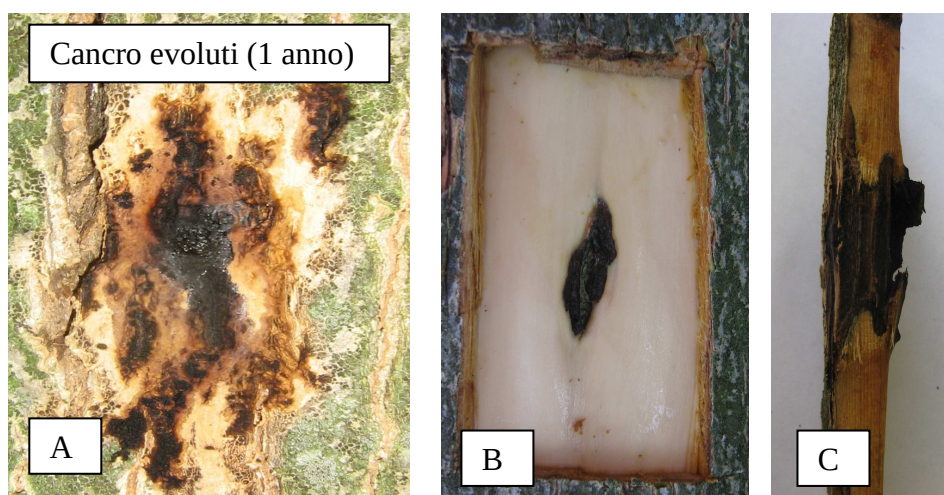


Fig.4. Cancro evoluto (1 anno) su fusto di *Juglans regia* visto prima (A) e dopo la decorticazione (B) ed in corrispondenza della zona centrale del cancro medesimo (C).

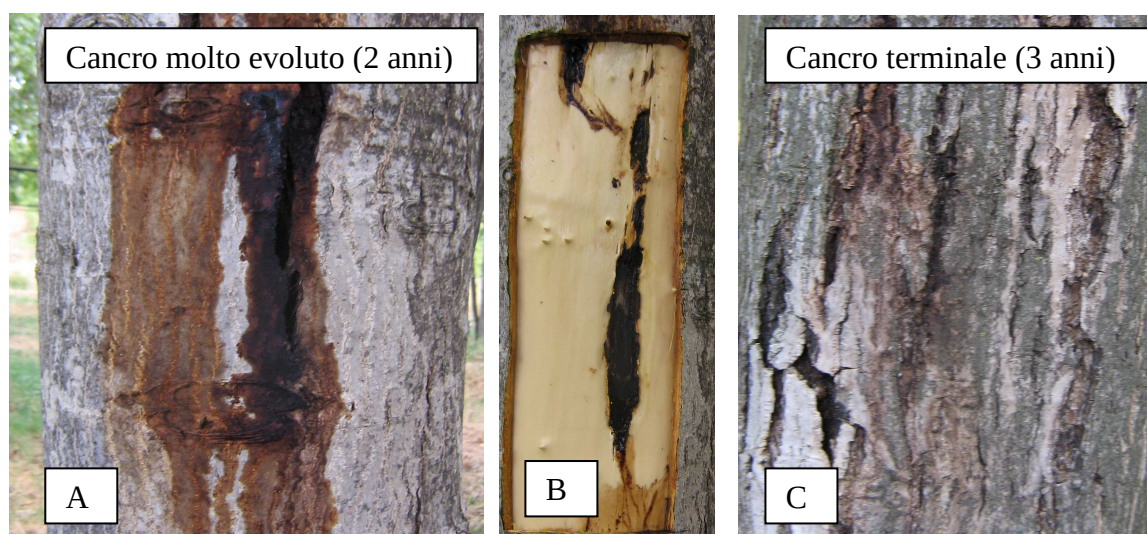


Fig.5. Cancro molto evoluto (2 anni) su fusto di *Juglans regia* vista prima (A), dopo la decorticazione (B). In Cc cancro terminale (vecchio di circa 3 anni).

3.1.1.6. Isolamento, identificazione e quantificazione dei microrganismi

- Isolamento

Ai fini degli isolamenti dei microrganismi *in vitro*, partendo da piccoli reperti di corteccia si è proceduto secondo due serie parallele di tecniche distinte, l'una per i batteri e l'altra per i funghi.

Isolamento dei batteri. Ogni campione di corteccia lesionata è stata sterilizzata esternamente con alcool al 70% e sezionata mediante bisturi sterile per ottenere opportuni frammenti legnosi. Tutti i frammenti sono stati piastrati, previo sminuzzamento in una aliquota di acqua distillata sterile, in capsule Petri contenenti ANS (Agar nutritivo al 5 % di saccarosio) addizionato a Cicloesimide 100 ppm, per evitare la crescita di funghi, quindi posti in incubatore a 25 ± 1 °C.

Isolamento dei funghi. Ogni lesione è stata suddivisa in strati di profondità di circa 3 mm di spessore (ottenendo così tre strati di circa 0,5 cm l'uno) e per ogni strato sono stati esaminati 10 frammenti, per un totale di 30 frammenti per lesione.

I frammenti così ricavati sono stati sterilizzati superficialmente tramite immersione in perossido di idrogeno al 10% per 15 minuti, seguito da ripetuti risciacqui in acqua sterile e successivamente posti in coltura in capsula Petri contenente PDA (Potato Dextrose Agar) addizionato di streptomicina (0,06g/l) per favorire lo sviluppo degli eventuali miceli fungini presenti e la contemporanea inibizione di organismi batterici. Dopo 5 giorni di crescita a 25°C in termostato, i miceli sviluppatisi sono stati reisolati in purezza.

- Identificazione dei microrganismi isolati

Batteri. Gli isolati batterici ottenuti dagli isolamenti da materiale vegetale sono stati raggruppati in morfotipi e quindi identificati, tramite il profilo degli acidi grassi e talora a mezzo di tecniche molecolari, consistente nell'analisi del frammento di DNA ribosomale (estrazione del DNA, amplificazione a mezzo PCR e sequenziamento delle basi).

Funghi. Gli isolati ottenuti in purezza sono stati sottoposti ad una prima suddivisione in tipologie, basata essenzialmente su osservazioni di carattere morfologico delle colonie, quali colore, tipo di accrescimento (a cerchi, a settori, omogeneo etc.), presenza di micelio aereo, eventuali fruttificazioni.

Successivamente sono state condotte osservazioni microscopiche sia allo stereoscopio che al microscopio ottico in campo chiaro:

- Osservazioni allo stereo-microscopio. Venivano condotte direttamente sulle colonie conducendo rilievi su: colore e differenziazione cromatiche; tipo di sviluppo del micelio; disegni sulla superficie; eventuali presenza di corpi fruttiferi o fruttificazioni varie.

- Osservazioni al microscopio ottico in campo chiaro. Per quei funghi per cui non era possibile il riconoscimento con lo stereo-microscopio, si è proceduto alla osservazione al microscopio per trasparenza. All'uopo, frammenti di micelio, venivano posti su un vetrino portaoggetti, montati su di un liquido opportuno (acqua sterile, acido lattico, blu di bromofenolo, ecc.) e coperti con vetrino copri-oggetto ed indi osservati al microscopio ottico per trasparenza. In più casi si procedeva allo schiacciamento dei corpi fruttiferi al fine di far fuoriuscire conidi o spore.

Il genere e, quando possibile, la specie sono stati determinati attraverso l'utilizzo di chiavi dicotomiche dei taxa fungini secondo le indicazioni rilevate dalla letteratura (GOIDANICH, 1959, LAINER *ET AL.*, 1978, BARNETT E HUNTER, 1972, WILLIAMS E WOODWARDS, 2001, VON ARX, 1987, CARMICHAEL *ET. AL* 1980).

In vari casi il riconoscimento delle colonie è avvenuto per confronto con colonie di riferimento precedentemente identificate e presenti nella micoteca del Dipartimento di Protezione delle Piante dell' Università della Tuscia. Qualora fosse era possibile l'identificazione specifica nè con le chiavi dicotomiche nè tramite il confronto con altre colonie, si è proceduto con l'identificazione biomolecolare, tramite estrazione del DNA da micelio e successivo sequenziamento delle basi ottenute. Verrà di seguito riportato, seppur sinteticamente, il protocollo di estrazione del DNA utilizzato: il micelio fungino, precedentemente prelevato dalla piastra di crescita, veniva lavorato con 500 µl di 1 x TE e centrifugato per 10 minuti a 15.000 giri; il surnatante veniva scartato e l' eppendorf dove era localizzato il pellet, sottoposta a congelamento per immersione in azoto liquido, oppure in una soluzione di alcool denaturato e ghiaccio secco. Una volta congelato, il pellet veniva sminuzzato ad opera di un mini-pestello in teflon, perfettamente aderente alle pareti interne della Eppendorf, fino ad ottenere una polvere fine; la polvere veniva risospesa in 300 µl di buffer di estrazione; quindi, per una prima precipitazione, venivano aggiunti 150 µl di sodio acetato 3 M e, dopo opportuno rimescolamento, la sospensione era posta ad incubare per 10 minuti a -20°C; dopo una ulteriore centrifugazione per 15 minuti, sempre a 15.000 giri, circa 450 µl di surnatante venivano trasferiti in una nuova provetta da 1.5 ml e il DNA veniva fatto precipitare aggiungendo isopropanolo in rapporto 1:1; seguiva una incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti, quindi il DNA veniva raccolto e successivamente centrifugato; quest'ultimo veniva lavato con 50 µl di etanolo al 70% e nuovamente centrifugato; scartato il surnatante, il pellet era lasciato asciugare all'aria per pochi minuti, il DNA così ottenuto veniva risospeso in 50 µl di 1 x TE ed infine conservato a -20°C. Al fine di poter amplificare il DNA ottenuto, questo veniva sottoposto ad un ciclo di PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION; SAIKI *ET AL.*, 1985 E 1988). L'amplificazione è stata resa

possibile utilizzando due primers (brevi sequenze oligonucleotidiche) denominati ITS-1 e ITS-4, dimostratisi sufficientemente funzionali per i funghi (WHITE *ET AL.*, 1990). Una volta ottenuti i prodotti di amplificazione, questi venivano sottoposti a separazione elettroforetica su gel di agarosio allo 1,5% contenente bromuro di etidio in ragione di 0,6 µg/µl (MANIATIS *ET AL.*, 1982) in modo da riuscire a visualizzare l'effettiva riuscita del ciclo PCR (l'etidio bromuro si lega al DNA e ne permette il riconoscimento agli UV per fluorescenza). A questo punto, gli amplificati dovevano essere purificati per ripulire il DNA da sali disciolti, residui dei primers, nucleotidi liberi, enzima, ecc.; a tal scopo si è scelto di utilizzare il Kit "Nucleospin Extract" della Macherey-Nigel (M-Medical Genenco), seguendo il protocollo di purificazione da esso previsto per i prodotti di amplificazione. Le sequenze così ottenute, dopo essere state opportunamente sequenziale, e aver corretto eventuali bande dubbie confrontando le letture complementari ottenute con i 2 primers, venivano poi inserite per via telematica, tramite apposito sito internet (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html>), al fine di confrontarle con quelle presenti nelle più aggiornate banche dati internazionali.

In alcuni casi, per le identificazioni più difficoltose, ci si è avvalsi del servizio di riconoscimento, sia su basi morfologiche che molecolari, del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands).

- Quantificazione delle tipologie fungine

Al fine di poter elaborare statisticamente i dati sulla presenza dei vari microrganismi, si è proceduto di volta in volta a valutare l'incidenza quantitativa delle varie tipologie fungine riferibili ai vari generi o specie.

Allo scopo sono stati tenuti in considerazione due parametri: la "frequenza di isolamento" e la "densità di isolamento". Per "frequenza di isolamento" si intende la percentuale di isolati fungini ricavati per una determinata categoria, rispetto al numero di campioni (frammenti) esaminati. In questo caso vengono presi in considerazione anche i campioni che non hanno prodotto colonie (isolati muti). La frequenza di isolamento è indicativa della presenza nei tessuti dei vari insediamenti fungini. La "densità di isolamento" è rappresentata dal numero di isolati di una determinata tipologia fungina (genere o specie) rispetto al numero degli isolati totali ottenuti. Rappresenta l'incidenza relativa ai vari taxa fungini, considerati nei rapporti reciproci tra loro. Può risultare utile per fare dei confronti tra organi, piante e siti territoriali.

3.1.2. INDAGINI SULLA PATOGENICITÀ DEI MICRORGANISMI RISCONTRATI

Tali ricerche sono state rivolte a quei microrganismi risultati più ricorrenti nelle varie serie di isolamenti e pertanto presumibilmente coinvolti nell'eziologia del cancro e precisamente: il batterio *Brenneria nigrifluens* ed i patogeni fungini *Botryosphaeria* sp., *Fusarium solani*, *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaeria* sp..

Dopo prove preliminari, nei saggi definitivi sono stati esclusi *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaeria* sp. che non mostrano significativa capacità colonizzatrice. Parimenti, per le 3 specie di *Botryosphaeria* rilevate, dimostrando medesima capacità "patogenica", per i saggi definitivi, al fine di ridurre la mole di lavoro, è stata utilizzata solo *Botryosphaeria parva* Pennycook & Samuels.

La patogenicità di tali microrganismi è stata indagata, attraverso inoculazioni artificiali (Fig.6), su piante di *Juglans regia* di tre anni appositamente allevate in vaso. I funghi sono stati inoculati inserendo un dischetto di micelio di 4 mm di diametro direttamente a contatto con il cambio, mentre per il batterio è stata iniettata, a mezzo di siringa sterile, in microferite opportunamente provocate con ago, una sospensione batterica molto concentrata ottenuta stemperando aliquote di patina batterica in piccoli quantitativi di acqua sterile. Per il controllo delle alterazioni indotte, sia nel caso della prova con i funghi che in quella con il batterio, ogni piantina è stata scortecciata a partire dal punto di inoculazione, misurando l'estensione (come lunghezza massima) delle alterazioni intese sia come necrosi vere e proprie che come imbrunimenti dei tessuti.

A livello operativo, al fine di poter programmare i confronti definitivi è stata preliminarmente condotta una prima serie di inoculazioni (orientativamente un centinaio di inoculazioni considerando complessivamente una cinquantina di piante), volta a verificare l'evoluzione nel tempo delle necrosi prodotte dai diversi patogeni, considerati separatamente o combinati tra loro. L'esperimento finale, articolato sulla base dei risultati di quello preliminare, ha mirato invece a quantificare la reale capacità di tali patogeni (individualmente o combinati tra loro) di produrre necrosi corticali nelle piantine, utilizzando un numero statisticamente valido di repliche. Le tesi contemplate, elencate nella tabella 3, comprendevano 16 diverse combinazioni di inoculazioni messe a confronto con il testimone (caratterizzato da sola incisione, senza inoculazione).

Una prima serie di combinazioni comprendeva sette tesi diverse di inoculazioni contemporanee, effettuate il 15 Maggio 2007, che mettevano a confronto i tre patogeni, utilizzati singolarmente, combinati due a due o uniti tutti e tre insieme.

Una seconda serie di 5 tesi prevedeva inoculazioni effettuate in due tempi, in data 15 Maggio, con i due funghi, soli o combinati tra loro, ed in data 25 Maggio, aggiungendo il

fungo mancante o il batterio. La terza serie di combinazioni, di tre tesi, prevedeva infine una inoculazione con *B. nigrifluens* il 15 Maggio, aggiungendo poi i due funghi, singolarmente o insieme, in data 30 Maggio, dopo che il batterio si era in parte ormai diffuso. Per le inoculazioni sono state utilizzate piantine di tre anni di *J. regia* di medesima provenienza, fornite dal vivaio Umbraflor di Spello. Nel complesso sono state effettuate 86 inoculazioni, 6 repliche per tesi, effettuate *at random* su altrettante piantine. I controlli, distruttivi, sono stati effettuati in data 20 Giugno misurando la lunghezza degli imbrunimenti (batterio) o delle necrosi (funghi) lungo l'interno del fusto e rilevando ogni particolare manifestazione sintomatica.

Ai fini dell'analisi dei risultati, oltre ai rilievi sui sintomi, per ciascuna tesi sono stati effettuati isolamenti al fine di verificare la persistenza dei patogeni inoculati.

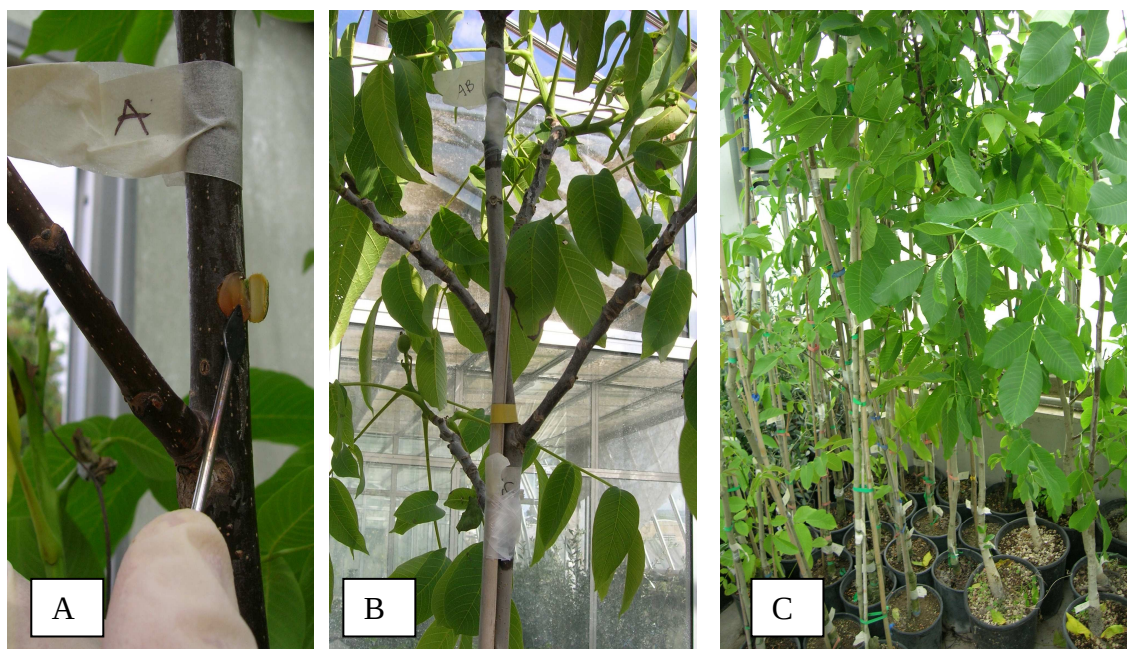


Fig.6. Esempi di inoculazioni artificiali in serra su giovani piantine di 3 anni di *Juglans regia*. In A, un dettaglio dell'inoculazione con *Fusarium solani*; in B, zona di inoculazione sigillata con parafilm; in C, una visione globale del lavoro.

INOCULAZIONI			
Tesi	15 Maggio	25 Maggio	30 maggio
1	-	-	-
2	<i>Fusarium</i>	-	-
3	<i>Botryosphaeria</i>	-	-
4	<i>Brenneria</i>	-	-
5	<i>Fusarium</i> + <i>Botryosphaeria</i>	-	-
6	<i>Fusarium</i> + <i>Brenneria</i>	-	-
7	<i>Brenneria</i> + <i>Botryosphaeria</i>	-	-
8	<i>Fusarium</i> + <i>Botryosphaeria</i> + <i>Brenneria</i>	-	-
9	<i>Fusarium</i>	<i>Botryosphaeria</i>	-
10	<i>Fusarium</i>	<i>Brenneria</i>	-
11	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Brenneria</i>	-
12	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Fusarium</i>	-
13	<i>Fusarium</i> + <i>Botryosphaeria</i>	<i>Brenneria</i>	-
14	<i>Brenneria</i>	-	<i>Fusarium</i>
15	<i>Brenneria</i>	-	<i>Botryosphaeria</i>
16	<i>Brenneria</i>	-	<i>Fusarium</i> + <i>Botryosphaeria</i>

Tab.3. Inoculazioni artificiali, su piantine di *Juglans regia*, del batterio *Brenneria nigrifluens* e dei funghi *Botryosphaeria parva* e *Fusarium solani*, isolati o combinati tra loro. Elenco delle tesi considerate sulla base della combinazione dei differenti microrganismi e delle date di inoculazione.

3.1.3. ANALOGIA CON I PATOGENI ASSOCIATI AI CANCRI RAMEALI

Dette indagini avevano lo scopo di verificare eventuali analogie e relazioni tra gli agenti del cancro del tronco con quelli dei cancri rameali, notoriamente molto diffusi su piante di noce, in particolare quelli più annosi.

All'uopo sono stati scelti l'impianto di Cisterna di Latina (15 anni) e quello di San Matteo delle Chiaviche (9 anni), entrambi fortemente colpiti da cancro e contemporaneamente da numerosi cancri rameali.

Tuttavia, al fine di analizzare l'analogia eziologica, o meno, anche di cancri rameali presenti in noceti esenti da cancro al tronco, le indagini sono state estese ad altre 4 piantagioni dell'Italia centro-settentrionale, di età compresa tra 10 e 15 anni, non colpiti dalla malattia. Più precisamente sono stati prescelti noceti commerciali con consistente presenza di cancri rameali, 3 nell'Italia centrale, Fassinoro di Rieti e Viterbo nel Lazio, Alleroni di Terni in Umbria, ed uno nell'Italia settentrionale, Casale Monferrato di Alessandria, in Piemonte. Nel fare gli isolamenti sono state considerate 3 diverse tipologie (A-B-C) di cancri rameali, rappresentative dei diversi attacchi, le cui caratteristiche morfologiche (Fig.7) sono sintetizzate nella tabella 4.

Considerando i vari cancri, da tasselli di tessuti alterati, prelevati a differente profondità, soprattutto ai loro margini, sono stati effettuati isolamenti, sia fungini che batterici. Complessivamente, in ogni impianto sono stati considerati 15 cancri per ciascuna delle 3 tipologie morfologiche.

TIPOLOGIA DEI CANCRI	DESCRIZIONE
A	Cancro aperto con esposizione del cambio, profonde alterazioni dei tessuti sottocorticali. Deboli segni di cicatrizzazione.
B	Disseccamenti e necrosi apicali di rami di uno o due anni.
C	Fessurazioni più o meno profonde, con marcati segni di cicatrizzazione marginali.

Tab.4. Tipologie di cancri rameali (A-B-C) considerati negli isolamenti.

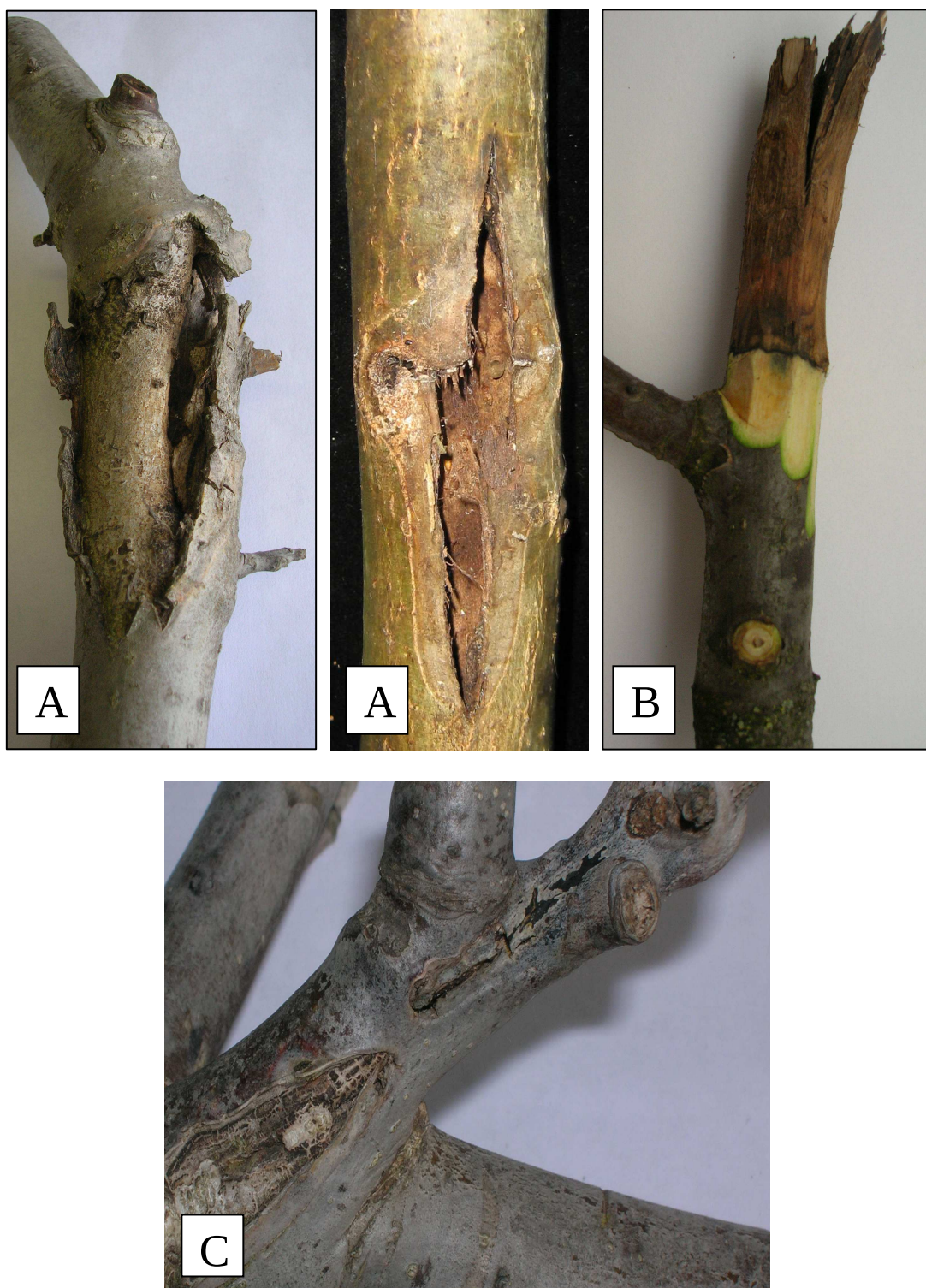


Fig.7. Aspetti morfologici delle tre tipologie di cancri rameali (A-B-C) oggetto di isolamento negli impianti considerati.

3.1.4. *HABITUS* ENDOFITICO DEI PRESUNTI AGENTI DEL CANCRO DEL FUSTO

Poiché alcuni generi patogeni riscontrati nei cancri in studio, su altri ospiti hanno in più casi manifestato un *habitus* endofitico, cioè un prolungato insediamento asintomatico nei tessuti di piante sane (vedi capitolo “endofiti patogeni”), nella primavera del 2007 si è voluto verificare se anche per questa malattia essi potevano vantare analogo comportamento.

In primo luogo, nell’impianto di Cisterna di Latina, è stato effettuato un accurato confronto tra microrganismi fungini isolati dalla zona cancerosa con quelli isolati da aree sane limitrofe, a distanza di 10-20-30-40 e 140 cm dai cancri stessi. All’uopo sono stati prelevati appositi tasselli di corteccia profondi 3-4 cm del diametro di altrettanti cm. Al fine di evidenziare la localizzazione dei microrganismi nei vari strati della corteccia, detti tasselli sono stati suddivisi radialmente in tre strati di profondità dal ritidoma: 0,3-1 cm; 1-1,5 cm ed 1,5-2 cm. Al fine di verificare se l’eventuale presenza dei patogeni nelle varie zone esaminate era latente o attiva, in tutti i casi, una parte di detti tasselli è stata posta ad incubare in camera umida, in modo da favorire lo sviluppo di eventuali miceli attivi.

Una seconda serie di isolamenti ha riguardato piante asintomatiche (sempre di *J. Regia*) di tre noceti con presenza di cancro e precisamente gli impianti di Cisterna di Latina, Roma e Ravenna, nonché quattro noceti esenti dalla malattia, precisamente gli impianti di Fassino (Rieti), Alleron (Terni), Viterbo e Casale Monferrato (Alessandria). Da tali piante sono stati considerati sia il fusto, prelevando tasselli corticali di 3-4 cm di diametro e profondi 2-3 cm, sia (onde rilevare l’eventuale *habitus* endofitico anche degli agenti di cancri rameali, apparsi in parte analoghi a quelli del cancro del tronco) i rami di 1-2 e 3 anni, prelevando piccoli tasselli di corteccia di 0,5 cm di diametro e 0,5 cm di profondità.

Per analizzare il fenomeno anche su piante giovani, sono state infine effettuate delle analisi su piantine di tre anni provenienti da vivai, uno situato nelle vicinanze di numerose piante adulte di noce, il Vivaio Conti di Rieti, e due in totale assenza di queste, il Vivaio Michelini di Viterbo ed il vivaio Umbraflor di Spello (Perugia).

In questo caso sono stati prelevati tasselli corticali (3 per pianta) di 0,8 cm di diametro e profondi 0,5 cm, dalla parte medio-basale del fusto di almeno 30 piante per vivaio.

Metodologia di isolamento. Per quanto concerne gli isolamenti dei funghi endofiti il protocollo per la sterilizzazione dei tasselli è stato articolato in cinque passaggi: 1 minuto in alcool a 96°, 3 minuti in ipoclorito di sodio al 3,5%, 30 secondi in alcool a 96° e successivi due risciacqui in abbondante acqua sterile (ANSELMINI, 2004). Dai tasselli così sterilizzati sotto cappa sterile, si procedeva a ricavare piccoli frammenti di tessuto (2-3mm x 0,5 mm), che venivano poi posti in PDA in capsule Petri, ed incubati in termostato a 24±1°C. Dalle colonie fungine che via via si sviluppavano si procedeva a reisolamenti per ottenere colture

in purezza con successivo riconoscimento sia morfologico che molecolare. Si annotavano altresì il numero di frammenti che non originavano colonie (isolamenti muti). La quantificazione degli isolati è stata espressa come “frequenza di isolamento”, intesa come la percentuale di una determinata tipologia rispetto al numero di campioni totali posti ad incubare.

Naturalmente, particolare accuratezza nella identificazione e nella valutazione quantitativa veniva riposta per quei microrganismi risultati verosimilmente coinvolti nella malattia.

3.1.5. ANTAGONISMO TRA I MICRORGANISMI RISCONTRATI NEI CANCRI

Allo scopo di verificare eventuali interazioni (antagonismo o sinergismo) tra i più ricorrenti microrganismi rilevati nei cancri, sono state effettuate apposite indagini mettendo a reciproco confronto il batterio *Brenneria nigrifluens* e le 4 specie fungine più ricorrenti, precisamente: *Botryosphaeria parva*, *Fusarium solani*, *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaeria* sp.. All'uopo, i 5 microrganismi sono stati posti a confronto tra loro, due a due, tramite colture duali e filtrati culturali.

3.1.5.1. Saggi attraverso colture duali

Interazioni Fungo- Fungo. I saggi sono stati effettuati in capsule Petri di 15 cm di diametro, nelle quali sono stati inseriti 2 dischetti (*plugs*) di PDA colonizzati da micelio della grandezza di 4 mm, ad una distanza tra loro di 45 mm. Le capsule così preparate sono state poi poste ad incubare in termostato a 25°C. Giornalmente sono state prese le misure di crescita (in mm), nelle quattro direzioni di crescita del fungo, fino a quando i due miceli non venivano in contatto.

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 nella direzione verso l'antagonista;

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

Nello specifico sono state saggiate le seguenti combinazioni fungine:

1. *Botryosphaeria parva* – *Phomopsis juglandina*;
2. *Botryosphaeria parva* – *Fusarium solani*;
3. *Botryosphaeria parva* – *Paraphaeosphaeria* sp.;
4. *Phomopsis juglandina* – *Fusarium solani*;
5. *Paraphaeosphaeria* sp. – *Fusarium solani*;
6. *Paraphaeosphaeria* sp. – *Phomopsis juglandina*.

Per ogni tipologia di coltura duale sono state effettuate 20 repliche. Alle suddette tesi sono state aggiunte le 4 tesi testimone, con capsule contenenti un solo microrganismo, da riferimento.

Interazioni Fungo - Batterio. Da colonie di *Brenneria nigrifluens*, cresciute per 48 ore su ANS, si è ottenuta una sospensione di 10^8 ufc/ml, ottenuti per confronto con una retta di taratura di una concentrazione di densità nota. Una aliquota di 100 µl di tale sospensione batterica è stata posta in capsula Petri contenente ANS. Nella medesima è stato inserito, ad una distanza di 4 cm un dischetto di PDA, colonizzato dal fungo, della grandezza di 4 mm. L'eventuale azione antagonistica di *Brenneria nigrifluens* è stata saggiata contro i funghi *Botryosphaeria parva*, *Fusarium solani*, *Phomopsis juglandina* e *Paraconiothyrium brasilense* (= *Paraphaeosphaeria* sp.). Giornalmente sono state valutate le interazioni e le eventuali inibizioni tra funghi e batterio mediante la misurazione della crescita del micelio in direzione del batterio. Anche in questo caso sono state effettuate 20 repliche per ogni coltura duale.

3.1.5.2. Saggi attraverso filtrati Colturali

Per la preparazione dei filtrati colturali è stato usato Czapek Dox Liquid Medium (Modified) (Oxoid), terreno liquido a base azotata, denominato CM95, particolarmente indicato per la crescita di funghi che utilizzano sodio nitrato. Su tale terreno, utilizzato in quantità di 33g/litro, sono stati posti ad incubare plug di PDA colonizzati da micelio, posti in termostato ad una temperatura costante di 27° per 4 settimane. I funghi analizzati sono stati: *Botryosphaeria parva*, *Fusarium solani*, *Phomopsis juglandina* e *Pharaphaeosphaeria* sp.. Il filtrato colturale è stato ottenuto tramite l'utilizzo di appositi filtri. Per ciascun patogeno le prove di crescita sono state condotte in capsule Petri contenenti substrato agarizzato addizionato di aliquote di filtrato nelle 3 diverse proporzioni: 1:3; 1:1; 3:1. Al centro della capsula è stato posto un dischetto (di 4 mm di diametro) di colonia fungina, sviluppata su PDA. L'insieme delle capsule così inoculate, insieme ai testimoni senza filtrato colturale, sono state poste ad incubare in termostato, al buio a 25°C. E' stato indi seguito lo sviluppo delle colonie dei diversi funghi, misurandone quotidianamente il diametro e conducendo osservazioni sul loro aspetto, in confronto con il testimone.

3.2. INDAGINI SUI FATTORI PREDISponentI LA MALATTIA

Nei tre noceti di Cisterna di Latina, San Matteo delle Chiaviche di Mantova e Sezzadio di Alessandria, particolarmente colpiti dalla malattia, si è cercato di verificare l'eventuale influenza sull'incidenza dei cancri da parte della densità delle piante o di alcune cure colturali quali concimazioni ed irrigazioni. Poiché in generale era sembrato che nei vari impianti i cancri avessero un preferenziale orientamento sul fusto, è stato condotto un apposito controllo anche su questo aspetto. Infine, allo scopo di individuare ogni eventuale elemento che avesse potuto condizionare l'insorgere o lo sviluppo del cancro al fusto, per ciascuna piantagione malata sotto controllo, si è cercato di rilevare ogni elemento che potesse essere correlabile con la malattia, ogni fattore che potesse essere stato causa di stress alle piante o che avesse potuto creare peculiari condizioni ambientali favorevoli agli attacchi.

3.2.1. DENSITÀ DELLE PIANTE

Per le osservazioni su questo aspetto ci si è avvalsi dell'impianto di San Matteo delle Chiaviche (Fig.8-Tab.5), in Provincia di Mantova e quello di Sezzadio, in Provincia di Alessandria, entrambi finalizzati, tra l'altro, a verificare l'efficacia di piante accompagnatrici consociate a *Juglans regia* sullo sviluppo e la ramosità delle piante. La prima piantagione, di 3 ettari di superficie e di 12 anni di età, è costituita da lunghi filari di cultivar diverse di *Juglans regia*, che vanno a costituire un lungo rettangolo suddiviso in quattro aree di analoga superficie (tesi), con una diversa densità delle piante in relazione alla differenziata consociazione con specie consociatrici. Una prima area occupata solo da *J. regia* presenta un sesto d'impianto di 8x8 m; una seconda parcella comprende *J. regia* consociato con ontano, con sesto d'impianto tra le piante (ontano compreso) di 4x4 m; una terza area invece comprende piante di *J. regia*, intercalate da *Alnus*, *Eleagnus* e *Sambucus* (specie di accompagnamento) con sesto d'impianto tra le piante di 4x2 m. Infine, un'ultima parcella, presenta una densità uguale alla precedente (4x2 m), ma con l'*Eleagnus* sostituito da *Fraxinus*.

Il secondo impianto (Fig.9), di 13 anni di età, comprende 2 appezzamenti di terreno attigui (A e B), di analoga giacitura e fertilità, di circa 1 ettaro cadauno, dove in uno sono presenti piante di *Juglans regia* con un sesto d'impianto (spaziatura) di 7x7 m, nell'altro dette piante, sempre con sesto d'impianto di 7x7 m, sono consociate con ciliegio e sambuco inseriti nei filari e ontano tra le file. La spaziatura scende così a 3,5x3,5 m.

In entrambi gli impianti è stata valutata l'intensità di attacco della malattia contando su ciascuna pianta il numero di cancri presenti sui primi tre metri di tronco. Gli ultimi rilievi sono stati effettuati nell'agosto 2008.

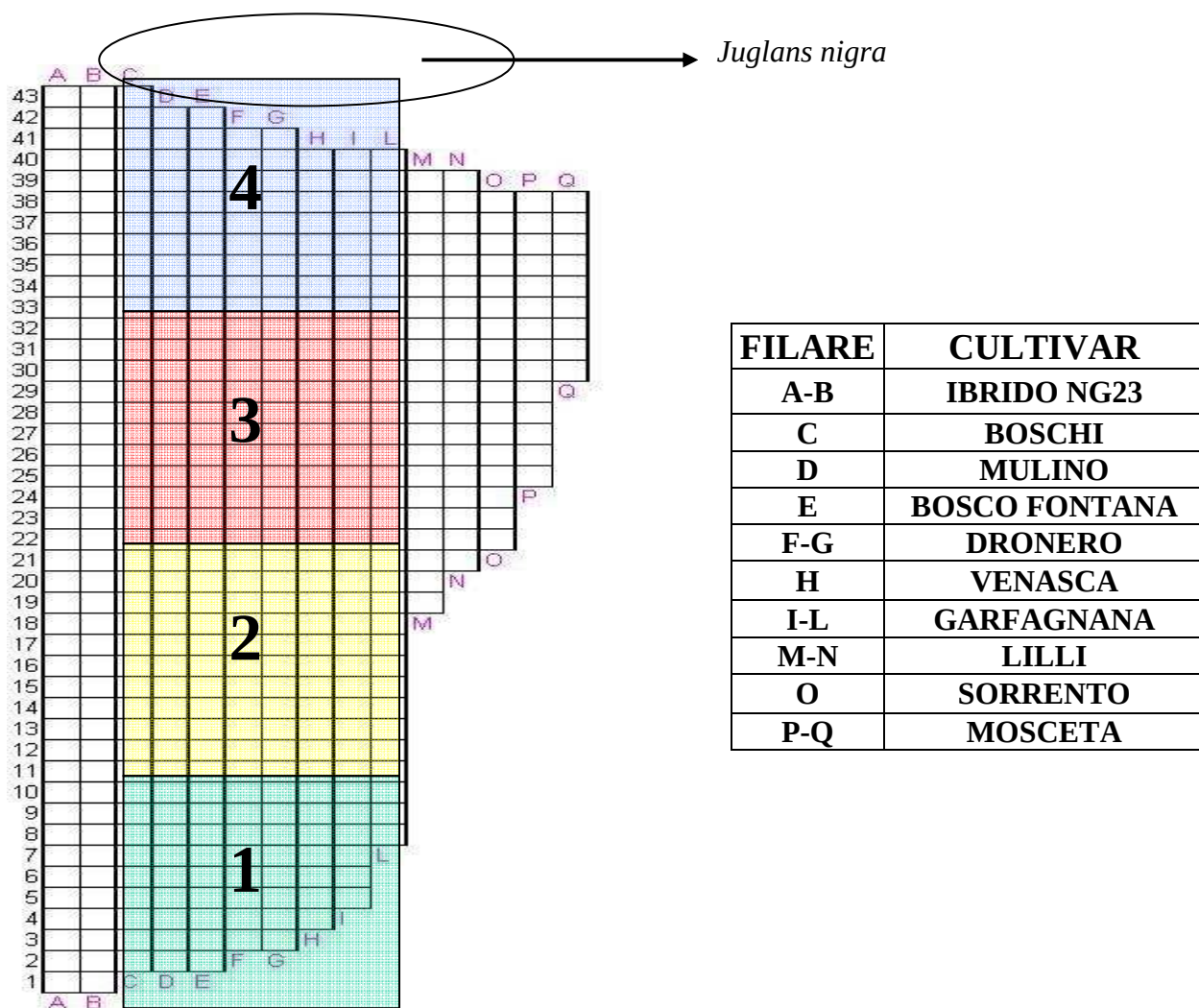


Fig. 8. Planimetria dell'impianto sperimentale di San Matteo delle Chiaviche (MN), con indicate le 4 aree analizzate e le cultivars presenti nei relativi filari.

Parcelle	Consociazioni	Sesto d'impianto (mxm)
1	<i>J. regia</i>	8x8
2	<i>J. regia</i> + <i>Alnus sp.</i>	4x4
3	<i>J. regia</i> + <i>Alnus sp.</i> + <i>Sambucus</i> + <i>Eleagnus</i>	4x2
4	<i>J. regia</i> + <i>Alnus</i> + <i>Sambucus</i> + <i>Eleagnus</i>	4x2

Tab.5. Consociazioni presenti nelle 4 parcelle dell'impianto sperimentale di San Matteo delle Chiaviche (MN), di cui alla figura 9.

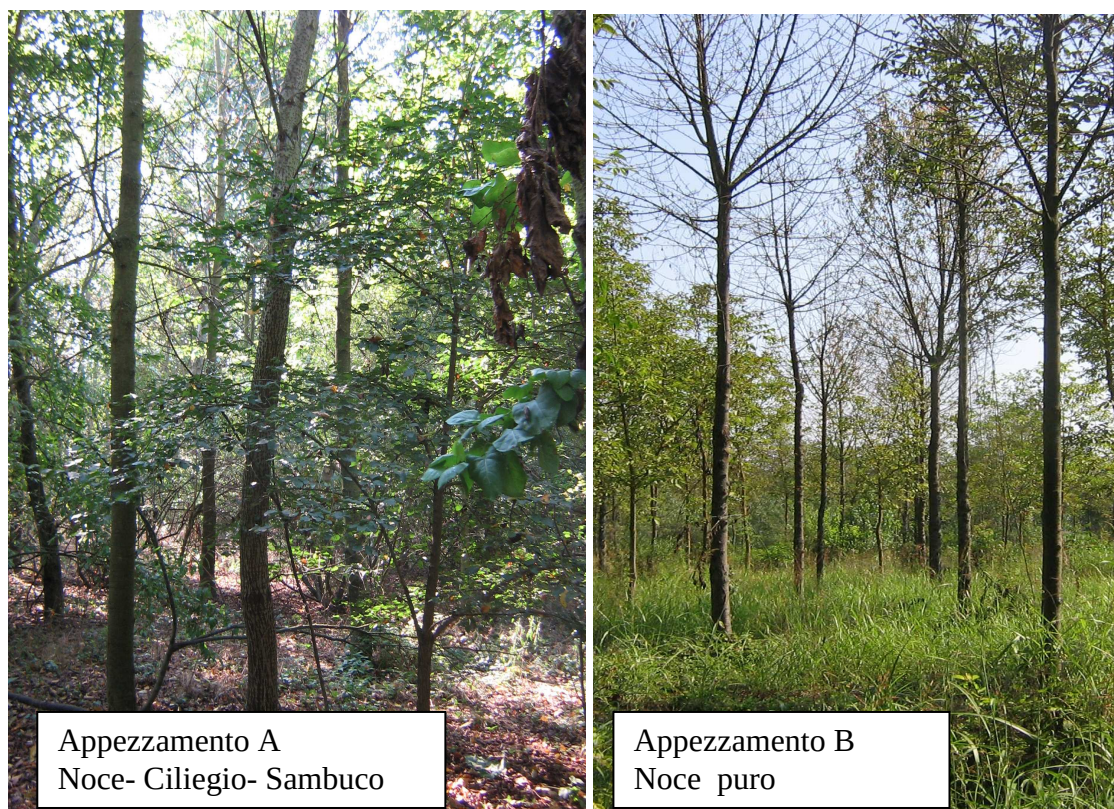


Fig.9. Impianto di *Juglans regia* di Sezzadio (Alessandria). In A, piante di *Juglans regia* consociate a ciliegio e sambuco (sesti d'impianto 3,5 x 3,5 m); in B, impianto puro di *Juglans regia* (sesto d'impianto 7 x 7 m).

3.2.2. CONCIMAZIONI ED IRRIGAZIONI

L'analisi di tali fattori è stata possibile presso i noceti di Cisterna di Latina (Fig. 10). Trattasi di tre impianti (A, B e C) coetanei, di 16 anni, attigui, di equivalente superficie (circa 1,5 ettari), di forma rettangolare (80 x 300 m), costituiti con piantine di *Juglans regia* di medesima provenienza, con medesimo sesto d'impianto (8x8 m) e caratterizzati da simile terreno, abbastanza omogeneo.

Appartenenti a tre diversi proprietari, detti impianti hanno però subito trattamenti selvicolturali molto diversi tra loro, e precisamente:

1. impianto A, mai concimato, rarissimamente irrigato e saltuariamente diserbato;
2. impianto B, annualmente ben concimato e ben irrigato, con frequenti sarchiature che hanno garantito una buona eliminazione delle malerbe;
3. impianto C, concimato in maniera modesta, sottoposto ad irrigazione di soccorso ed a saltuarie sarchiature dell'interfilare.

I tre impianti sono stati sottoposti annualmente, oltrechè a rilievi sul diametro (a petto d'uomo) delle piante, ad una valutazione dell'incidenza della malattia, contando su ciascuna pianta il numero di necrosi nei primi tre metri di fusto.

Esposizione dei cancri sul tronco. Per verificare se i cancri fossero distribuiti sui fusti *at random* o piuttosto avessero una esposizione preferenziale, su ciascuna pianta è stata altresì indicata l'esposizione dei vari cancri, facendo riferimento ai punti cardinali.

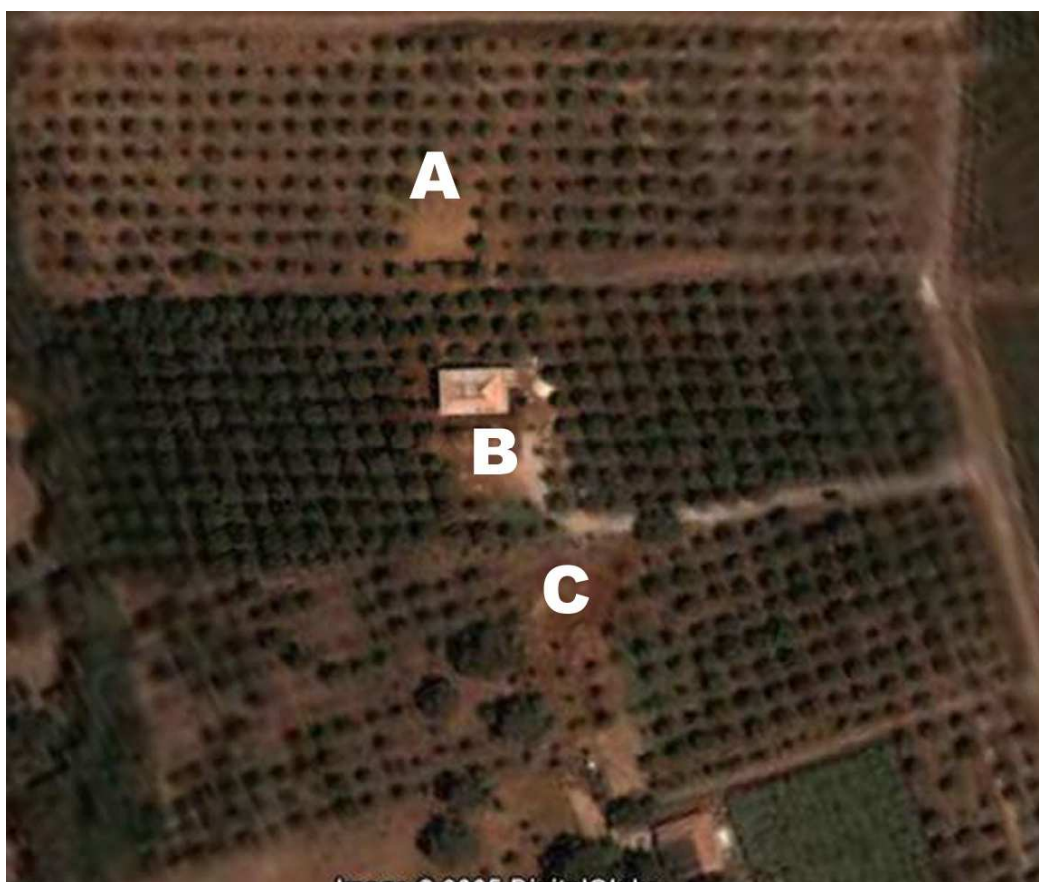


Fig. 10. Cisterna di Latina, Luglio 2008. Visione aerea dei tre impianti di noce sottoposti a concimazioni ed irrigazioni differenziate: A) mai concimato e rarissimamente irrigato; B) annualmente ben concimato e ben irrigato; C) concimato in maniera modesta, sottoposto a sole irrigazione di soccorso (Foto da Google Earth).

3.2.3. ALTRI FATTORI

Al fine di individuare ogni probabile causa che possa predisporre gli attacchi del cancro, per ogni impianto colpito sotto nostra osservazione si è cercato di analizzare le situazioni stazionali e colturali, nonché ogni altro eventuale fattore ritenuto correlabile con la malattia. Sono stati in particolari rilevati: età, sesto d'impianto, diametro medio, vigore delle piante, terreno (ostile-discreto-buono), consociazioni con altre specie, qualità delle cure colturali ed altri eventuali fattori di stress alle piante (inondazioni, carenze nutritive, stress idrico, attacchi parassitari ecc.). I dati raccolti, riportati nella tabella 1, sono stati confrontati con l'incidenza della malattia nei rispettivi impianti.

3.3. INDAGINI SULLA RESISTENZA GENETICA ALLA MALATTIA

Al fine di valutare una eventuale differenziata resistenza da parte di materiale genetico diverso alla malattia del cancro del fusto, sono state effettuate 2 serie di indagini distinte: una prima, in campo, sfruttando l'esistenza di piantagioni pluriclonali o pluricultivars colpite dalla malattia; una seconda, in ambiente controllato, attraverso inoculazioni artificiali su talee di materiale genetico diverso.

3.3.1. RILIEVI IN CAMPO

Come accennato, per dette indagini ci si è avvalsi di impianti di noce già esistenti, colpiti dalla malattia, comprendenti cloni o cultivars differenti di *J. regia*, in confronto o meno con *J. nigra* e l'ibrido francese NG 23, oppure parcelle di *J. nigra* in confronto con parcelle di *J. regia*. Quantunque detti impianti non presentino schemi sperimentali ideati per gli studi in oggetto, essendo i soli a disposizione, si è tentato ugualmente di analizzare il comportamento del materiale presente verso la malattia, nella speranza di ottenere almeno indicazioni orientative.

a) Impianto sperimentale di San Matteo delle Chiaviche di Mantova

Trattasi di una piantagione costituita da 9 cultivars diverse di *Juglans regia* (Boschi, Bosco Fontana, Venasca, Mulino, Sorrento, Lilli, Droenero, Mosceta e Garfagnana), in confronto con l'ibrido NG23 (*J. regia* x *J. nigra*) e *Juglans nigra*. L'impianto è stato colpito dalla malattia a partire dal 2002; i controlli sono stati effettuati nel 2005 e nel 2008 contando, per ciascuna pianta, i cancri presenti sui primi 3 metri di fusto. Ciascuna cultivar è presente in parcelle mono (8-12 piante) o bifilari (16-22 piante), con 4 repliche, ognuna delle quali caratterizzata da consociazione di diversa intensità con piante accompagnatrici (vedi paragrafo 3.2.1).

b) Impianto pluriclonale di Rieti

Trattasi di una grande piantagione commerciale costituita nel 2000 (Fig.11), con 4 cloni (Umbra, Franquette, Parisienne e Midland) di *J. regia*, disposti in altrettante aree limitrofe, con piante (almeno 200 per clone) spaziate di 7x8 m. Quantunque senza repliche, l'omogeneità del terreno relativa all'intero impianto fa ritenere che i confronti siano da ritenere sufficientemente attendibili, almeno a livello orientativo. I controlli sono stati condotti nell'autunno del 2007, secondo le metodologie sopra descritte.

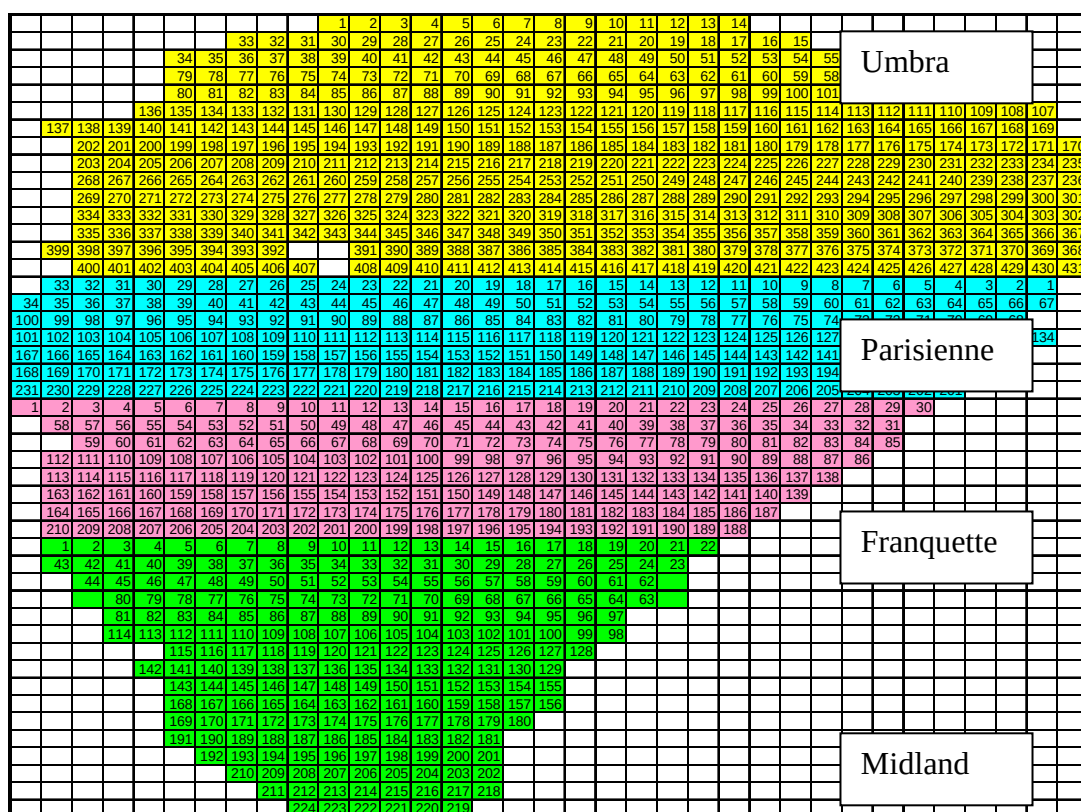


Fig. 11. Impianto commerciale di Rieti con i relativi cloni di *Juglans regia* ivi presenti.

c) Confronti tra *Juglans regia* e *Juglans nigra*

Questo confronto è stato possibile nelle piantagioni commerciali di Cisterna di Latina e di Loreto, dove in entrambe era presente una parcella di *J. nigra* di circa 50 piante ed una analoga di *J. regia* (medesima età, qualità di suolo, densità delle piante e tecniche colturali). Nell'impianto di Cisterna di Latina (Tab.1), costituito nel 1996, la malattia è comparsa nel 2002 ed i rilievi relativi all'incidenza (vedi sopra) sono stati condotti nel 2005, nel 2006 e nel 2008.

Nell'impianto di Loreto (Tab.1), costituito nel 1994, la malattia comparve nel 2000-2001 ed i controlli sono stati effettuati nel 2004.

3.3.2. VALUTAZIONI ATTRAVERSO INOCULAZIONI ARTIFICIALI IN SERRA

Approfittando del diversificato materiale genetico presente in 3 impianti sperimentali del Centro di Ricerca in Agricoltura (CRA) del Ministero dell'Agricoltura e Foreste, sono state condotte 3 serie distinte di ricerche volte rispettivamente a valutare:

a) Resistenza di cultivars diverse di *Juglans regia* in confronto a *Juglans nigra* ed un loro ibrido

Attingendo al materiale presente nell'impianto di San Matteo delle Chiaviche, già sotto controllo per indagini in campo (vedi sopra), questi saggi avevano l'obiettivo di verificare il comportamento, tramite inoculazioni artificiali, delle quattro cultivars Bosco fontana, Venasca, Boschi e Sorrento, dell'ibrido NG 23 e di *J. Nigra*, in modo da poterne confrontare i risultati con il comportamento in campo.

b) Resistenza di *Juglans nigra* in confronto con *Juglans regia* e relativi ibridi

Il materiale di questi saggi è stato raccolto presso l'Impianto sperimentale dell'azienda Ovine, comprendente piante di *Juglans regia*, *Juglans nigra* e gli ibridi NG23 ed MJ 209, derivati dall'incrocio di *J. regia* rispettivamente con *J. nigra* e *J. major*. Le prove sono state effettuate nel Giugno 2007.

c) Resistenza di specie diverse di *Juglans* in confronto con due generi simili, *Carya* e *Prerocarya*

Il materiale per queste indagini è stato raccolto presso lo *Juglandetum* presente nell'azienda Cesurni di Tivoli (Roma). La piantagione (Fig.12) fu costituita nel 1992 dall'allora Centro di Ricerca Agricola e Forestale dell'ENCC, oggi afferente al Centro di Ricerca per le Pianta Fuori Foresta del CRA di Casale Monferrato in provincia di Alessandria.

Sono state prese in considerazione 7 differenti specie di *Juglans*, e precisamente *J. regia*, *J. nigra*, *J. cinerea*, *J. sieboldiana*, *J. cordiformis*, *J. hindsii*, e *J. microcarpa* e tre specie appartenenti a generi affini, *Carya illinoensis*, *Pterocarya fraxinifolia* e *Pterocarya stenoptera*. Le prove sono state condotte nel Giugno 2008.

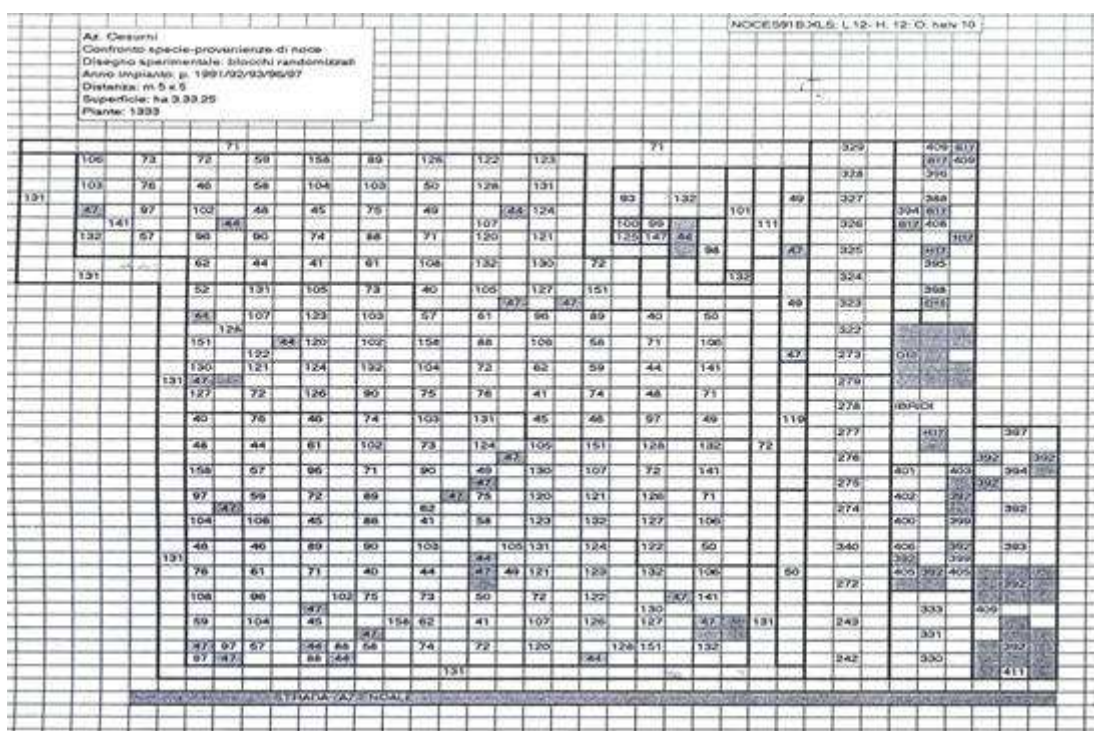


Fig.12. Tivoli, Azienda Cesurni (CRA). Planimetria dello Juglandetum. I numeri corrispondono a specie diverse ed a generi affini di *Juglans* (Vedi Allegato A).

3.3.2.1 Patogeni considerati, metodologie per le inoculazioni e per i controlli

Per le inoculazioni sono stati preliminarmente presi in esame il batterio *Brenneria nigrifluens* (Fig.13) e i funghi *Botriosphaeria* spp. (Fig.14), *Fusarium solani*, *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaeria* sp. microrganismi che, dalle precedenti ricerche, sono risultati tra i più probabili responsabili della malattia. Tenuta presente la scarsa patogenicità riscontrata da *Phomopsis juglandina* e da *Paraphaeosphaeria* sp., nelle successive prove non sono stati più considerati.

Parimenti, poiché nelle prove preliminari le tre specie di *Botriosphaeria* (*B. parva*, *B. dothidea* e *B. obtusa*) mostravano analoga capacità “patogenetica”, per le serie di ricerche definitive è stata utilizzata solo la specie *B. parva*.

In ogni caso per tutte le specie sono stati utilizzati isolati provenienti da cancri attivi su fusti di *Juglans regia* dell’impianto di Cisterna di Latina, caratterizzato da attacchi tra i più gravi e ripetuti in Italia.

I vari patogeni sono stati inoculati artificialmente in laboratorio, su talee (1,5-2 cm di diametro e circa 40 cm di lunghezza) opportunamente allestito in vaso. In particolare, sono state utilizzate 5 talee per pianta, 8 piante (genotipo) per cultivars, specie o genere. I funghi sono stati inoculati inserendo un dischetto di micelio di 4 mm di diametro direttamente a contatto con il cambio, mentre per il batterio sono state effettuate due distinte tipologie di

inoculazione per ciascuna talea, nell'una iniettando una patina batterica in microferite opportunamente provocate con ago, nell'altra tamponando una sospensione batterica sul taglio fresco della sommità della talea. Per il controllo delle alterazioni indotte, sia nel caso della prova con i funghi che in quella con i batteri, ogni talea è stata scortecciata a partire dal punto di inoculazione, misurando l'estensione (come lunghezza massima) delle alterazioni intese sia come necrosi vere e proprie che come imbrunimenti dei tessuti.

Per buona parte degli impianti considerati è stato possibile reperire i dati climatici (temperatura media, massima e minima e precipitazioni giornaliere) relativi alla storia metereologica più vicina.



Fig.13. Inoculazioni artificiali con il batterio *Brenneria nigrifluens* su talee di noce.

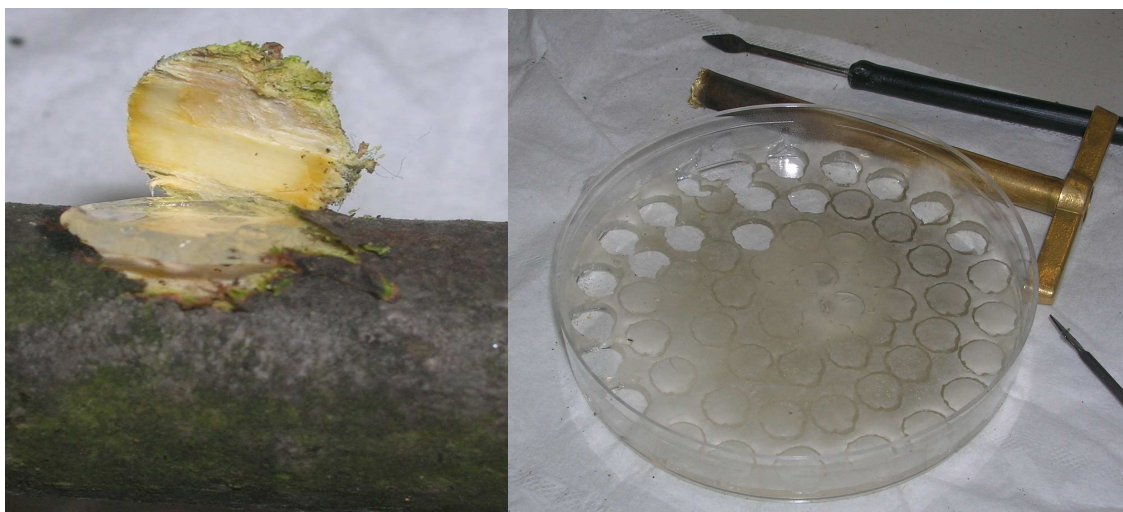


Fig.14. Inoculazioni artificiali di *Botryosphaeria parva* su talea di noce.

4. RISULTATI

Le ricerche hanno portato ad interessanti risultati, sia per quanto concerne il quadro eziologico della malattia ed i fattori condizionanti, sia nei riguardi della resistenza dei vari *Juglans* o relative cultivars. Essa ci ha permesso peraltro di poter osservare attentamente la sintomatologia con tutte le sue sfumature e le varie evoluzioni nel tempo.

In appresso, dopo aver sintetizzato la sintomatologia della malattia, nella sua evoluzione nel tempo, verranno illustrati i risultati ottenuti relativi ai vari obiettivi prefissati.

Quantunque rilevanti, almeno ove possibile, omettiamo di riportare i dati climatici delle varie stazioni considerate in quanto non sono risultati di particolare aiuto nelle interpretazioni dei vari risultati.

4.1. QUADRO SINTOMATOLOGICO DELLA MALATTIA

Le alterazioni interessano il fusto o le grosse branche, senza alcuna distribuzione longitudinale prevalente. Talora, tuttavia, la malattia sembrerebbe prediligere la parte bassa del tronco ed una esposizione a sud-ovest (vedi capitolo 4.3.3.). Nella fase iniziale si manifesta con piccole macchie brunastre sul ritidoma, di 2-4 cm di diametro, leggermente concave, poco profonde, spesso molto scure, tra il color rossiccio ed il color inchiostro, associate a piccole emissioni di linfa, (Fig.15). Dette macchie sono talora numerose, anche vicine, spesso distribuite a grappolo (cluster) (Fig. 16 A), altre volte isolate, ma che nel tempo possono aumentare anche notevolmente di numero.

Con il passare del tempo le macchie si ingrandiscono; l'area di corteccia interessata, per il mancato accrescimento, si appiattisce o si avalla, con fessurazioni più o meno profonde e le necrosi sottocorticali si approfondiscono, fino ad interessare il legno interno (Fig.16 D).

Quando, come frequentemente avviene, gli attacchi si intensificano, soprattutto nella parte medio-basale del tronco, esse si mostrano sulla corteccia come grosse macchie frastagliate, contigue, nero-brunastre, da cui fuoriesce spesso linfa nerastra, che va ad imbrunire ampie zone del ritidoma (Fig. 16 C).

I tessuti sottostanti risultano fortemente anneriti e le necrosi incidono fortemente sui tessuti legnosi al di sotto degli strati corticali. Allo stadio terminale della malattia (Fig.17), nei casi più gravi, le zone necrosate vanno ad interessare ampie zone del fusto, con fasce morte, screpolate, o con cancri aperti, zone imbrunite (per l'emissione di linfa) ed evidenti tentativi di cicatrizzazione (Figg. 17 e 18). Talora dette necrosi possono interessare la zona basale delle grosse branche che, in qualche modo, possono anche disseccare (Fig.17).

La degenerazione dei tessuti si può approfondire al di sotto del cambio, andando ad interessare ampie parti del legno sottostante. Qualora le necrosi, per la confluenza dei

cancri, vanno ad interessare l'intera circonferenza, la pianta può andare incontro a forti deperimenti, talora fino alla morte.

Sezionando trasversalmente il tronco (Fig.19) si evidenziano le alterazioni interne, che appaiono come veri e propri diverticoli, altre con tipica forma a T rovesciata, di estensione varia, che ricorda quella della malattia delle macchie brune del pioppo (ANSELMINI E GOVI, 1996). La profondità radiale del legno alterato può oscillare da 1-2 fino anche a 3-4 cm., talvolta la cicatrizzazione può risultare notevolmente ostacolata dall'inglobamento nella lesione di porzioni più o meno consistenti di ritidoma o di tessuti disfatti (Fig.19). La mancanza della saldatura delle labbra porta spesso a dei veri e propri cancri aperti, spesso allungati e confluenti tra loro (Fig.17). In caso di ampie zone di corteccia morta, detti cancri appaiono particolarmente evidenti, spesso con distacco del ritidoma, talora con l'inserimento di insetti xilofagi. I danni provocati dalla malattia possono essere rilevanti. Anche piccoli cancri, compresi quelli cicatrizzati, per le alterazioni interne che inducono al fusto, modificano gravemente le caratteristiche strutturali e soprattutto estetiche del legno, penalizzando l'utilizzabilità dei tronchi per sfogliati e riducendo significativamente il valore commerciale.

Gli attacchi molto forti, a prescindere dalle piante che muoiono, portano ad un forte deprezzamento del legname, che oltre a non poter essere destinato a sfogliati, spesso trova difficoltà addirittura ad essere utilizzato per segati.

Ciò comporta un forte abbassamento del valore economico delle piante, con riduzioni che potrebbero raggiungere il 40-60%. Questa malattia, quindi, in ogni sua espressione, rappresenta un grave problema per le drastiche riduzioni del valore commerciale che il legno alterato subisce.



Fig.15. Cancro al tronco di *Juglans regia* nella fase più iniziale (A), con necrosi ancora superficiali, (B) che pian piano si approfondiscono fino al legno (D); in C e D, cancro al tronco di *Juglans regia* in fase più avanzata, visto prima (C), e dopo la decorticazione (D).



Fig.16. Cancri in evoluzione che aumentano di numero (A e B), andando ad interessare ampie zone di fusto (C), con estese ed approfondite alterazioni anche nella parte esterna del legno (D).



Fig. 17. Impianti di *Juglans regia* in Loreto (AN): pianta gravemente colpita da cancri al fusto che interessano ampie zone di fusto, lungo tutta la sua lunghezza. In questo caso gli attacchi interessano anche la parte basale delle grosse branche, talune delle quali sono morte.



Fig. 18. Particolare di cancri annosi, si notino ampie zone morte, con evidenti tentativi di cicatrizzazione.



Fig. 19. Alterazioni delle zone interne del legno, conseguenti a gravi attacchi di cancri corticali. A sinistra, sezione trasversale del tronco: si noti l'emiciclo inferiore, con la parte corticale completamente necrosata. A destra, sezione longitudinale a livello della biforcazione di due grosse branche (particolare della figura 17), si notino le profonde necrosi, con inclusione dei tessuti morti nel legno.

4.2. INDAGINI SULL'EZIOLOGIA DELLA MALATTIA

4.2.1. MICRORGANISMI RISCONTRATI NEI CANCRI

4.2.1.1. Zone geografiche diverse

Dagli innumerevoli isolamenti effettuati da cancri relativi a diversi impianti colpiti dalla malattia, in aree geografiche diverse, sono stati riscontrati numerosi microrganismi batterici e fungini, sia patogeni che non (Tabb.6-7; Figg da 27 a 32).

Batteri. In pressoché tutti i cancri delle piante di buona parte delle stazioni considerate, specialmente dai frammenti di corteccia in via di alterazione che presentavano essudati nella zona necrotizzata, sono stati isolati, con altissima frequenza, colonie batteriche molto simili tra loro, levano negative, con margine intero e colore bianco crema, spesso quasi in coltura pura (Fig.20). Dalle opportune analisi effettuate quali il profilo degli acidi grassi e riconoscimento tramite biologia molecolare (Figg.21-22), è risultato trattarsi di *Brenneria nigrifluens*, specie a cui in passato veniva attribuita in toto la malattia. Detto batterio non è stato isolato negli impianti di Loreto e Fermo, dove gli isolamenti interessavano cancri annosi, asciutti, in fase di cicatrizzazione, ed in quello di Rieti, dove le piante sono giovani, estremamente filate, cresciute su terreno piuttosto compatto, pietroso ed assai poco adatto al noce.

Sebbene dai tessuti malati siano state isolati varie altre specie di batteri, si è sempre trattato di presenze saltuarie e di forme tipicamente saprofitiche e quindi da non considerare coinvolti nella malattia.

Funghi. Dai tessuti cancerosi, insieme a microrganismi batterici, sono state isolate anche numerose specie fungine, quali in particolare *Botryosphaeria* spp.(Fig.24), *Fusarium solani* (Fig.23), *Phomopsis juglandina* (Fig.25), *Paraphaeosphaeria* sp. (=Paraconiothirium *brasiliense*) (Fig.26), *Alternaria alternata* e *Alternaria* spp., tra quelle potenzialmente patogene (Tabb. 6 e 7), *Cladosporium* spp., *Trichoderma* spp., *Epicoccum nigrum* e *Acremonium* spp., tra quelle non patogene su tessuti legnosi (talune note addirittura per il loro carattere antagonistico).

Per la verità sono state via via isolate altre tipologie fungine, talora anche con discreta frequenza di isolamento: si ritiene tuttavia che, per la loro presenza estremamente saltuaria, sia da escludere che essi abbiano un ruolo determinante nella malattia (per tale motivo abbiamo sempre ritenuto opportuno includerli in una sola categoria denominata "altro."). Tra i microrganismi fungini isolati potenzialmente patogeni, *Alternaria* spp. è risultata presente

solo in alcune stazioni (sia pure con elevata frequenza) e pertanto, tenute presenti le sue scarse attitudini a colpire organi legnosi, non sembrerebbe collegabile con la malattia.

Anche *Paraphaeosphaeria* sp., quantunque potenzialmente agente di necrosi corticale, essendo stata riscontrata solo in quattro delle dieci stazioni considerate, non sembrerebbe di rilevante importanza nella eziologia della malattia.

Gli agenti di necrosi corticale risultati più ricorrenti nei tessuti cancerosi, sia pur con frequenza diversa in relazione ai vari fattori considerati, sono risultati *Phomopsis juglandina* e, soprattutto, *Botryosphaeria* spp. (*B. parva*, *B. dothidea* e *B. obtusa*) e *Fusarium solani*.

Phomopsis juglandina è risultata essere presente in sei dei dieci impianti considerati, ma con presenza nei cancri piuttosto saltuaria. Sembrerebbe pertanto che tale patogeno non debba considerarsi agente primario del cancro del noce.

Alla luce di quanto sopra sembrerebbe presumibile che i patogeni *Brenneria nigrifluens*, *Botryosphaeria* spp. e *Fusarium solani* siano coinvolti nella malattia del cancro del tronco. Sembrerebbe altresì ipotizzabile che, ai suddetti patogeni possano saltuariamente unirsi *Phomopsis juglandina* e/o *Paraphaeosphaeria* sp..

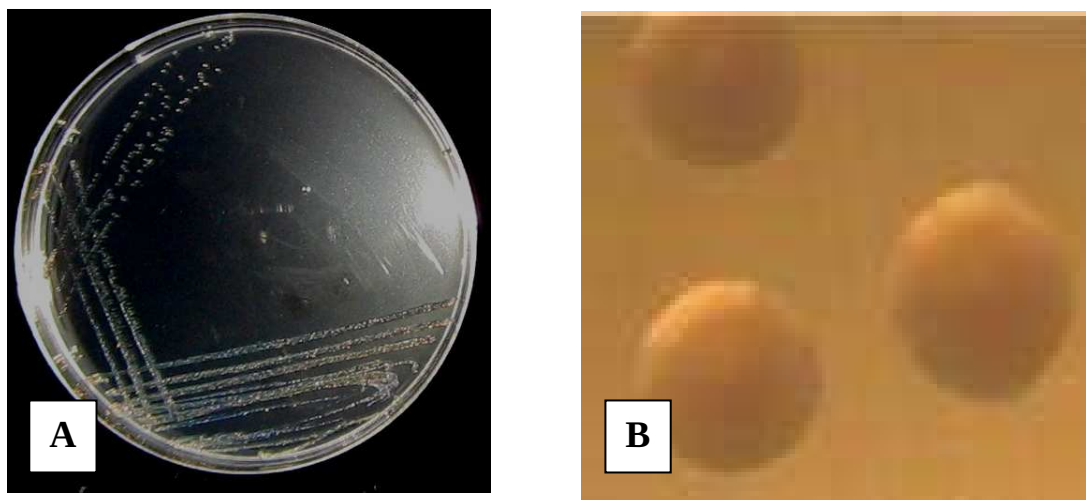


Fig.20. In A Colonie di *Brenneria nigrifluens* in purezza, ottenute su substrato ANS. In B un particolare delle colonie allo stereoscopio.

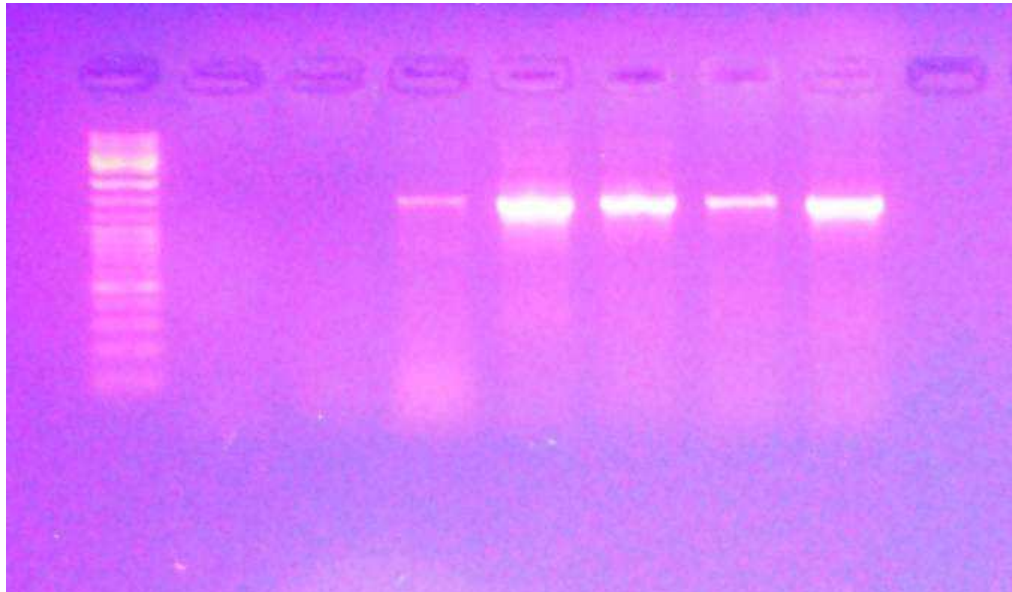


Fig. 21. Corsa su gel di agarosio del prodotto PCR da DNA di *Brenneria nigrifluens*.

```

CTTANACATGCAGTCGAACGATGATTATCTAGCTTGCTAGATATGATTAGTGGCGGAG
GGTGAGTAACATTTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGATAGCTCGGGGAAACTCGAAT
TAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGGGGGCGCAAGCTCTTGCTATTAGATGAGC
CTAAATCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCTGTAATG
TCTGAGAGGATGATCAGTCACACCGGAAGTGAACACGGTCCGGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCAGGGAGGAGAGGCTAATGGTTAAT
ACCCATTAGATTAGACGTTACCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGAGTGTA
GGTGGCTCATTAAGTCACATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATGTGAT
ACTGGTGGTGCTAGAATATGTGAGAGGGAAGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAACGCAGCTTCCTGGCATAATATTGACAC
TGAGATTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGTCCTTGAGACTTTAGTGGCGCAGTTAACGCGATA
AGTAGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAGTCAATGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGNGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACCCGAAGACCTTACTGGTC
TGACATTAAAAAAGAAAAAAGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAGAGAAAGAGAAAG
GACTGGAGATATAATGAGGGGNAGAANAAGAGAATCGAGAGNAATAGGTCAAGGAG
GAATGAAAGGGCGAAAAAAGGGAGTCTAGAAAAACCTAACGAGAG

```

Fig. 22. Sequenziamento del DNA ribosomale di *Brenneria nigrifluens*.

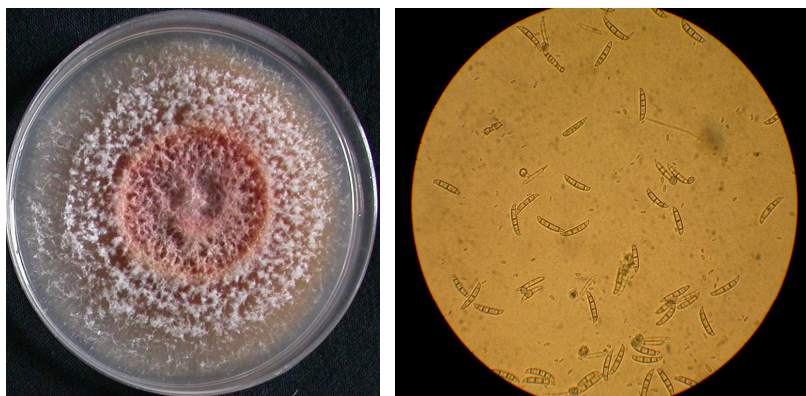


Fig.23. *Fusarium solani*. A sinistra, colonia reisolata in purezza su PDA; a destra particolare di macroconidi visti al microscopio ottico (40x).

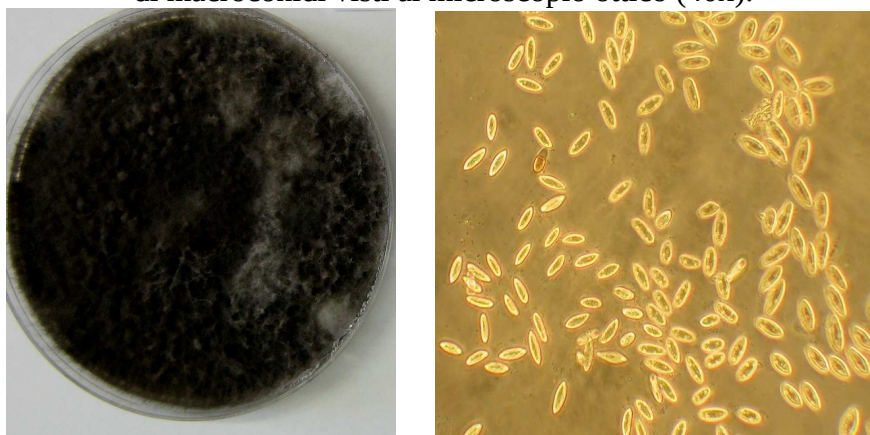


Fig.24. *Botryosphaeria parva*. A sinistra colonia reisolata in purezza su PDA; a destra conidi ottenuti da fruttificazioni su organi legnosi (40x).



Fig.25. Colonie di *Phomopsis juglandina* reisolata in purezza su PDA.

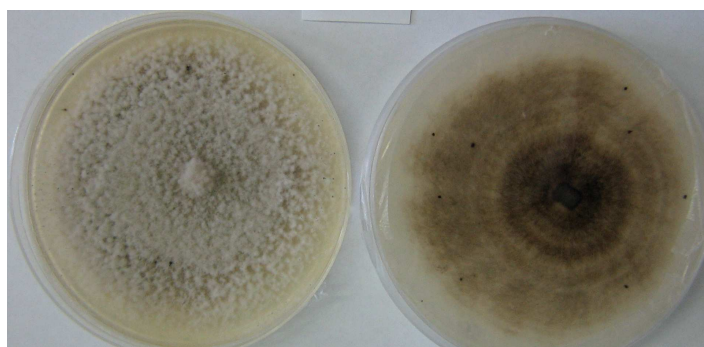


Fig.26. Colonie di *Paraconiothyrium brasilense* reisolata in purezza su PDA.

		Italia settentrionale					Italia centrale				
		AL	MN			RA	LT	RI	AP	RM	AN
DATA		10/07	09/06	09/06	09/06	07/07	07/07	10/07	06/04	06/07	06/06
TIPOLOGIA NECROSI		A	A	A	A	A	A	B	C	A	C
MICRORGANISMI ISOLATI		Sezzadio	San Matteo delle Chiaviche	Gazzuolo	Commessaggio	Ravenna	Cisterna di Latina	Rieti	Fermo	Roma	Loreto
AGENTI DI NECROSI CORTICALE	<i>Brenneria</i>	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-
	<i>Botryosphaeria spp.</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	<i>Fusarium solani</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	<i>Phomopsis juglandina</i>	-	X	X	X	X	X	-	-	X	-
	<i>Paraphaeosphaeria sp</i>	-	X	-	-	-	-	X	X	-	X
ALTRO	<i>Alternaria spp.</i>	X	X	-	-	-	X	X	X	X	-

Tab.6. Presenza (x) o meno (-) dei vari microrganismi isolati in cancri attivi del fusto riscontrati in piantagioni da legno di *Juglans regia* dislocati in zone diverse dell'Italia centro-settentrionale. Tipologie dei cancri: A= iniziali; B= emersi da 5-6 mesi; C= di oltre un anno.

LOCALITÀ		PATOGENI					NON PATOGENI		ISOLATI NULLI
		Agenti di necrosi corticale				Altro			
		<i>Fusarium</i>	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Paraphaeosphaeria</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Altro</i>	
Italia Settentrionale	S. Matteo delle Chiaviche (MN)	18,87 $\pm$ 11,6	56,38 $\pm$ 33,4	6,66 $\pm$ 3,3	3,44 $\pm$ 2,1	3,40 $\pm$ 2,1	12,48 $\pm$ 9,8	8,88 $\pm$ 3,3	20,53 $\pm$ 11,3
	Gazzuolo (MN)	25,5 $\pm$ 13,4	23,30 $\pm$ 14,8	21,11 $\pm$ 7,9	0,00	0,00	20,00 $\pm$ 11,4	11,11 $\pm$ 6,7	13,30 $\pm$ 8,5
	Commessaggio (MN)	9,16 $\pm$ 7,4	29,50 $\pm$ 11,2	9,80 $\pm$ 5,5	0,00	0,00	9,33 $\pm$ 4,7	11,50 $\pm$ 8,9	16,83 $\pm$ 7,9
	Ravenna	16,60 $\pm$ 2,8	45,80 $\pm$ 10,1	16,55 $\pm$ 2,8	0,00	0,00	0,00	4,70 $\pm$ 2,8	29,20 $\pm$ 7,4
	Sustinente (AL)	19,70 $\pm$ 12,4	48,95 $\pm$ 38,1	0,00 $\pm$ 0	0,00	1,04 $\pm$ 0,8	11,45 $\pm$ 10,4	12,5 $\pm$ 10,6	26,04 $\pm$ 20,1
Italia Centrale	Roma	14,38 $\pm$ 10,4	31,25 $\pm$ 21,1	56,25 $\pm$ 33,3	0,00	16,66 $\pm$ 11,2	25,00 $\pm$ 11,2	4,16 $\pm$ 2,4	8,33 $\pm$ 4,2
	Cisterna di Latina (LT)	23,43 $\pm$ 18,6	40,13 $\pm$ 32,5	3,33 $\pm$ 1,2	0,00	12,50 $\pm$ 6,7	7,3 $\pm$ 4,2	10,95 $\pm$ 7,9	10,55 $\pm$ 8,8
	Rieti	26,57 $\pm$ 22,2	22,39 $\pm$ 13,4	0,00	6,00 $\pm$ 01,3	14,06 $\pm$ 12,3	4,94 $\pm$ 2,9	2,07 $\pm$ 3,4	17,63 $\pm$ 12,3
	Loreto (AN)	4,07 $\pm$ 3,5	9,94 $\pm$ 6,7	0,00	2,26 $\pm$ 1,2	0,00	0,00	9,34 $\pm$ 5,7	74,40 $\pm$ 44,5
	Fermo (AP)	3,67 $\pm$ 2,9	8,97 $\pm$ 7,8	0,00	0,00	0,00	3,80 $\pm$ 1,8	15,78 $\pm$ 11,0	68,98 $\pm$ 22,5

Tab.7. Frequenza di isolamento (%) dei vari microrganismi fungini riscontrati in cancri attivi sul fusto di *Juglans regia* presso impianti diversi dell'Italia centro-settentrionale.

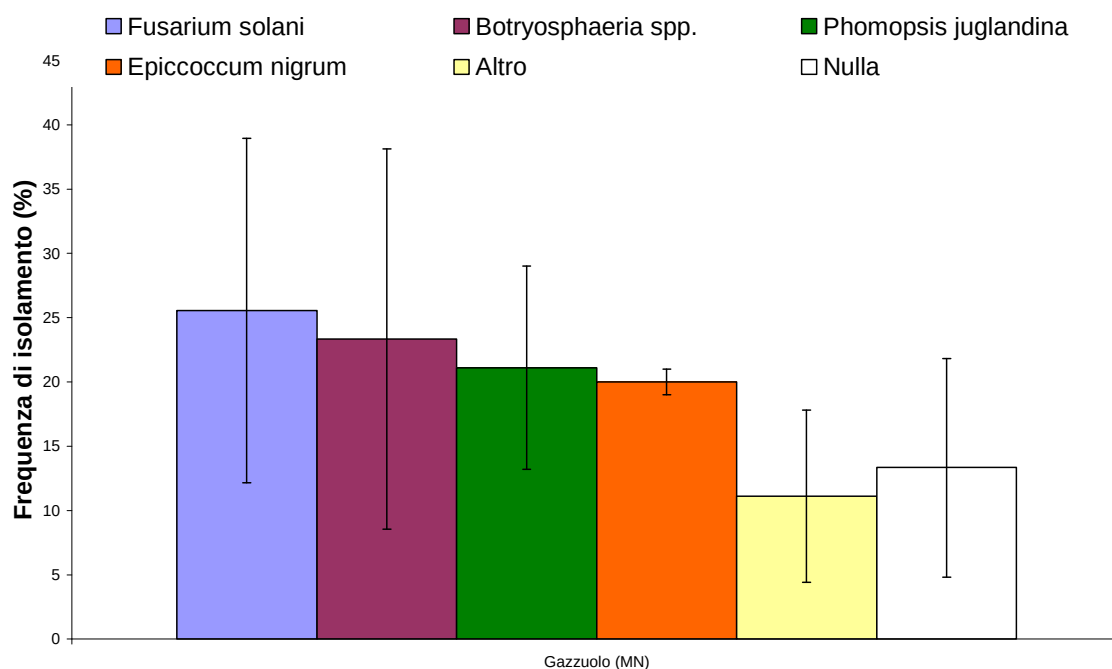


Fig.27.Gazzuolo (MN), Settembre 2006. Istogramma delle frequenze di isolamento (%) dei principali agenti fungini, riscontrati in cancri attivi del fusto, su piante adulte di *Juglans regia*.

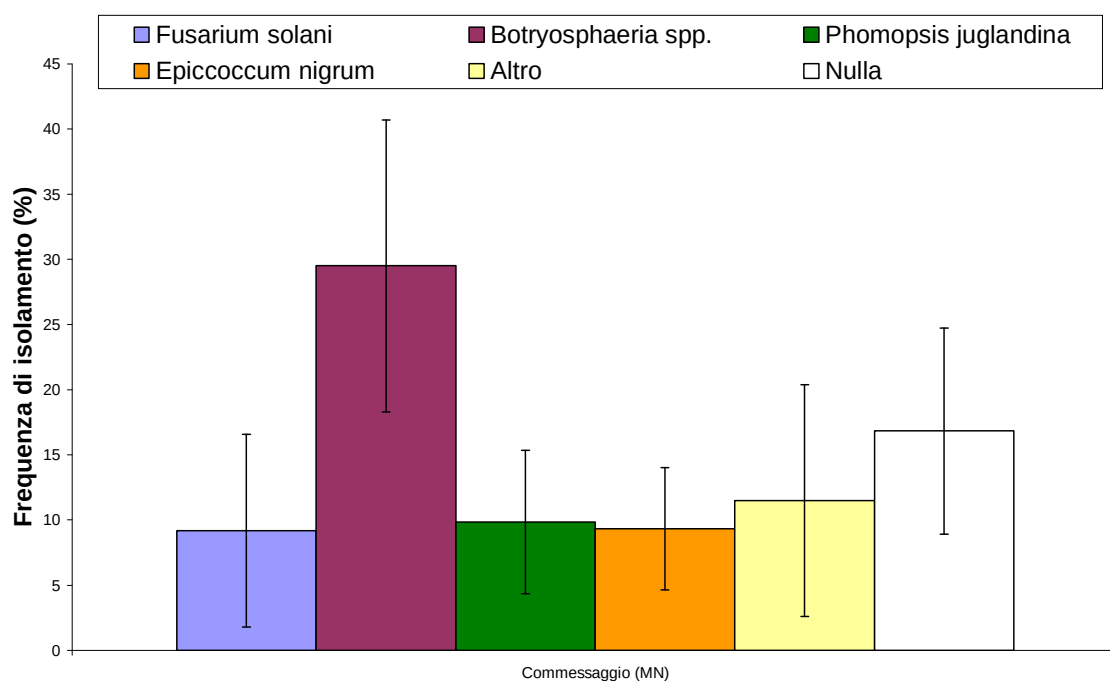


Fig.28.Commessaggio (MN). Settembre 2006. Istogramma delle frequenze di isolamento (%) dei principali agenti fungini, riscontrati in cancri attivi del fusto, su piante adulte di *Juglans regia*.

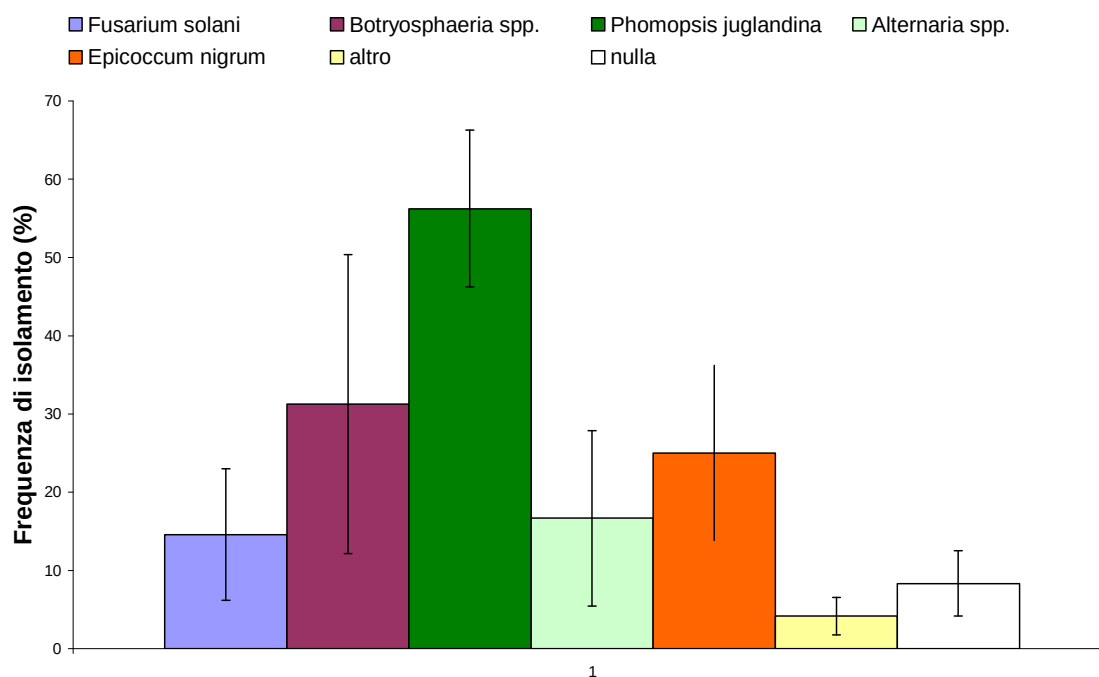


Fig.29. Roma. Giugno 2007. Istogramma delle frequenze di isolamento (%) dei principali agenti fungini, riscontrati in cancri attivi, in una piantagione commerciale di *Juglans regia* al 10° anno di età..

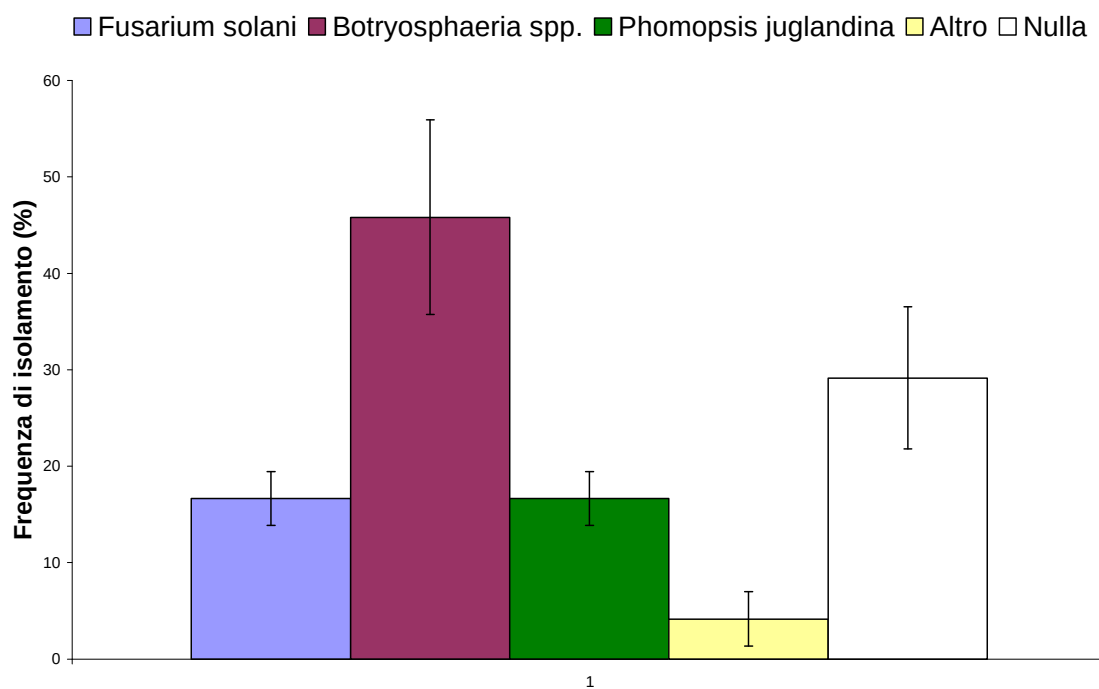


Fig.30. Ravenna. Luglio 2007. Istogramma delle frequenze di isolamento (%) dei principali agenti fungini, riscontrati in cancri attivi, in un impianto sperimentale di *Juglans regia* al 15° anno di età.

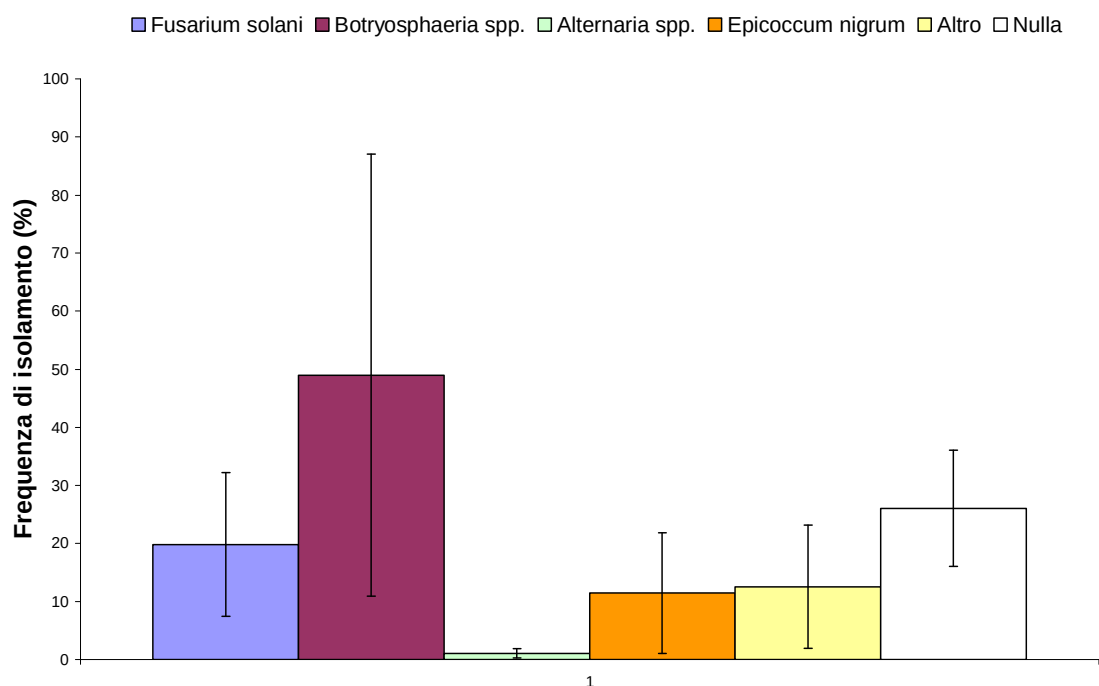


Fig.31. Sustinente (AL). Settembre 2007. Istogramma delle frequenze di isolamento (%) dei principali agenti fungini, riscontrati in cancri attivi, in un impianto sperimentale di *Juglans regia* al 13° anno di età..

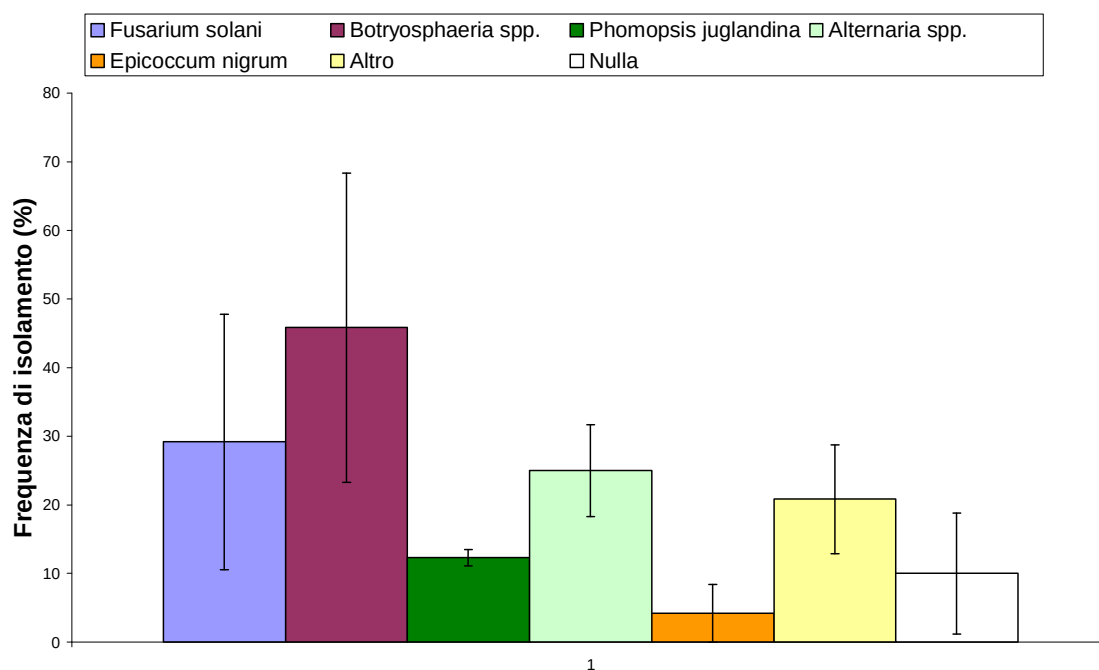


Fig.32. Cisterna di Latina. Giugno 2007. Istogramma delle frequenze di isolamento (%) dei principali agenti fungini, riscontrati in cancri attivi, in una piantagione commerciale di *Juglans regia* al 16° anno di età..

4.2.1.2. Epoche differenti

Dalla serie di isolamenti effettuati su cancri attivi presenti presso l'impianto di Cisterna di Latina (Fig.33; Tab.8) in epoche diverse dell'anno, è in primo luogo emerso il puntuale riscontro, in tutte le date, dei patogeni *Brenneria nigrifluens*, *Fusarium solani* e *Botryosphaeria* spp., piuttosto saltuaria la presenza di altri patogeni come *Phomopsis juglandina*. Ciò viene a confermare l'ipotesi che detti patogeni abbiano (tutti e 3) un ruolo importante nel cancro del tronco; la maggiore isolabilità di *Fusarium solani* e di *Botryosphaeria* spp. durante il periodo estivo, rispetto all'autunno e la primavera.

È probabile che le elevate temperature blocchino l'attività produttiva di fitotossine dei due funghi, ma non l'estendersi delle colonizzazioni. Ciò, riducendo le aree di tessuto in via di degenerazione prive di micelio (probabilmente più estese in primavera ed autunno) potrebbe aumentare le probabilità di isolamento dei due patogeni.

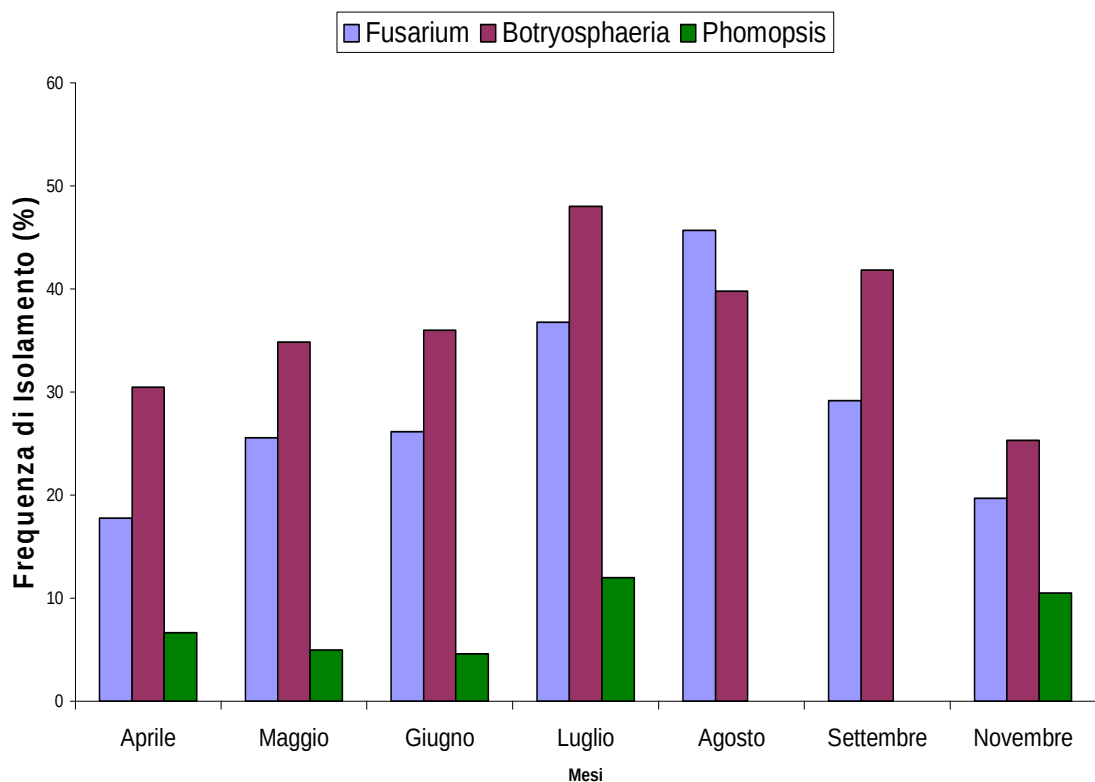


Fig.33. Impianto di *Juglans regia* in Cisterna di Latina. Istogramma delle frequenze di isolamento (%) dei patogeni fungini agenti di necrosi corticale isolati da cancri attivi del fusto in diversi periodi dell'anno.

Periodo dell'anno	Microrganismi isolati							Isolati Nulli
	Agenti di necrosi corticale				Altri			
	Presenza- Assenza	Frequenza di isolamento (%)						
	<i>Brenneria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Epicoccum</i>	Altro	
Aprile	Si	17,7±6,5	30,4±9,8	6,6±2,2	0,0	10,0±3,4	1,1±0,80	21,1±8,9
Maggio	Si	25,5±8,3	34,8±12,3	5,0±2,3	23,8±11,2	1,12±0,87	17,9±6,7	22,6±7,8
Giugno	Si	26,1±12,3	36,0±11,2	4,6±1,7	25,0±7,3	0,0	25,0±8,6	0,0
Luglio	Si	36,7±14,6	48,0±15,7	12,0±6,1	0,00	3,3±1,1	6,6±3,4	17,4±5,6
Agosto	Si	45,7±15,4	39,7±12,4	0,0	11,1±5,6	3,4±1,2	4,8±0,9	0,0
Settembre	Si	26,1±9,9	41,8±16,8	4,0±1,9	13,5±4,3	3,5±0,4	10,0±3,4	15,0±5,8
Novembre	Si	19,7±8,7	25,3±10,6	10,5±4,7	5,5±2,1	4,6±3,1	15,6±6,7	22,4±10,7

Tab.8. Impianto di *Juglans regia* in Cisterna di Latina. Presenza (Si) o assenza (No) del batterio *Brenneria nigrifluens* e frequenze di isolamento (%) di specie fungine riscontrate in cancri attivi del fusto in epoche diverse.

4.2.1.3. Fenotipi diversi

Dalla piantagione all'uopo indagata, quella di Cisterna di Latina, molto colpita dalla malattia e con una elevata biodiversità fenotipica, sono stati effettuati degli isolamenti da cancri attivi presenti in 20 diversi fenotipi, scelti a caso, molto diversi tra loro. Si è sempre registrata la presenza del batterio *Brenneria nigrifluens* e dei due funghi *Fusarium solani* e *Botryosphaeria* spp., sia pur con frequenze di isolamento molto variabili (Tab.9). Ciò non fa che avvalorare l'ipotesi che detti patogeni siano coinvolti nella malattia. La variabilità dei risultati relativi ai singoli funghi (Coefficiente di variazione = C.V relativi a *Fusarium* = 0,25; C.V.; *Botryosphaeria* = 0,20), che va d'altra parte a confermare quanto riscontrato in buona parte degli isolamenti, dimostra una associazione dei tra patogeni varibile da pianta a pianta o, forse, da cancro a cancro,

probabilmente in funzione della pressione d'inoculo iniziale e/o delle “locali” condizioni che, casualmente, possono favorire l'uno o l'altro patogeno.

Volendo portare degli esempi, su venti diverse piante, il range dei valori delle frequenze di isolamento va da 13,40 a 33,90% per *Fusarium*, da 22,99 a 49,16 % per *Botryosphaeria* e da 0 a 10,11 % per *Phomopsis*. Quest'ultimo fungo è presente in 13 piante su 20 (65%). Gli isolati muti vanno da 0 a quasi il 25%.

Ciò dimostra la complessità del fenomeno e la necessità di ricorrere ogni volta ad un ragguardevole numero di isolati, onde avere dati statisticamente elaborabili.

PIANTA	MICRORGANISMI ISOLATI							Isolati nulli
	Agenti di necrosi corticale				Altri			
	Presenza	Frequenza di isolamento (%)						
	<i>Brenneria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Epicoccum</i>	Altro	
12	Si	13,65	33,37	3,30	8,30	6,69	3,40	23,00
16	Si	25,26	34,50	0,00	8,00	5,10	5,60	20,11
27	Si	27,44	41,33	5,88	11,50	4,99	10,00	11,00
30	Si	22,54	48,25	8,71	10,47	12,79	8,46	18,66
47	Si	16,66	36,66	10,00	7,10	13,34	0,00	16,66
48	Si	32,15	33,26	4,80	6,99	16,21	13,11	16,00
58	Si	22,33	28,99	9,77	13,20	3,22	15,66	17,88
66	Si	28,31	47,19	0,00	14,84	4,11	4,75	24,00
73	Si	30,00	33,33	3,35	16,50	6,67	3,33	23,30
112	Si	33,05	22,99	6,70	15,16	7,84	12,33	19,60
122	Si	33,90	23,77	8,56	13,80	3,00	15,88	17,99
176	Si	31,00	35,11	10,11	11,17	4,36	17,45	22,80
187	Si	29,16	45,83	0,00	10,50	25,00	20,83	0,00
193	Si	23,00	30,15	0,00	22,00	20,54	7,43	19,10
200	Si	28,66	34,88	7,00	19,55	5,66	9,88	10,00
219	Si	17,20	37,81	0,00	15,60	4,37	18,90	17,75
224	Si	30,83	49,16	0,00	3,80	6,66	22,00	12,05
237	Si	26,93	34,18	4,11	7,30	10,66	10,45	10,00
266	Si	23,83	35,77	0,00	12,5	11,33	7,88	21,89
281	Si	13,40	40,40	6,00	15,16	13,61	0,00	24,80
Media	-	25,46±6,28	36,34±7,34	4,41±3,86	12,17±4,56	9,30±6,06	10,36±6,58	17,32±6,11
Cv	-	0,25	0,20	0,83	0,39	0,76	0,69	0,47

Tab.9. Impianto di *Juglans regia* in Cisterna di Latina. Settembre 2006. Frequenza di isolamento (%) dei principali microrganismi fungini riscontrati in cancri attivi del fusto su 20 fenotipi (piante) differenti.

4.2.1.4. Cultivars e cloni di *Juglans regia* diversi

Cultivars. Nell'unico impianto in cui la malattia colpiva cultivars diverse di *Juglans regia*, quello di San Matteo delle Chiaviche (MN), il batterio *Brenneria nigrifluens* è risultato sempre associato alle lesioni, senza differenza tra le singole cultivar, insieme ai due patogeni fungini *Botryosphaeria* spp e *Fusarium solani*, con l'incidenza del primo sempre di molto superiore a quella del secondo. Quantunque le frequenze di isolamento tra le varie cultivars siano apparse piuttosto variabili, tenendo conto della variabilità individuale, tra fenotipo e fenotipo (vedi capitolo precedente), non sembra che esistano significative differenze tra le cultivars. Resta confermato il presumibile coinvolgimento dei tre patogeni ai cancri in tutte e 4 le cultivars (Tab.10; Fig. 34).

Cloni. Dagli isolamenti effettuati dai cancri riscontrati su 4 cloni di *Juglans regia* presenti nell'impianto commerciale di Rieti, ciò che sorprende è la costante assenza del batterio *Brenneria nigrifluens*, confermata da svariati e ripetuti isolamenti.

In tutti i cancri, senza nette differenze tra i cloni sono stati invece riscontrati *Botryosphaeria* sp. e *Fusarium solani*, sia pur con reciproche proporzioni diverse da un clone all'altro. Non è stata mai riscontrata *Phomopsis juglandina*, mentre *Paraphaeosphaeria* sp. è stata rilevata solo sul clone Umbra (Tab.11; Fig.35).

Sembrerebbe pertanto che in questo caso i cancri abbiano solo origine fungina, il che non contrasta con gli altri risultati ottenuti con questo lavoro. L'impianto di Rieti è il più giovane (anni 9) tra tutti quelli esaminati, con piante molto filate e di modesto diametro (cm 9,5), abbastanza vicine come dimensioni a quelle dei rami. Detti cancri pertanto ricordano più quelli rameali che non i veri e propri cancri al tronco (vedi poi).

D'altra parte, poiché l'impianto è stato costituito su un terreno piuttosto ostile (vedi tabella 1), è presumibile che le piante siano andate incontro a difficoltà di affrancamento e stress ragguardevoli, elementi che indubbiamente potrebbero avere favorito gli attacchi dei 2 funghi summenzionati.

Per quanto concerne il comportamento clonale verso i vari patogeni, l'unica cosa di rilievo che si può sottolineare è la presenza di *Paraphaeosphaeria* sp. Solo sul clone Umbra.

CULTIVAR	MICRORGANISMI PATOGENI						MICRORGANISMI NON PATOGENI		Isolamenti nulli
	AGENTI DI NECROSI CORTICALI					ALTRO			
	Batteri	Funghi							
	Presenza	Frequenza di Isolamento (%)							
	<i>Brenneria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Paraphaeosphaeria</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Altro</i>	
Lilli	si	35,5±12,3	52,2±23,4	1,4±0,8	6,6±1,3	3,50±2,1	7,7±3,4	5,5±1,9	18,8±6,4
Dronero	si	18,3±6,7	40,0±19,8	4,6±2,1	16,6±5,9	2,1,0±0,8	16,6±8,9	20,0±7,5	26,6±13,6
Garfagnana	si	20,0±11,8	60,0±34,4	2,5±1,9	6,6±2,8	1,9,0±0,3	10,0±6,7	0,00	13,3±5,6
Sorrento	si	16,6±8,9	63,3±22,4	6,2±3,8	10,0±6,3	4,3,0±2,1	6,6±3,1	10,0±6,7	23,3±16,5

Tab.10. San Matteo delle Chiaviche (MN). Settembre 2006. Frequenza di isolamento (%) dei vari microrganismi fungini riscontrati in cancri attivi al fusto su cultivar diverse di *Juglans regia*.

CLONI	MICRORGANISMI PATOGENI						MICRORGANISMI NON PATOGENI		Isolamenti nulli
	AGENTI DI NECROSI CORTICALI					ALTRO			
	Batteri	Funghi							
	Presenza	Frequenza di Isolamento (%)							
	<i>Brenneria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Paraphaeosphaeria</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Altro</i>	
Umbra	no	20,8±9,8	25,0±11,2	24,0±8,7	0,0	12,5±4,5	6,2±2,2	12,5±4,5	14,5±8,1
Parisienne	no	27,8±16,7	18,7±4,5	0,00	0,0	8,3±3,4	8,3±2,7	8,3±2,3	17,5±5,6
Franquette	no	31,2±19,8	12,5±6,5	0,00	0,0	14,3±5,6	2,0±0,7	4,1±1,9	18,5±7,9
Midland	no	26,0±9,9	33,3±17,7	0,00	0,0	10,4±3,9	3,1±0,9	7,2±4,1	19,5±7,8

Tab.11. Frequenza di isolamento (%) dei vari microrganismi fungini riscontrati in cancri al fusto su cloni diversi di *Juglans regia* (non isolato il batterio *B. nigrifluens*).

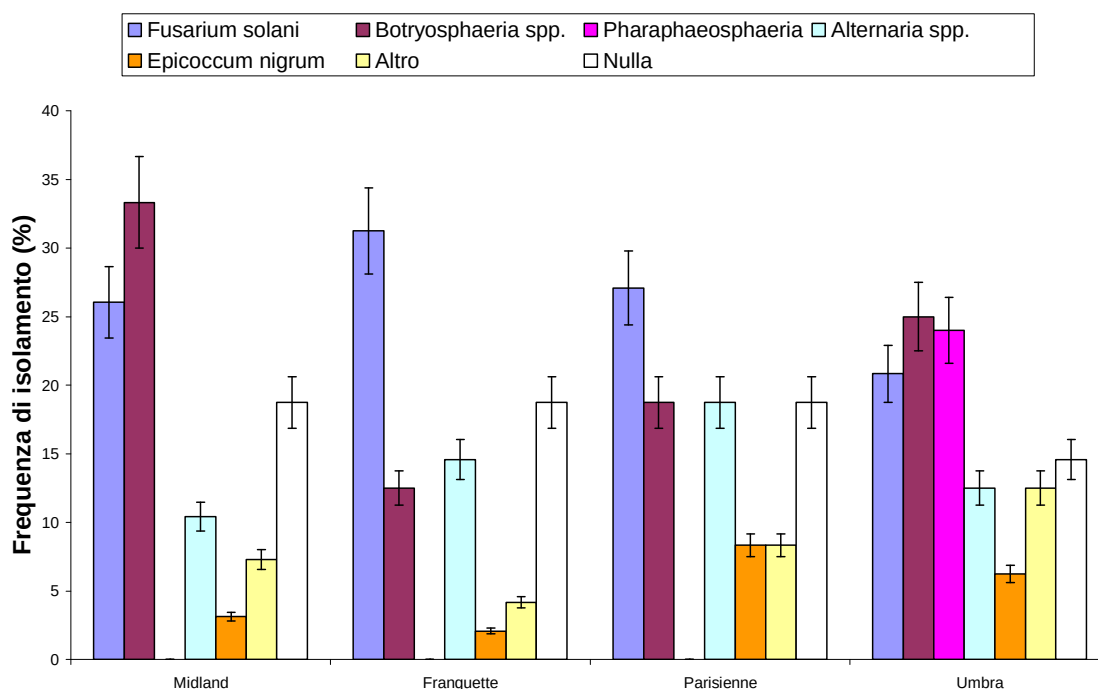


Fig.35. Impianto multiclonale di *Juglans regia* da legno in Rieti. Settembre 2007. Istogrammi della frequenza di isolamento (%) dei vari agenti fungini agenti di necrosi corticale riscontrati in cancri al fusto su cloni diversi.

4.2.1.5. Cancri in diverso stadio evolutivo

Nella tabella 12 vengono riportate le frequenze di isolamento dei microrganismi, isolati a differenti profondità, sia sul fronte di avanzamento di cancri in diverso stadio evolutivo, sia nella parte centrale dei cancri, completamente degradata, nonché in zone limitrofe completamente esterni ad essi, in aree corticali asintomatiche sane.

Considerando gli isolamenti effettuati nella zona del fronte di avanzamento dei processi cancerosi, in diverso stadi evolutivi (prelevati dall'impianto di Cisterna di Latina) è emerso come (Fig.36) il batterio *Brenneria nigrifluens* ed i funghi *Fusarium solani* e *Botryosphaeria* spp., sebbene con frequenza di isolamento molto variabili, siano risultati sempre associati alla malattia. Per i due patogeni fungini, in particolare *Fusarium*, le frequenze di isolamento sono andate generalmente aumentando passando dai cancri allo stadio iniziale a quelli via via più annosi.

Detti patogeni peraltro, sono stati riscontrati sia nei tessuti corticali superficiali che in quelli più profondi, nonché negli stati più esterni dei tessuti corticali asintomatici.

Per contro, pur senza quantificazione specifica degli isolati, l'incidenza di *Brenneria nigrifluens* è sembrata che sia andata riducendosi con il tempo. Detto patogeno, peraltro,

sembrerebbe che non riesca ad approfondirsi molto nei tessuti corticali, né riesca ad intaccare mai il legno.

Dagli isolamenti effettuati nella zona centrale, in via di disfacimento, dei cancri più annosi (molto evoluti e terminali), mentre non è mai stato isolato il batterio *Brenneria nigrifluens*, l'incidenza dei 2 funghi (*Fusarium* e *Botryosphaeria*) è sembrata leggermente aumentare. In questa zona, si nota soprattutto un incremento del gruppo di isolati indicati con la tipologia "altro", composta dai generi *Epicoccum*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Penicillium* ecc., tutti funghi tendenzialmente saprofiti, che probabilmente si sono instaurati dopo la morte dei tessuti.

Per quanto concerne gli isolamenti effettuati da tessuti corticali sani, più o meno vicini a cancri, mentre non hanno mai fatto rilevare la presenza del batterio *Brenneria nigrifluens*, hanno sempre evidenziato la presenza dei 2 funghi *Fusarium* e *Botryosphaeria*, sia pure con incidenza notevolmente inferiore a quella riscontrata nei cancri. Trattasi ovviamente di un insediamento asintomatico dei due patogeni, che ne dimostra l'*habitus* endofitico, aspetto che indubbiamente merita approfondimenti.

In conclusione, da questi risultati viene confermato come *Brenneria nigrifluens* ed i due patogeni fungini siano costantemente presenti in tutte le zone di avanzamento dei cancri. Tuttavia, mentre i due funghi vanno a colonizzare anche la parte interna dei tessuti corticali e risultino presenti asintomaticamente anche nei tessuti sani, *B. nigrifluens* rimane negli strati superficiali, scompare nei tessuti degradati centrali del cancro e non ha capacità di insediarsi endofiticamente nei tessuti.

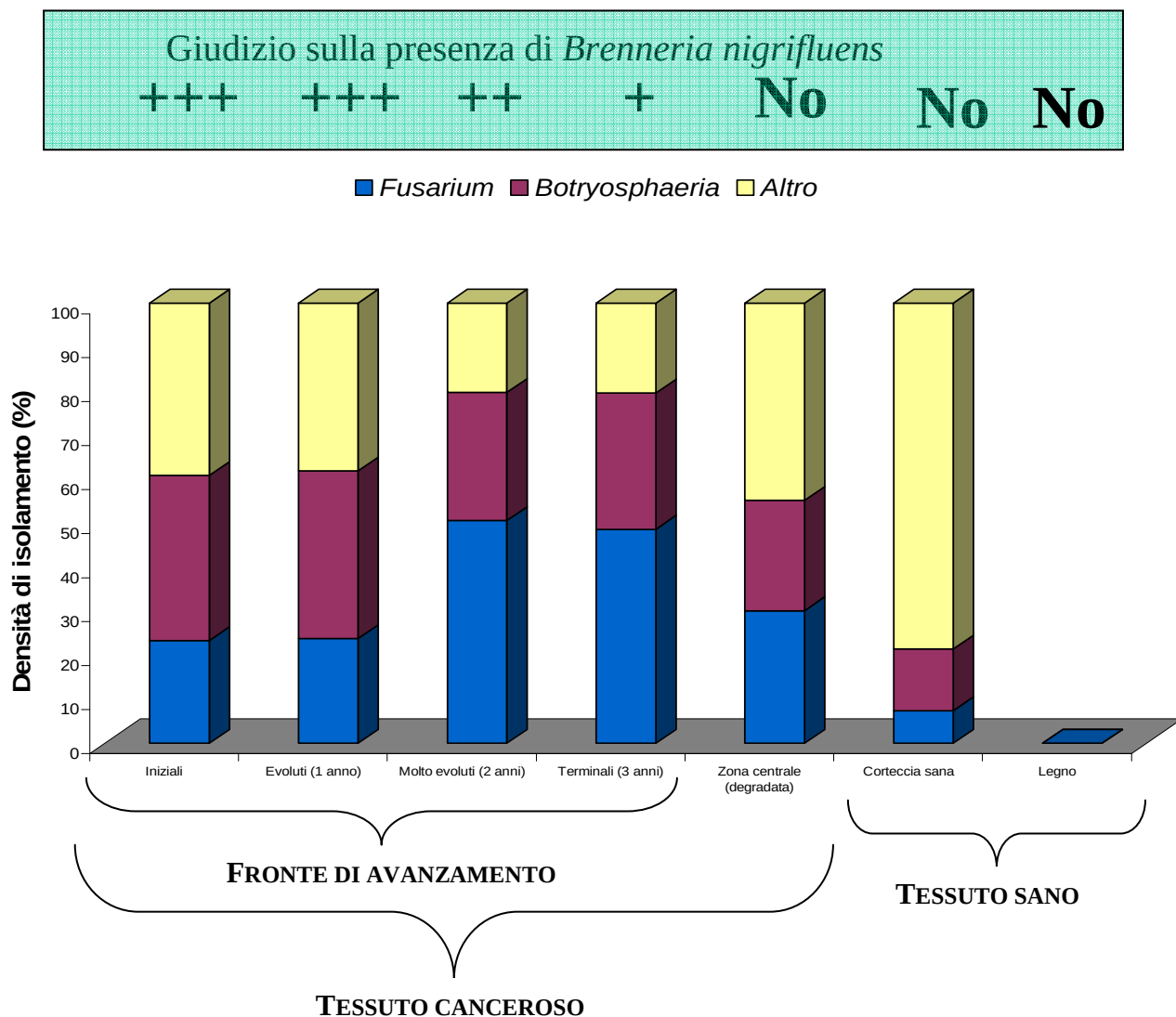


Fig.36. Cisterna di Latina, Luglio 2008. Densità di isolamento (%) dei principali microrganismi patogeni riscontrata nei tessuti corticali del fronte di avanzamento da cancri in diversa fase evolutiva, in confronto con la corteccia e il legno di zone asintomatiche (sane).

ZONA DI ISOLAMENTO	TIPOLOGIA DI CANCRI	MICRORGANISMI ISOLATI						Isolati nulli
		AGENTI DI NECROSI CORTICALE			ALTRO			
		Presenza-Assenza	Frequenza di isolamento (%)					
		<i>Brenneria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Epicoccum</i>	Altro	
FRONTE DI AVANZAMENTO DEL CANCRO	Cancri iniziali	Si	13,4±6,5	19,1±5,6	9,1±3,3	3,7±1,9	8,7±3,4	43,1±21,5
	Cancri evoluti (1 Anno)	Si	20,8±11,2	33,3±19,9	8,3±4,6	16,6±7,8	8,3±5,7	20,3±7,8
	Cancro molto evoluto (2 anni)	Si	52,9±24,5	31,2±16,8	14,3±5,6	3,5±2,3	6,9±2,1	12,6±4,5
	Cancro Terminale (3-4 anni)	Si	47,7±21,8	24,6±13,4	3,4±1,9	2,8±1,1	12,7±3,7	9,8±3,4
CENTRO DEL CANCRO (ZONA DEGRADATA)	Cancro molto evoluto	No	32,1±12,3	27,6±16,9	1,2±0,8	7,5±3,4	36,7±17,5	2,2±1,1
	Cancro terminale	No	31,2±17,9	33,7±21,9	12,9±2,9	6,6±3,2	26,7±11,2	0,0
TESSUTI SANI	Corteccia sana	No	12,1±5,8	28,5±12,9	17,3±4,5	12,6±6,7	13,9±6,7	23,5±13,4
	Legno	No	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0

Tab.12. Cisterna di Latina. Luglio 2008. Esito degli isolamenti in vitro effettuati da cancri in diverso stadio evolutivo e da tessuti corticali limitrofi sani su fusti di piante di *Juglans regia*. Sono indicate la presenza (Si) o assenza (No) di *B. nigrifluens* e la frequenza di isolamento (%) dei vari microrganismi fungini.

4.2.2. INDAGINI SULLA PATOGENICITÀ DEI MICRORGANISMI RISCONTRATI NEI CANCRI

Le prove preliminari di inoculazioni artificiali con *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaeria* sp. su giovani piante di *Juglans regia* non hanno mai dato necrosi significative. Per contro *Brenneria nigrifluens*, *Bothryosphaeria parva* e *Fusarium solani* hanno sempre indotto imbrunimenti e/o necrosi nei tessuti interni del fusto a partire dal punto di inoculazione, prevalentemente in direzione longitudinale (Fig.37).

Più in particolare sono stati registrati:

- imbrunimento dei tessuti più o meno estesi da parte di *Brenneria nigrifluens*, quando inoculata da sola;
- le tre specie di *Bothryosphaeria* hanno dato sintomatologia simile;
- estese necrosi da parte di *Bothryosphaeria parva* da sola o combinata con *Brenneria nigrifluens* o *Fusarium solani*;
- necrosi e spesso veri e propri cancretti più o meno estesi da parte di *Fusarium solani*, da solo o combinato con *Brenneria nigrifluens* e/o *Bothryosphaeria parva*.

Dalla figura 38 emergerebbe come *Brenneria nigrifluens* sia il patogeno che colonizza i tessuti con più lentezza, provocando peraltro solo un imbrunimento dei tessuti. La colonizzazione più rapida è quella di *Botryosphaeria*, la quale tuttavia, quando unita con gli altri patogeni, sembrerebbe rallentare lo sviluppo. Ad esempio, quando i due funghi *Botryosphaeria* e *Fusarium* vengono inoculati insieme, si registrano delle necrosi sensibilmente ridotte soprattutto rispetto alle inoculazioni con sola *Botryosphaeria*. *Fusarium* presenta uno sviluppo relativamente lento rispetto a *Botryosphaeria*, ma con la sintomatologia che più ricorda i veri e propri cancri corticali.

Merita una particolare attenzione la combinazione *Brenneria nigrifluens* con *Fusarium solani*: quando tali patogeni vengono inoculati insieme (allo stesso momento o in tempi diversi) le necrosi e gli imbrunimenti che si vanno a produrre risultano essere sensibilmente ridotti rispetto ai due patogeni inoculati da soli.

Tali risultati ci hanno dato lo spunto per effettuare delle prove di antagonismo *in vitro*, mettendo a reciproco confronto i vari patogeni fungini e batterici riscontrati nei cancri.

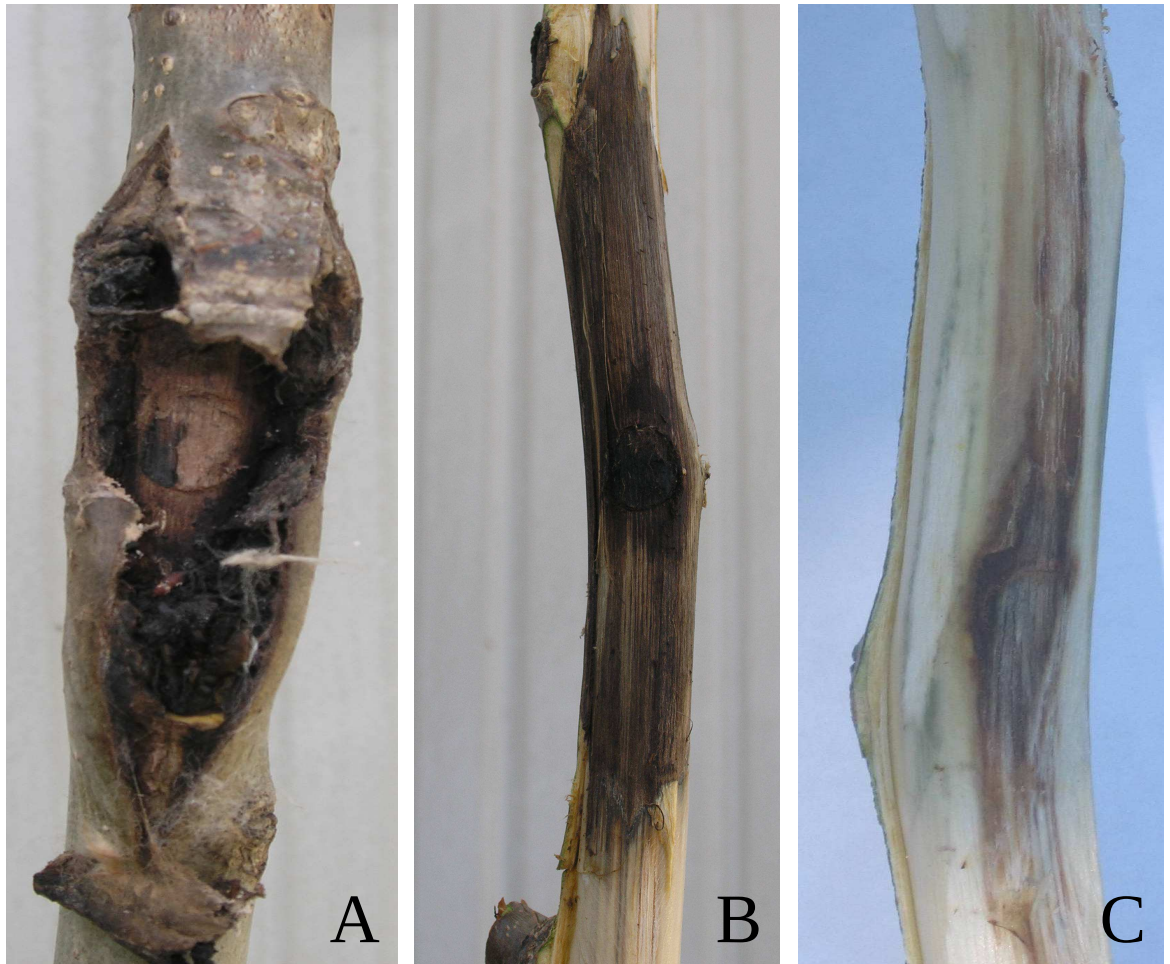


Fig.37. Alterazioni indotte dai diversi patogeni in seguito a inoculazioni artificiali su piantine di *Juglans regia* di 3 anni: in A, cancretti da *Fusarium solani*; in B, necrosi da *Botryosphaeria parva*; in C, imbrunimenti da *Brenneria nigrifluens*.

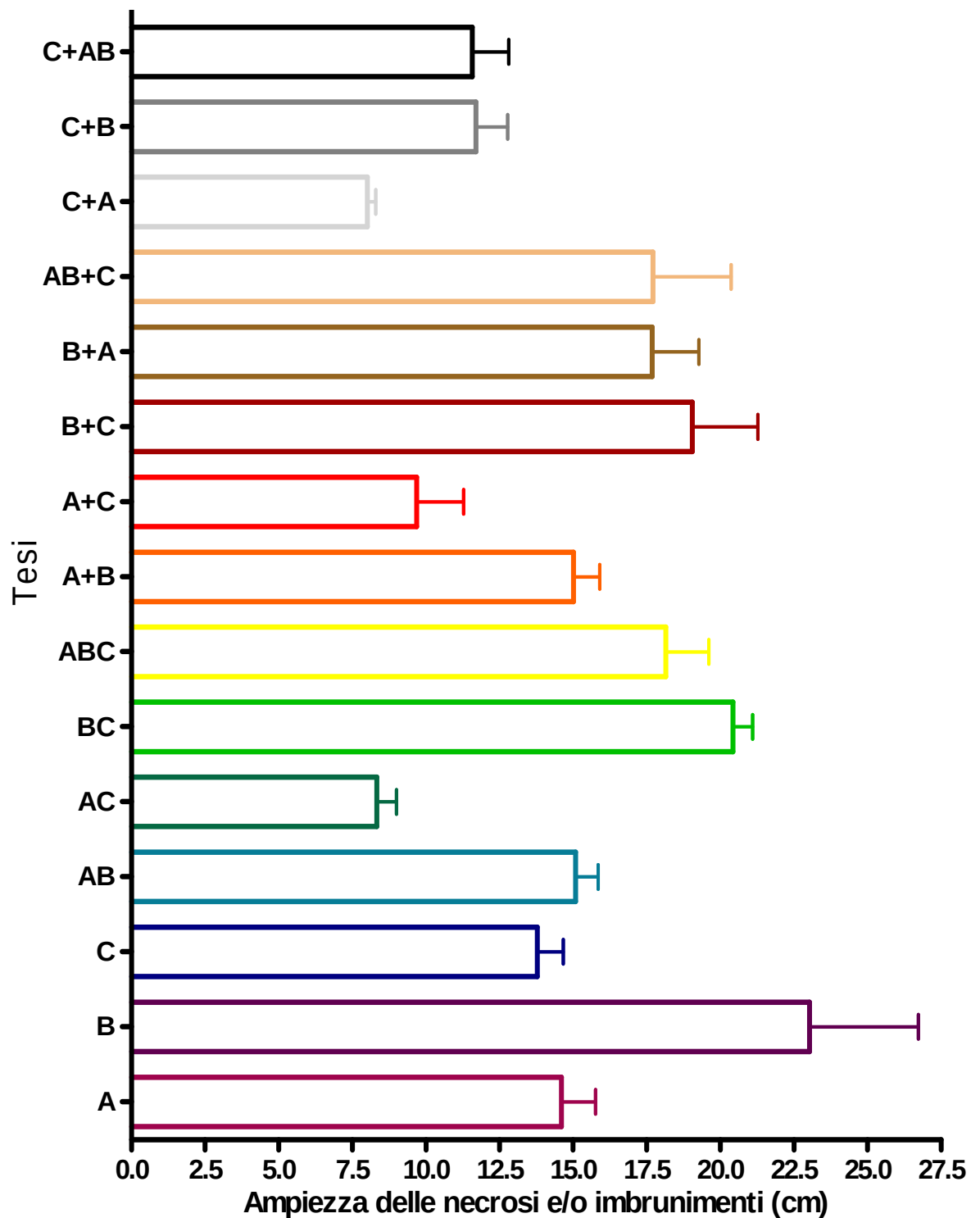


Fig.38. Inoculazioni artificiali di (A) *Fusarium solani*, (B) *Botryosphaeria parva* e (C) *Brenneria nigrifluens* su fusto di piantine di *Juglans regia* di 3 anni in vaso: istogrammi delle lunghezze delle necrosi prodotte dai patogeni utilizzati singolarmente o combinati tra loro, con inoculazione contemporanea o in differita (+) nel tempo.

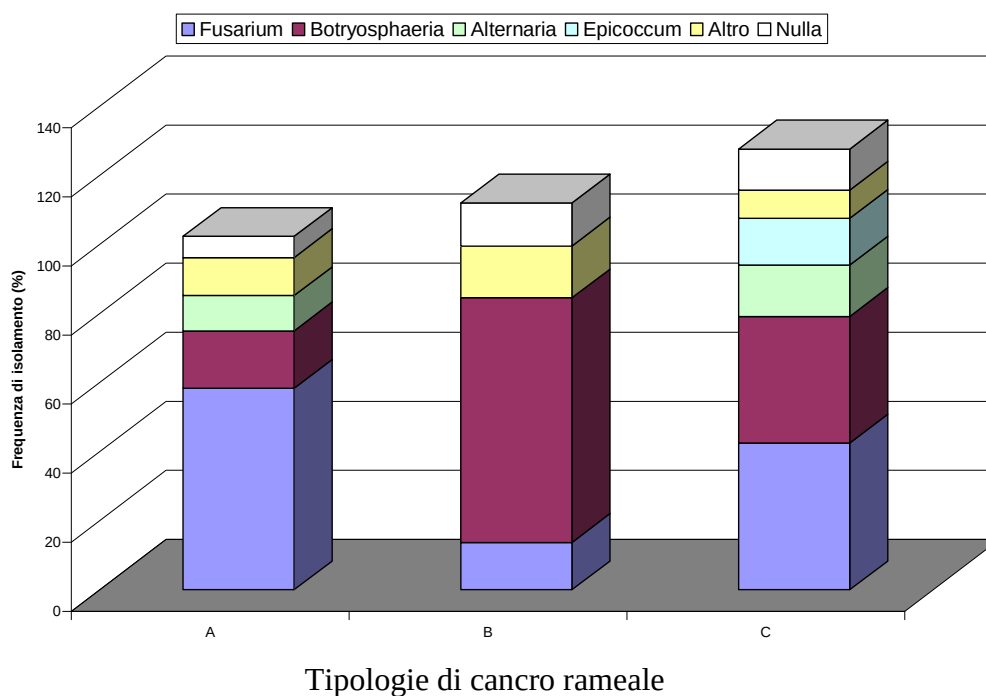
4.2.3. ANALOGIA CON I PATOGENI ASSOCIATI AI CANCRI RAMEALI

Dalle necrosi corticali sui rami, fatta eccezione per sporadici campioni semilegnosi da cui è stata isolata *Marssonina juglandis*, nella stragrande maggioranza dei casi è stata riscontrata la presenza di *Botryosphaeria* spp. (*B. parva* e *B. dothidea*), *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp., sia isolatamente che combinati tra loro. Non è mai stato isolato invece il batterio *Brenneria nigrifluens* (Fig.42).

Detti esiti sono stati registrati sia quando i rami provenivano da piantagioni colpite da cancro che quando erano stati prelevati da noceti esenti dalla malattia (Tabb. 15-16). Nella tipologia “A”, cancro aperto con segni di cicatrizzazione, risulta sempre predominante *Fusarium* spp (*F. solani*, *F. oxysporum* e *F. latheritium*), in alcuni casi con frequenze di isolamento di oltre l’80 %, con a seguire, *Botryosphaeria* spp. e talora *Phomopsis* sp.. Nei disseccamenti apicali dei rami (tipologia “B”), con necrosi che circondano il rametto senza veri e propri cancri, risulta invece predominante il fungo *Botryosphaeria* spp, con frequenze di isolamento anche del 60 %. Possiamo affermare pertanto che tale fungo è sempre presente nella chioma di piante adulte di noce e che rappresenta uno dei principali agenti di seccumi alla chioma. Nella tipologia “C” invece sono presenti, con frequenze di isolamento simili tra loro i funghi *Botryosphaeria* spp. e *Fusarium* spp.

Località	Materiale genetico		Presenza di cancro al tronco	Tipologia cancro	Microrganismi isolati						Isolamenti nulli
					Microrganismi patogeni					Altro	
					Agenti di necrosi corticale			Altro			
					Presenza-Assenza	Frequenza di isolamento (%)					
					<i>B. nigrifluens</i>	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Alternaria</i>	Altro	
Cisterna di Latina	<i>J. regia</i>		Si	A	No	16,66	58,33	0	10,14	11,10	6,12
				B	No	70,83	13,70	0	0,00	15,00	12,50
				C	No	20,83	54,16	0	12,50	4,16	14,90
San Matteo delle Chiaviche (Mantova)	Cultivars di <i>J. regia</i>	Lilli	Si	B	No	69,7	19,3	0	8,2	12,7	10,7
		Sorrento		A	No	23,5	62,9	0	9,7	5,9	3,2
	Specie	<i>J.nigra</i>		A	No	21,5	57,7	0	10,1	15,7	5,3
Fassinoro (Rieti)	<i>J. regia</i>		No	A	No	18,7	31,7	22,9	2,7	3,2	0
				B	No	37,5	12,5	12,5	0	13	0
Allerona (Terni)	<i>J. regia</i>		No	A	No	16,6	47,9	19	4,25	15,5	9,75
				B	No	39,5	16,7	0	0	25	22
				C	No	61,5	21,4	7,5	5,2	7,9	0
Viterbo	<i>J. regia</i>		No	A	No	19,5	39,7	15,1	10,2	11,7	13,2
				B	No	56,6	11,2	5,8	19,5	5,8	7,9
Casale Monferrato (Alessandria)	<i>J. regia</i>		No	A	No	13,7	47,3	6,7	12,5	10,5	9,7
				B	No	60,4	10,2	3,7	19,7	5,7	6,2

Tab.15. Frequenza di isolamento (%) dei microrganismi fungini associati alle diverse tipologie di cancri rameali (A-B-C) riscontrati in noceti colpiti e non da cancri al tronco.



PRESENZA DI CANCRO AL TRONCO	TIPOLOGIA CANCRO	Presenza- Assenza di <i>Brenneria nigrifluens</i>	FREQUENZA DI ISOLAMENTO MEDIA (%)					Isolamenti nulli
			<i>Botryosphaeria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Alternaria</i>	Altro	
Si	A	No	22,04±9,8	52,30±25,6	8,94±4,5	5,08±2,1	10,98±6,7	8,89±2,3
	B	No	50,30±25,7	16,78±7,8	8,70±3,4	9,66±4,3	10,70±4,9	9,76±3,4
	C	No	55,80±23,4	33,90±17,8	7,61±3,2	10,73±4,5	10,20±5,6	1,50±0,8
No	A	No	19,00±7,8	52,21±21,2	7,90±2,3	6,90±3,2	9,96±4,5	6,48±2,1
	B	No	70,83±34,4	13,70±6,7	0,00	0,00	15,00±6,5	12,50±4,1
	C	No	42,49±29,7	36,66±13,4	0,00	13,55±12,6	8,13±3,4	11,91±3,2

Tab.16. Media delle frequenze di isolamento delle varie tipologie di cancro rameale considerato (A-B-C-D-E) in noceti non colpiti dalla malattia.

4.2.4. *HABITUS* ENDOFITICO DEI PRESUNTI AGENTI DEL CANCRO DEL FUSTO

I risultati precedentemente esposti ci hanno indotto ad indagare sul probabile *habitus* endofitico dei vari patogeni riscontrati nei cancri, andando a fare isolamenti da tessuti corticali sani di vari organi della pianta nei vari noceti italiani. Il primo importante risultato da mettere in evidenza riguarda il batterio *Brenneria nigrifluens*, che non è mai stato riscontrato in tessuti corticali sani. È chiaro pertanto che questo batterio patogeno non presenta *habitus* endofitico.

Per contro, come appare dalla tabella 13, da tessuti corticali asintomatici (sani) sia del fusto, sia di rami, sia di piante adulte che giovani, sono stati isolati diversi microrganismi fungini, compresi i più importanti patogeni riscontrati nei cancri del fusto.

In particolare, *Botryosphaeria* spp. e *Fusarium solani* sono risultate le specie più ricorrentemente rinvenute ed hanno pertanto confermato la loro grande capacità di infettare i tessuti corticali di piante sane e rimanervi asintomaticamente allo stato endofitico.

D'altra parte è noto come detti generi fungini, *Botryosphaeria* in particolare, risultino essere endofiti in molte specie arboree (SMITH *ET AL.*, 1996; SWART *ET AL.*, 2000; WINGFIELD *ET AL.*, 2001; ATHMAN S.Y. *ET AL.*, 2006)

Da sottolineare come, campioni di tasselli corticali in cui è dimostrata la presenza endofitica di tali patogeni, posti in camera umida non hanno mai fatto sviluppare miceli fungini (Fig. 41).

Per contro, tutti i tasselli prelevati da tessuti malati, a livello dei cancri, in camera umida hanno sviluppato micelio e/o fruttificazioni di *Fusarium*, *Phomopsis* e *Botryosphaeria*, i patogeni riscontrati dagli isolamenti. Ciò sta a significare che mentre nei cancri detti funghi si trovano allo stato patogenetico, in fase di colonizzazione attiva dei tessuti (Fig. 41), nelle zone corticali sane essi si trovano in fase latente, inattiva, endofitica.

Dall'esame di zone sane del fusto di piante malate, l'incidenza di tali patogeni, non è apparsa in alcun modo correlata con la distanza dei prelievi dalle zone interessate dal cancro, almeno a partire dai 10 cm (Fig.39).

Analizzando invece la localizzazione dei microrganismi in strati di tessuti corticali a diversa profondità (Fig. 39), si evince come, nelle zone più interne, a diretto contatto con il cambio, la presenza di tali endofiti fungini sia molto esigua (in molti casi addirittura nulla).

Situazione inversa si riscontra invece nei tessuti alterati dal cancro: in questo caso infatti non è stata notata una differenziazione, intesa come frequenza di isolamento dei principali patogeni coinvolti nella malattia, tra i 3 prelievi a diversa profondità. Probabilmente gli agenti endofiti, passati alla fase patogenica, oppure gli eventuali patogeni insediatisi attraverso inoculo esterno, procedono alla colonizzazione di tutti gli strati dei tessuti corticali, compresi gli strati più esterni del legno.

Da rami di uno, due e tre anni di piante asintomatiche presenti nei diversi impianti considerati (piantagioni di: Roma, Cisterna di Latina, Ravenna, Fassinoro di Rieti, Allerona di Terni, Viterbo e Casale Monferrato di Alessandria), senza significativa distinzione tra le tre tipologie di rami considerati e le varie località, sono stati ricorrentemente isolati: *Botryosphaeria parva*, *Fusarium solani* e *Phomopsis juglandina* (Tab.14). Non si è comunque evidenziata una significativa differenza tra le specie di endofiti patogeni isolati da tessuti corticali dei rami e quelli isolati da fusto delle medesime piante: ciò conferma come nei noceti tali patogeni siano presenti allo stato asintomatico (endofitico) nei tessuti corticali di tutti gli organi legnosi.

Gli unici casi in cui detti patogeni non sono stati riscontrati, allo stadio endofitico, hanno riguardato le piantine di tre anni dei vivai Umbraflor di Spello (PG) e Michelini di Viterbo, in entrambi i casi localizzati lontani da piante adulte di noce, probabilmente per mancanza di fonti di inoculo (Fig. 40; Tab.14)

Situazione differente si è ottenuta dagli isolamenti condotti da tessuti corticali di giovani piante di noce allevati presso i Vivai Conti di Rieti, dove sono stati riscontrati quantunque con frequenze di isolamento relativamente basse, sia *Botryosphaeria* sp. Che *Fusarium* sp., quasi sicuramente ad opera di inoculo proveniente da vicine piante adulte.

In tutti i casi, oltre ai funghi sopra citati, sono stati rinvenuti altri microrganismi fungini, alcuni dei quali ad esempio *Alternaria alternata* e *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum nigrum* e *Penicillium* spp., ripetutamente rinvenuti come endofiti anche su altre specie arboree.

PRESENZA DI CANCRO AL FUSTO	NOCETO	ORGANI	MICRORGANISMI ISOLATI								Isolati nulli
			Presenza- assenza	Frequenza di Isolamento							
				MICRORGANISMI PATOGENI					Microrganismi non patogeni		
				Agenti necrosi corticale				Altro			
				<i>Brenneria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Cladosporium</i>	
Si	Ravenna	Fusto (corteccia)	No	15,07	47,00	27,05	12,70	18,70	0,00	12,50	10,55
		Rami di 1 anno	No	12,50	50,00	12,50	12,50	50,00	0,00	18,75	0,00
		Rami di 2 anni	No	12,50	12,50	37,5	37,50	0,00	0,00	37,50	0,00
		Rami di 3 anno	No	9,80	25,00	52,50	25,00	0,00	0,00	25,00	0,00
Si	Roma	Fusto (corteccia)	No	12,56	39,79	35,00	4,15	7,89	0,00	2,45	3,67
		Rami di 1 anno	No	6,25	50,00	56,25	0,00	12,50	0,00	6,25	0,00
		Rami di 2 anni	No	6,25	25,00	53,12	62,50	18,75	0,00	0,00	0,00
		Rami di 3 anni	No	18,75	37,50	44,87	12,50	18,75	0,00	9,37	0,00
Si	Cisterna di Latina	Fusto (corteccia)	No	12,50	29,16	17,80	13,50	4,16	0,00	12,69	22,00
		Rami di 1 anno	No	10,70	51,50	50,00	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Rami di 2 anni	No	12,50	25,00	36,52	39,50	12,50	0,00	12,50	0,00
		Rami di 3 anno	No	8,90	55,50	35,5	37,50	0,00	0,00	0,00	0,00
No	Fassinoro (RI)	Fusto (corteccia)	No	27,16	14,50	17,80	11,50	5,16	2,08	13,59	21,70
		Rami di 1 anno	No	6,25	12,5	31,25	12,5	18,5	7,5	18,70	6,25
		Rami di 2 anni	No	25,00	6,25	53,12	62,50	8,75	3,00	0,00	0,00
		Rami di 3 anno	No	36,67	16,76	44,87	12,50	11,75	0,00	8,37	0,00
No	Allerona (TR)	Fusto (corteccia)	No	37,16	15,50	7,80	13,50	5,16	2,98	13,45	19,89
		Rami di 1 anno	No	61,50	10,70	50,00	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Rami di 2 anni	No	25,00	12,50	36,52	39,50	12,50	0,00	12,50	0,00
		Rami di 3 anno	No	62,50	10,50	35,50	37,50	0,00	0,00	0,00	0,00
No	Viterbo	Fusto (corteccia)	No	15,78	19,71	9,96	17,80	3,20	2,50	22,60	10,70
		Rami di 1 anno	No	48,00	14,50	12,50	47,70	15,70	5,80	18,75	0,00
		Rami di 2 anni	No	17,50	12,50	37,50	37,50	0,00	0,00	37,50	0,00
		Rami di 3 anno	No	25,00	11,00	67,50	24,90	0,00	0,00	25,00	0,00
No	Casale M. (AL)	Fusto (corteccia)	No	28,20	13,70	15,80	13,90	5,16	2,08	15,59	19,70
		Rami di 1 anno	No	50,00	12,50	12,50	12,50	50,00	0,00	18,75	0,00
		Rami di 2 anni	No	12,50	12,50	37,5	37,50	0,00	0,00	37,50	0,00
		Rami di 3 anno	No	25,00	0,00	62,50	25,00	0,00	0,00	25,00	0,00

Tab.13. Presenza (Si) od assenza (No) del batterio *Brenneria nigrifluens* e frequenza di isolamento (%) dei vari microrganismi fungini isolati da tessuti corticali asintomatici di rami e fusto di piante di *J. regia*, relativi a diverse piantagioni, localizzate in differenti zone dell'Italia Centro- Settentrionale e colpite o meno da cancro del tronco.

TIPI DI PIANTE	NOCETO	PRESENZA FONTE D'INOCULO (PIANTE ADULTE)	ORGANI	MICROORGANISMI ISOLATI										Isolati nulli	
				Presenza- assenza	Frequenza di Isolamento										
					Brenneria	Microrganismi Patogeni				Microrganismi non patogeni					
						Agenti necrosi corticale			Altro						
						Fusarium	Botryosphaeria	Phomopsis	Alternaria	Epicoccum	Cladosporium spp	Penicillium spp	Altro		
Di vivaio (3 anni)	Viterbo	No	Fusto di 3 anni	No	0,00	0,00	0,00	16,66	0,00	0,00	16,66	13,30	70,00		
	Spello (PG)	No	Fusto di 3 anni	No	0,00	0,00	0,00	10,00	0,00	3,33	10,00	3,30	73,30		
	Rieti	Si	Fusto di 3 anni	No	12,23	22,67	0,00	44,00	5,70	2,70	0,00	8,90	12,00		

Tab.14. Presenza (Si) o assenza (No) del batterio *Brenneria nigrifluens* e frequenza di isolamento (%) dei vari microrganismi fungini isolati da tessuti corticali asintomatici di fusto di piante di *J. regia* di tre anni, allevate in vaso, in presenza o meno di fonte di inoculo (piante adulte).

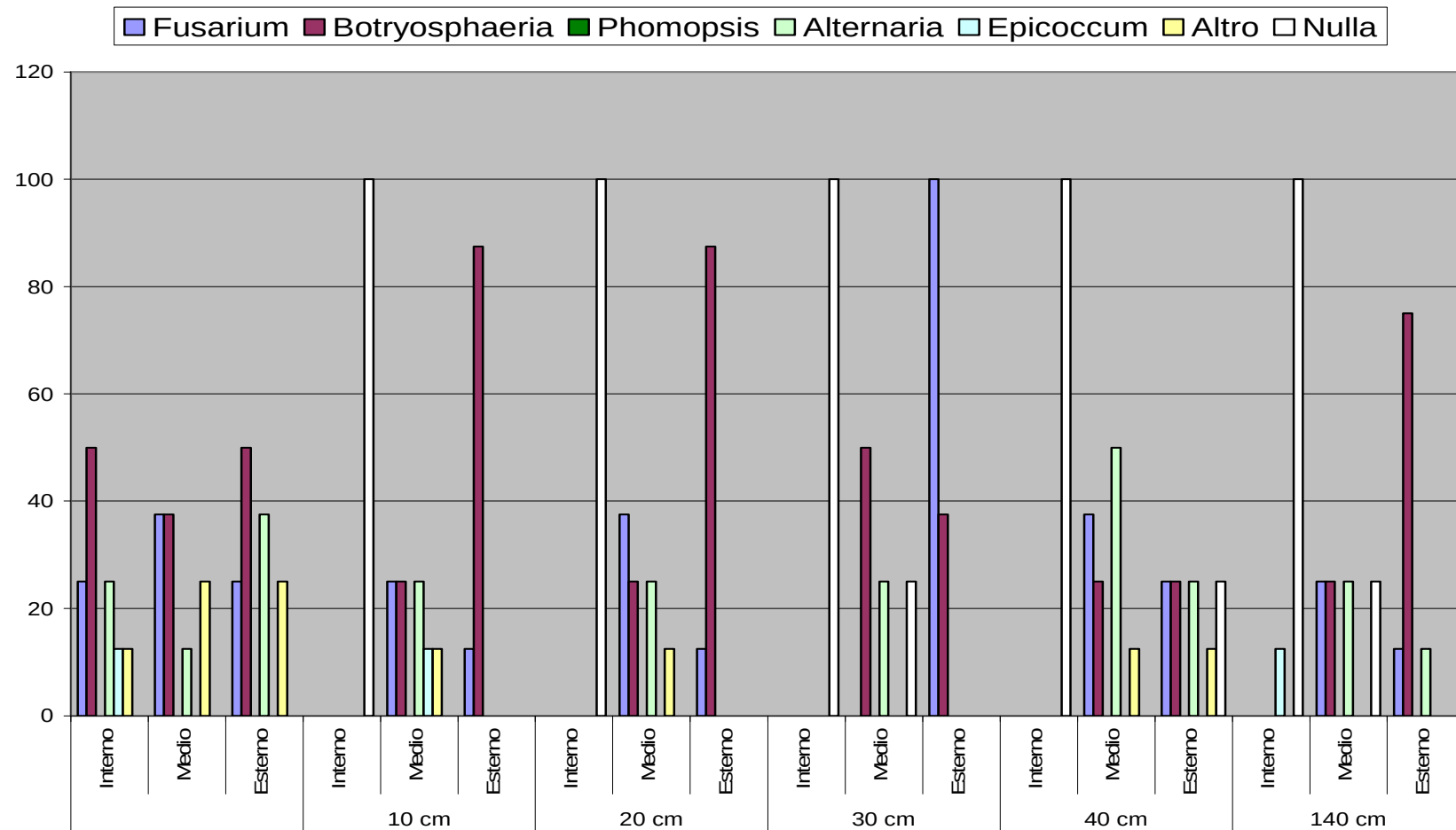


Fig.39. Cisterna di Latina, Luglio 2007. Piante di *Juglans regia* colpite da cancro al fusto. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) di microrganismi fungini riscontrati nei diversi strati (interno, medio ed esterno) in tessuti corticali di piante malate a livello dei cancri (0 cm) ed a distanze crescenti (10, 20, 30, 40 e 140 cm) da questi

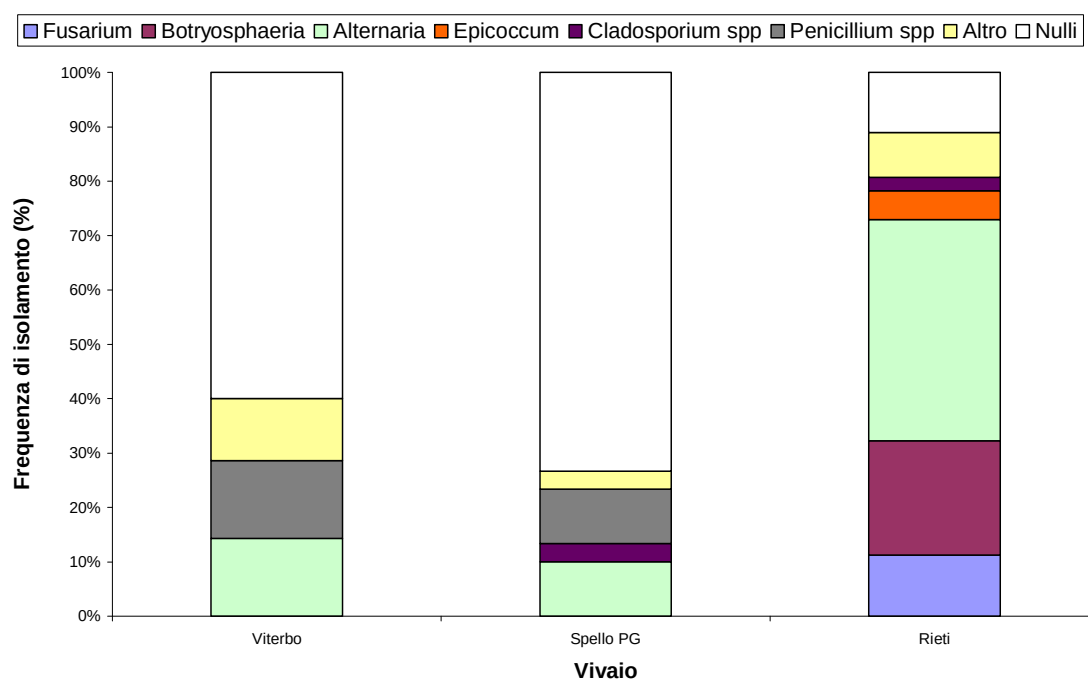


Fig.40. Giugno 2007. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) dei microrganismi fungini isolati da piantine di *Juglans regia* di tre anni allevate in vaso, in vivai localizzati lontano (Spello e Viterbo) o vicino (Rieti) a piante adulte di noce.

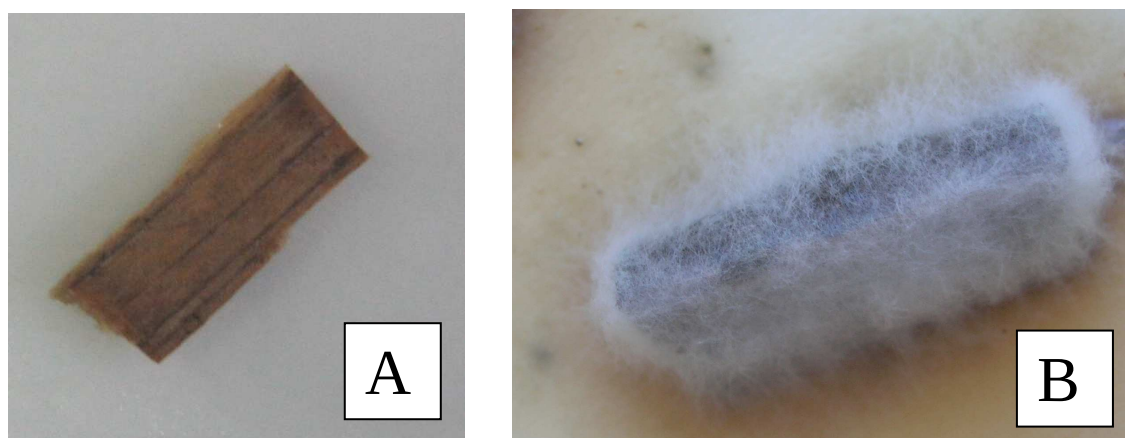


Fig.41. Tasselli di tessuti corticali del fusto di *Juglans regia* posti in camera umida: A un campione di tessuto asintomatico (sano); B campione di tessuto prelevato in corrispondenza di un cancro. Si noti in B lo sviluppo di micelio di *Botryosphaeria parva*.

4.2.5. PROVE DI ANTAGONISMO

Saggi attraverso colture duali

Funghi - Batterio. Come appare dalla figura 43, relativa ad alcuni esempi di prove di antagonismo effettuate a mezzo di colture duali, in piastra Petri, mettendo a confronto il batterio *Brenneria nigrifluens* ed i principali funghi agenti di necrosi corticali isolati dai cancri del fusto (*Botryosphaeria parva*, *Fusarium solani*, *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaeria* sp.) non è stata riscontrata alcuna azione nè antagonistica nè sinergica.

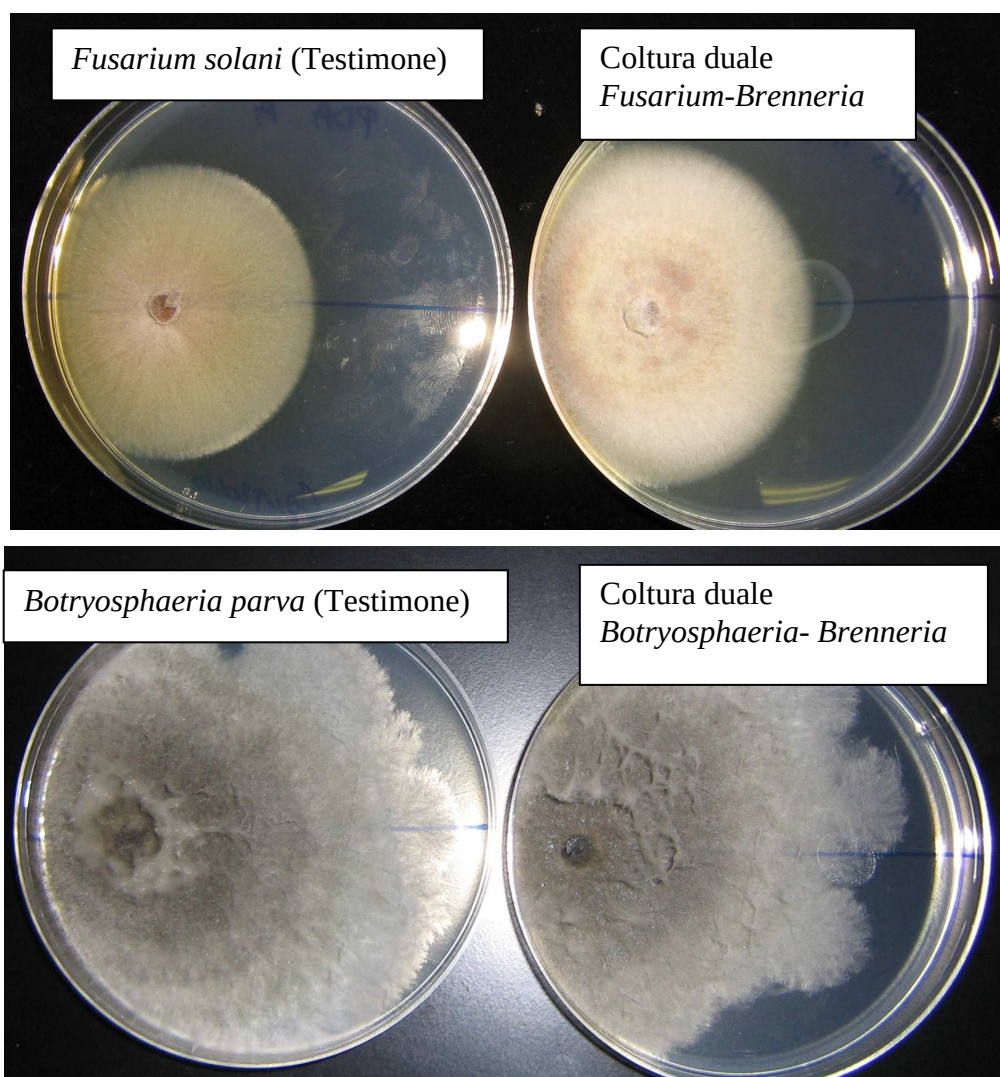


Fig.43. Colture duali, in capsule Petri su terreno ANS, con confronti tra i funghi *Botryosphaeria parva* e *Fusarium solani* ed il batterio *Brenneria nigrifluens*, a sinistra il testimone con le sole colture fungine.

Funghi-Funghi. Come descritto in materiali e metodi, nelle indagini sull'antagonismo tra materiali e metodi, sono stati messi a confronto, in coltura duale i principali agenti fungini patogeni isolati da cancri attivi su piante di noce, ed in particolare le seguenti combinazioni: *Paraphaeosphaeria* – *Fusarium solani*; *Botryosphaeria parva* – *Paraphaeosphaeria*; *Phomopsis juglandina* – *Fusarium solani*; *Botryosphaeria parva* – *Phomopsis juglandina*. Da tali confronti non risulano verificarsi particolari fenomeni di interazione.

Dalle figure 44,45,46,47,48,49, e 50 si evince tuttavia che esiste una reciproca competizione per lo spazio, evidenziata dal fatto che i due miceli non vanno mai a sovrapporsi ma arrestano la loro crescita. Ciò è confermato dagli indici di inibizione (Tab. 17), che, in quasi tutte le combinazioni, dopo appena una settimana dalla inoculazione raggiungono il 100 (massima inibizione).

Merita una particolare menzione il caso della combinazione *Paraphaeosphaeria* sp. – *Phomopsis juglandina*, dove sembrerebbe che il primo fungo eserciti una, sia pure leggera, azione antagononistica nei confronti del secondo, probabilmente in funzione della produzione di qualche metabolita. La crescita di entrambi i miceli posti in colture duali risulta comunque rallentata, se confrontata con i testimoni. Questi risultati ci hanno spinto ad effettuare ulteriori prove, utilizzando i filtrati colturali (vedi paragrafo successivo). Di seguito vengono riportati i grafici relativi alle curve di crescita ottenuti dalle misurazioni giornaliere relative al diametro delle 2 specie fungine poste in coltura duale. Nella tabella 17 sono riportati tutti gli indici di inibizione dei saggi effettuati.

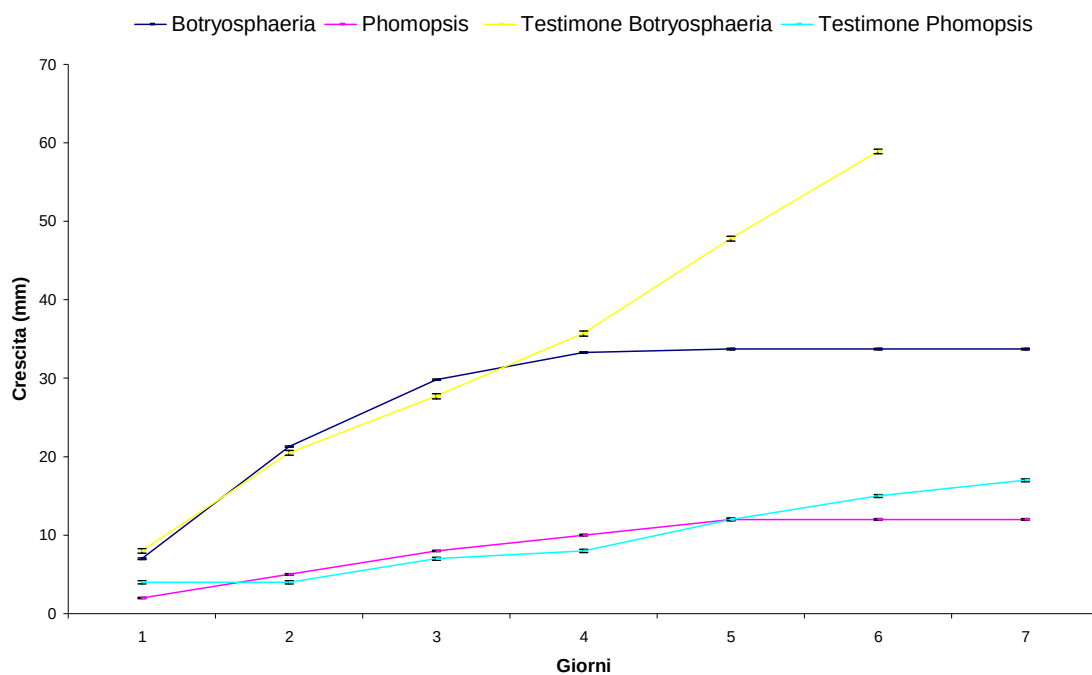


Fig.44. Curve di crescita di *Botryosphaeria parva* e *Phomopsis juglandina* allevate in coltura duale, in confronto con i relativi testimoni.

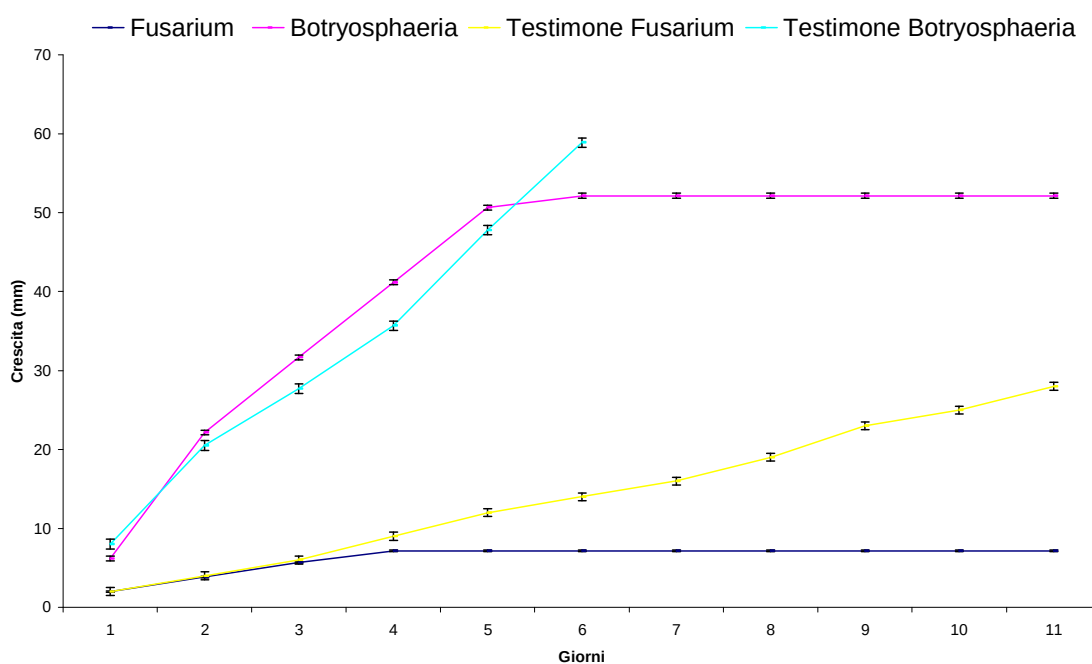


Fig. 45. Curve di crescita di *Botryosphaeria parva* e *Fusarium solani* allevate in coltura duale, in confronto con i relativi testimoni.

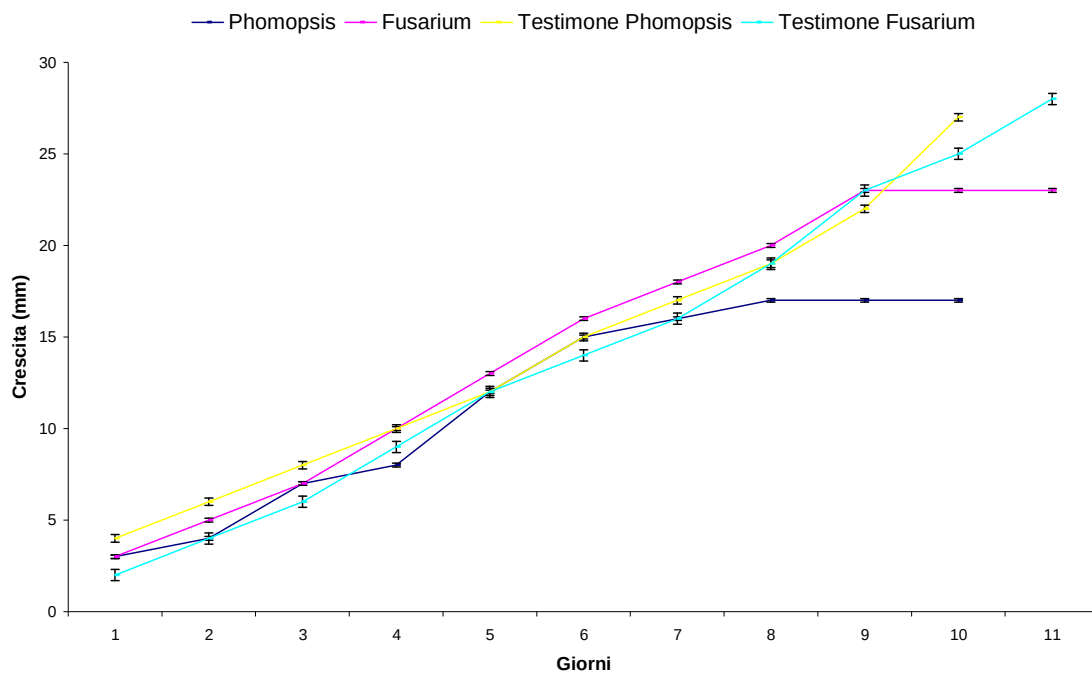


Fig.46. Curve di crescita di *Phomopsis juglandina* e *Fusarium solani* allevate in coltura duale, in confronto con i relativi testimoni.

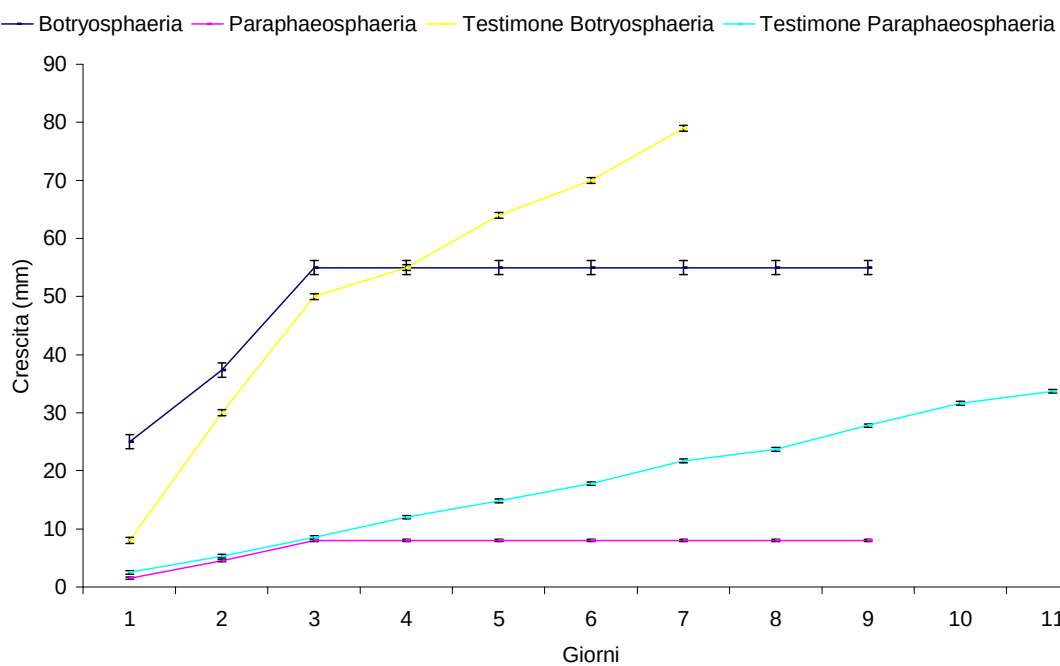


Fig.47. Curve di crescita di *Botryosphaeria parva* e *Paraphaeosphaeria* sp. allevate in coltura duale, in confronto con i relativi testimoni.

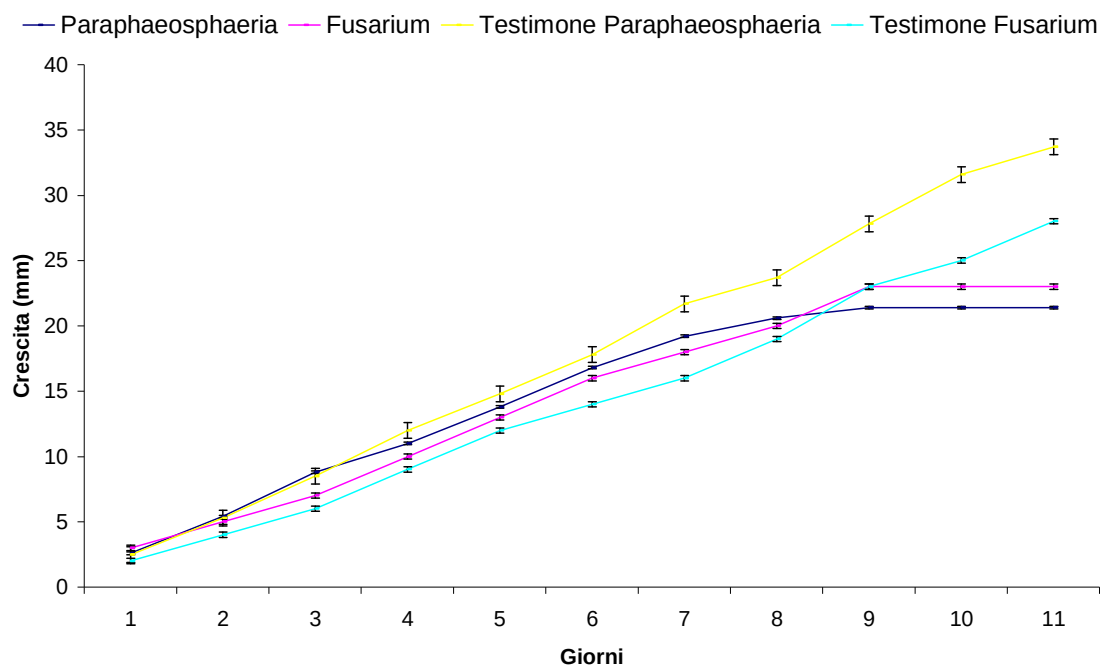


Fig.48. Curve di crescita di *Paraphaeosphaeria* sp. e *Fusarium solani* allevate in coltura duale, in confronto con i relativi testimoni.

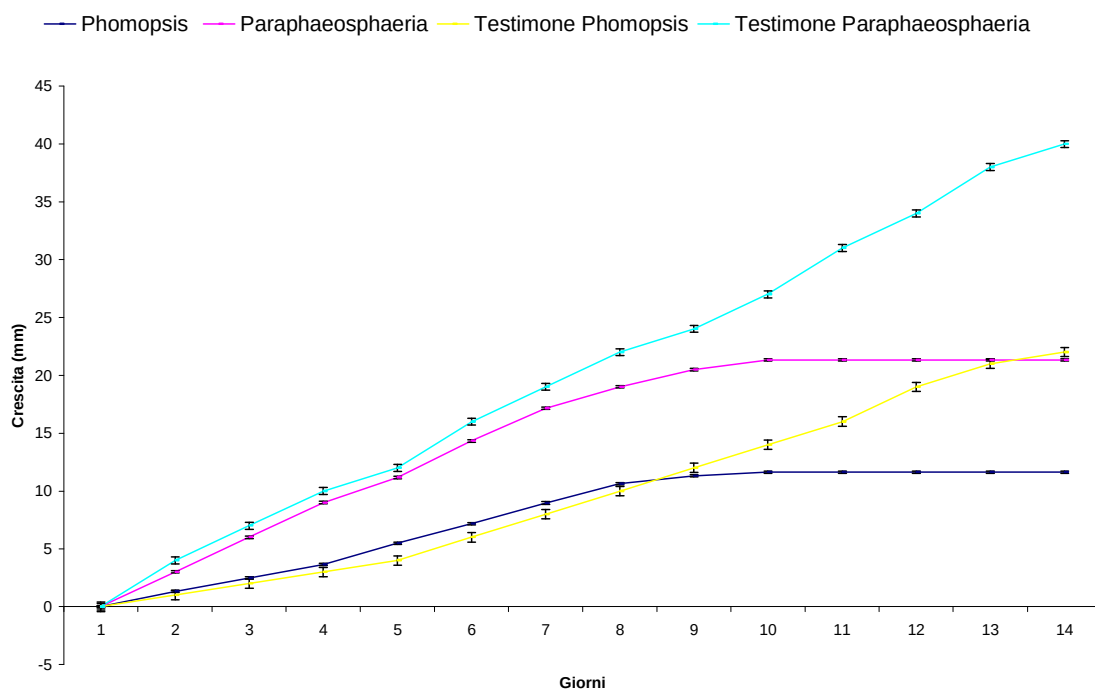


Fig.49. Curve di crescita di *Paraphaeosphaeria* sp. e *Phomopsis juglandina* allevate in coltura duale, in confronto con i relativi testimoni.



Fusarium- Paraphaeosphaeria



Fusarium- Botryosphaeria



Botryosphaeria - Paraphaeosphaeria



Fusarium- Phomopsis



Phomopsis- Paraphaeosphaeria

Fig.50. Esempi di colture duali in Capsula Petri relativi alle varie specie fungine riscontrate nei cancri al fusto del noce da legno. Ai lati le colture testimoni delle singole specie.

PATOGENI FUNGINI	INDICE DI INIBIZIONE								
	GIORNI DALL'INOCULAZIONE								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Fusarium - Paraphaeosphaeria</i>									
<i>Fusarium</i>	-10,50	-7,90	6,70	45,70	59,61	86,90	100	100	100
<i>Paraphaeosphaeria</i>	9,99	12,50	30,21	57,60	66,66	87,50	100	100	100
<i>Fusarium - Botryosphaeria</i>									
<i>Fusarium</i>	30,10	67,50	79,50	100	100	100	100	100	100
<i>Botryosphaeria</i>	27,90	79,80	87,50	100	100	100	100	100	100
<i>Botryosphaeria - Paraphaeosphaeria</i>									
<i>Botryosphaeria</i>	19,20	52,89	87,99	100	100	100	100	100	100
<i>Paraphaeosphaeria</i>	23,66	57,78	79,66	100	100	100	100	100	100
<i>Fusarium - Phomopsis</i>									
<i>Fusarium</i>	-9,80	12,34	21,21	57,00	61,00	87,99	99,77	100	100
<i>Phomopsis</i>	-3,50	11,70	37,50	62,00	71,88	77,99	93,50	100	100
<i>Phomopsis - Paraphaeosphaeria</i>									
<i>Phomopsis</i>	- 10,70	12,59	33,22	56,88	85,90	97,21	100	100	100
<i>Paraphaeosphaeria</i>	19,70	11,70	37,50	63,34	71,21	93,50	100	100	100
<i>Botryosphaeria – Phomopsis</i>									
<i>Botryosphaeria</i>	12,00	39,12	62,00	100	100	100	100	100	100
<i>Phomopsis</i>	17,88	44,55	71,64	100	100	100	100	100	100

Tab.17. Indici di inibizione (%) giornalieri relativi allo sviluppo dei vari patogeni fungini messi a confronto in colture duali.

Saggi attraverso filtrati culturali

Funghi – Batterio. Da prove preliminari effettuate inoculando il batterio *Brenneria nigrifluens* su varie tipologie di terreni (ANS-PDA) addizionati, in diverse proporzioni, a filtrati culturali delle specie fungine *Botryosphaeria parva*, *Fusarium solani*, *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaera* sp. è emerso che solo il filtrato di *Fusarium solani* potesse avere azione inibitoria nella crescita di *Brenneria nigrifluens*.

Da prove più approfondite, inoculando il batterio su terreno liquido (Nutrient Broth) addizionato a filtrato culturale di *Fusarium solani* (Fig. 51) non sono tuttavia emersi rilevanti azioni antagonistiche del filtrato nei confronti del batterio. Da controlli effettuati ogni ora e per 24 ore non si sono registrati differenti gradi di torbidità con il testimone.

Fungo-Fungo. Questi saggi sono stati effettuati in capsule Petri su PDA addizionato a concentrazioni di filtrato culturale di 1:3, 1:1 ed 3:1 (vedi materiali e metodi).

I risultati ottenuti hanno mostrato come tali filtrati non esercitino in nessun caso azione inibitoria e che nessun fungo considerato produce metaboliti ad effetto antagonistico, neppure nel caso di *Phomopsis* - *Paraphaeosphaeria*, che nelle colture duali aveva mostrato energico blocco di accrescimento. Probabilmente si ha, tuttavia, semplicemente una competizione a livello di nutrienti del terreno.

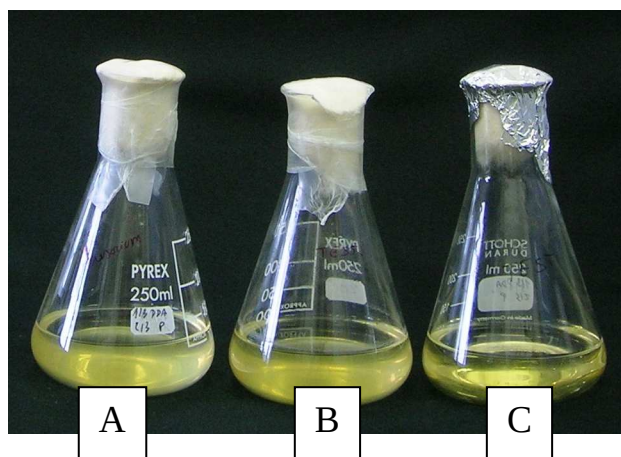


Fig. 51. Inoculazioni del batterio *Brenneria nigrifluens* su Nutrient Broth (A), su Nutrient Broth addizionato a filtrato culturale di *Fusarium solani* in rapporto 50:50 (B), in confronto con il testimone con solo Nutrient Broth (C)

4.2.5. PROBABILE QUADRO EZIOLOGICO DELLA MALATTIA

Dall'insieme dei risultati ottenuti con le nostre ricerche emergerebbe come la malattia del cancro del fusto del noce presenti una eziologia piuttosto complessa, con il coinvolgimento di più patogeni. Sembrerebbe inequivocabile che ad avviare le lesioni sia il batterio *Brenneria nigrifluens*, che peraltro appare specifico del noce. Su tali iniziali lesioni sembrerebbero però celermente intervenire i funghi *Botryosphaeria* spp. (*B. parva*, *B. dothidea* e *B. obtusa*) e *Fusarium solani*, agenti di necrosi corticale su varie piante arboree ed agenti primari anche dei cancri rameali dello stesso *Juglans regia*, su questo sono risultati massicciamente presenti allo stato endofitico, asintomatico, nei tessuti corticali sani del fusto, in pressoché tutte le piantagioni. È probabile che il coinvolgimento di tali patogeni sia reso particolarmente celere proprio dalla loro presenza allo stadio endofitico nei tessuti sani. Le iniziali alterazioni provocate da *Brenneria nigrifluens* potrebbero indurre tali fungilli a passare dallo stadio asintomatico a quello patogenico ed a procedere alla colonizzazione dei tessuti insieme al batterio, andando però ad interessare anche tessuti non attaccati da questo, come quelli profondi, sottocorticali. Mentre infatti il batterio può seguire la colonizzazione, sempre insieme ai funghi, solo superficialmente, creando un vero e proprio fronte di avanzamento corticale della malattia, i funghi riescono a penetrare in profondità, fino al legno, essi peraltro risultano isolabili anche nei tessuti disfatti della parte corticale più annosi del cancro. Con il tempo il batterio sembrerebbe ridurre la sua presenza anche in alcune zone del fronte di avanzamento dei cancri, fino addirittura a sparire nei cancri più evoluti, sostituito da soli funghi. La ricorrente presenza di cancri rameali, in particolare nelle (piante) piantagioni adulte, specie se andate incontro a sofferenza per stress di qualunque natura (carezza idrica, attacchi parassitari, ecc.) potrebbe garantire continuo inoculo per le infezioni sul fusto, sia endofitiche che dirette sul cancro. Le nostre ricerche peraltro non escludono che i due funghi possano provocare cancri al fusto anche senza il batterio, in particolare su piante giovani e/o particolarmente stressate, come è avvenuto nell'impianto di Rieti, dove essi si comportano come patogeni di debolezza. Ai suddetti agenti fungini, sempre agenti di necrosi corticale, si associano saltuariamente i funghi *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaeria* sp., i quali tuttavia, pur essendo anche loro agenti di necrosi corticale, dalle analisi circa la patogenicità tramite inoculazioni artificiali, non sembrano avere grande capacità necrotica. Pertanto si può escludere un loro ruolo attivo nella malattia.

4.3. INDAGINI SUI FATTORI PREDISPONENTI LA MALATTIA

I risultati ottenuti sono stati molto interessanti, soprattutto considerando la densità delle piante, nonché le concimazioni e le irrigazioni.

4.3.1. DENSITÀ DELLE PIANTE

Impianto di San Matteo delle Chiaviche di Mantova. Trattasi, come si ripete, di un impianto sperimentale pluricultivars di *Juglans regia*, costituito da 4 parcelle attigue, caratterizzate da diverse consociazioni e quindi differenti spaziature. È emerso che le parcelle con piante consociate, quindi con maggiore densità, presentano una maggiore percentuale di piante colpite ed una più elevata incidenza (numero medio di cancri) della malattia (Tabb. 18 e 19). L'analisi del comportamento delle diverse cultivar mostra tuttavia come non vi sia differenza, né considerandol'intensità di attacco della malattia (numero medio di cancri per pianta), né considerando la percentuale di piante colpite tra le varie cultivars (disposte per filari) considerate. È altresì emerso come, nella parcella non consociata, con la minore densità, 64 m² per pianta (8 x 8 m), le piante risultino in generale meno colpite dalla malattia, con circa 1 cancro per pianta ed un 30% di piante colpite. Nelle parcelle con consociazioni, con densità di 32 ed 8 m² per pianta (4 x 8 m e 2 x 4 m), gli attacchi sono risultati significativamente più elevati, senza significative differenze tra le due spaziature. Detto comportamento è stato grosso modo analogo per tutte le cultivars di *Juglans regia* presenti (vedi poi).

Consociazioni	Densità delle piante (mxm)	Incidenza della malattia	
		% Pianta colpite	N° medio di cancri per pianta
<i>J. regia</i>	8x8	30,50	1,01±0,3
<i>J. regia</i> + <i>Alnus</i> sp.	4x8	47,22	3,53±0,9
<i>J. regia</i> + <i>Alnus</i> sp + <i>Eleagnus</i>	2x4	43,05	2,55±1,1
<i>J. regia</i> + <i>Alnus</i> + <i>Fraxinus</i> + <i>Sambucus</i> + <i>Eleagnus</i>	2x4	34,37	3,30±1,3

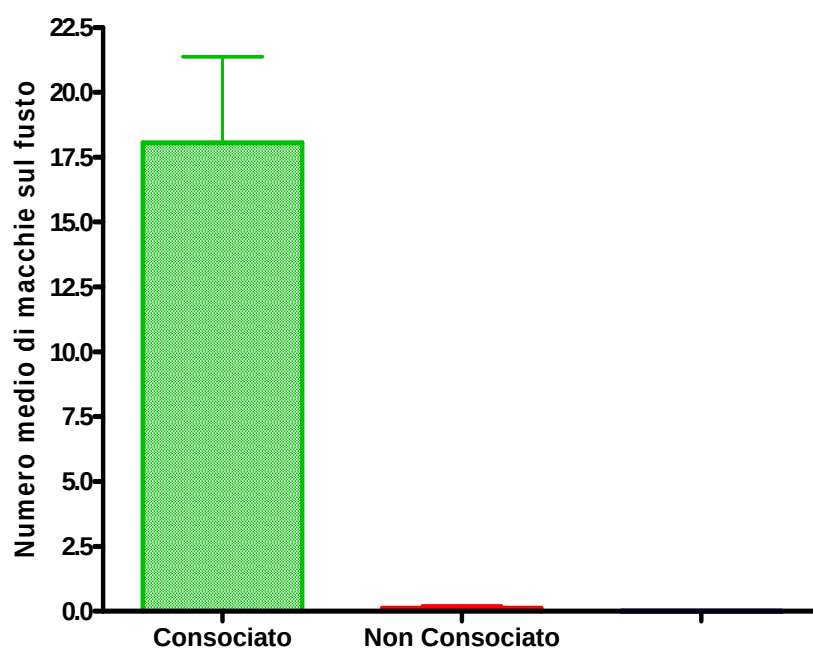
Tab. 18. Piantagione di *Juglans regia* in San Matteo delle Chiaviche al 12° Anno di età. Incidenza del cancro al fusto in piante di *Juglans regia* situate in parcelle caratterizzate da diverso sesto d'impianto per la presenza di piante consociate.

Impianto di Sezzadio di Alessandria. Trattasi di appezzamenti di *Juglans regia* monocoltivar, uno con sesto d'impianto di 3,5x3,5 m perché consociato con varie specie forestali e l'altro con sesto d'impianto di 7x7m perché costituito con solo *Juglans regia*. Anche in questo caso le piante di noce (Tab.19-Fig.52) consociate con altre specie forestali, con una densità di appena 12 m² sono molto più colpite (94,44%) con una notevole intensità di attacco (18,5 cancri per pianta), rispetto alla parcella con densità di 50 m² per pianta, dove, solo il 5,5% di piante risultano colpite peraltro con una intensità di attacco della malattia inferiore ad 1 cancro per pianta.

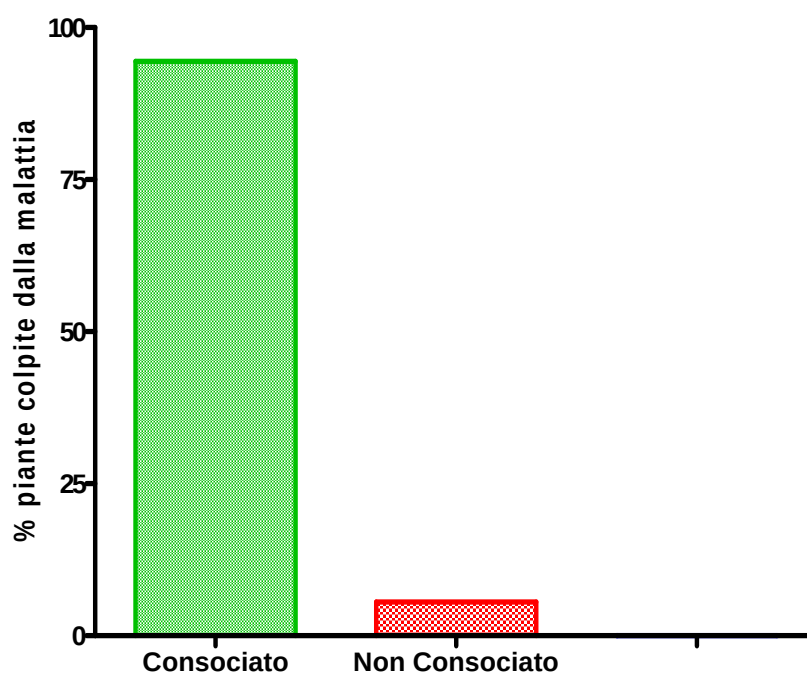
Dai risultati ottenuti circa lo studio del fattore condizionante densità delle piante emerge come questo risulti un elemento in grado di condizionare notevolmente la malattia del cancro del fusto. La copertura della chioma e le consociazioni con altre piante probabilmente favoriscono il crearsi di condizioni microclimatiche, umidità in particolare, favorevoli all'innescò della malattia e quindi dello sviluppo degli organismi responsabili della fitopatia.

CONSOCIAZIONI	SESTO D'IMPIANTO (mxm)	INCIDENZA DELLA MALATTIA	
		% PIANTE COLPITE	N° MEDIO DI CANCRI PER PIANTA
<i>J. regia</i>	7x7	5,55	0,11±0,08
<i>J. regia</i> + <i>Prunus avium</i> + <i>Alnus sp</i> + <i>Sambucus</i> + <i>Eleagnus</i>	3,5x3,5	94,44	18,05±3,31

Tab.19. Sezzadio (AL). Effetti della densità delle piante sull'incidenza del cancro del fusto in un impianto monocoltivar di *Juglans regia* al 13° anno di età.



A



B

Fig. 52. Sezzadio (AL). Settembre 2008. Piantagione monocoltivar di *Juglans regia* al 12° anno di età. Istogrammi delle intensità di attacco della malattia (media del numero di cancri per pianta) del cancro del fusto (A) e della percentuale delle piante colpite (B).

4.3.2. CONCIMAZIONI ED IRRIGAZIONI

Tale studio è stato possibile presso i 3 noceti siti in Cisterna di Latina appartenenti a tre diversi proprietari. Trattasi di tre impianti coetanei, di 16 anni, attigui, di equivalente superficie (circa 1,5 ettari), di forma rettangolare (80x300m), costituiti con piantine di *Juglans regia* di medesima provenienza, con medesimo sesto d'impianto (8x8 m) e caratterizzati da simile terreno, abbastanza omogeneo. Detti impianti hanno subito trattamenti selvicolturali molto diversi: l' impianto A, mai concimato, saltuariamente diserbato e rarissimamente irrigato; l'impianto B, annualmente ben concimato e ben irrigato, con frequenti sarchiature che hanno garantito una buona eliminazione delle malerbe; infine l' impianto C, concimato in maniera modesta, sottoposto ad irrigazione di soccorso ed a sarchiature dell'interfilare.

I tre impianti sono stati sottoposti annualmente ad una valutazione dell'incidenza della malattia, contando su ciascuna pianta il numero di necrosi nei primi tre metri di fusto.

Nelle Figg. 53-54 sono riportati a confronto i dati elaborati per le tre parcelle (A-B-C) nei tre anni di osservazione, più precisamente nella figura 53 sono riportati gli istogrammi relativi all'incidenza della malattia (numero medio di cancri per pianta) e nella figura 54 gli istogrammi relativi alla percentuale di piante colpite, sempre nei 3 anni di osservazioni considerati..

Da tali elaborazioni si evince come, la parcella maggiormente colpita, sia per il numero medio di cancri sul fusto, sia come percentuale di piante colpite risulti essere la parcella "B", nonostante sia quella meglio concimata ed irrigata con piante molto vigorose e rilevanti diametri.

Le buone cure colturali non sembrerebbero aver ridotto l'incidenza della malattia ma, favorendo lo sviluppo e la vigoria della piante, contribuiscono ad una più rapida chiusura della chioma, venendosi così a creare più rapidamente le condizioni microclimatiche più adatte all'insorgere della malattia ed allo sviluppo dei microrganismi coinvolti, *Brenneria nigrifluens* in particolare.

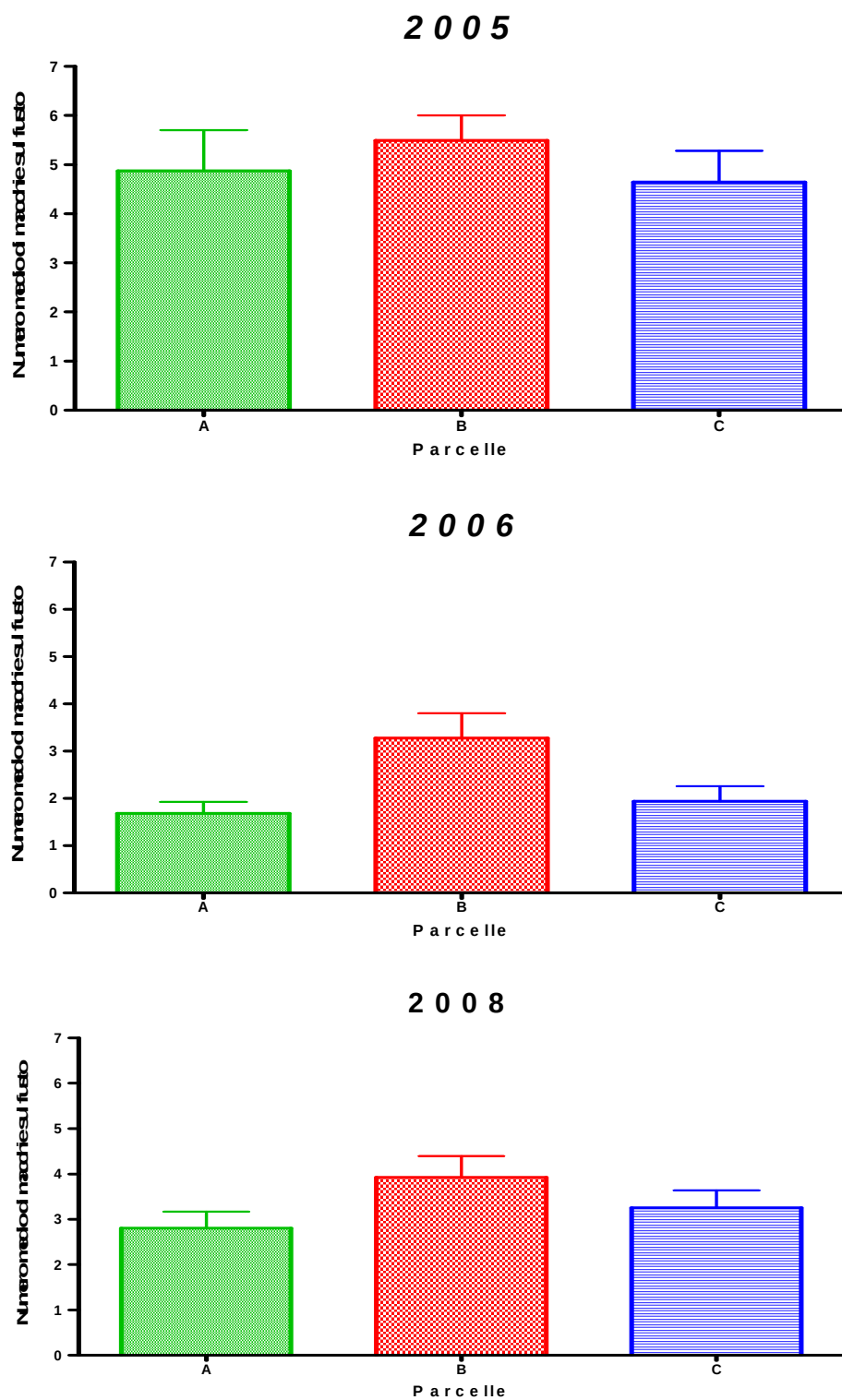


Fig. 53. Cisterna di Latina, piantagioni nonocultivar di *Juglans regia* al sedicesimo anno di età. Istogrammi del numero medio di cancri al fusto per pianta, riscontrato negli anni 2005-2006-2008 nelle parcelle sottoposte ad ottime (B), discrete (C) e nessuna (A) irrigazioni e concimazioni.

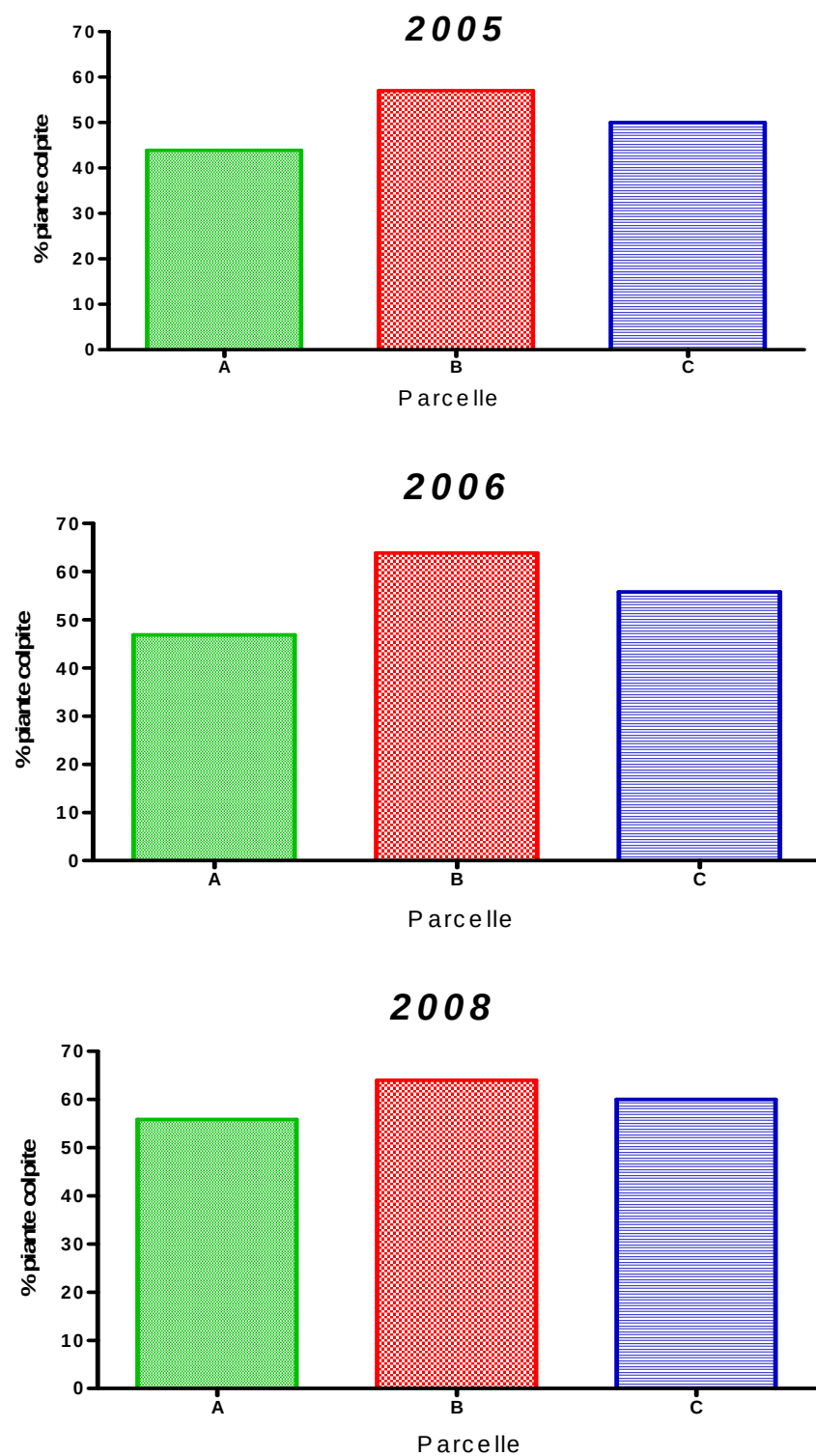


Fig.54. Cisterna di Latina, piantagioni monocoltivar di *Juglans regia* al sedicesimo anno di età. Istogrammi della percentuale di piante colpite da cancro al fusto riscontrate negli anni 2005-2006-2008 nelle parcelle sottoposte ad ottime (B), discrete (C) e nessuna (A) irrigazioni e concimazioni.

4.3.3. FATTORI VARI

Come già accennato nei materiali e metodi, al fine di individuare le cause predisponenti gli attacchi del cancro del noce, insieme alle precedenti indagini condotte *ad hoc*, si è cercato di analizzare le situazioni stazionali e di impianto relative ai vari noceti in cui finora è stata riscontrata la malattia. Sono stati in particolare rilevati: sesto d'impianto, età, diametro delle piante, stato dell'impianto (buono, mediocre e scarso), fertilità del suolo (buona, mediocre o scarsa), ogni eventuale fattore di stress a cui potrebbero essere andate incontro le piante, nonché l'esposizione prevalente dei cancri sul tronco (vedi tab.1).

L'insieme di dette informazioni hanno in primo luogo confermato l'importanza della elevata densità delle piante sull'incidenza della malattia, sia quando dipendente dall'età del noceto, sia quando connessa alla presenza di altre specie forestali consociate. Sette dei dieci impianti (colpiti) considerati presentano infatti una età pari o di oltre 15 anni, con sviluppo delle piante che comporta chiome molto vicine tra loro, con facili ristagni di umidità a livello del tronco. Degli altri tre, quello di Sezzadio e di San Matteo delle Chiaviche presentano consociazioni. Nell'impianto di Rieti, di appena otto anni, è invece presumibile che sia il terreno, particolarmente ostile e quindi fonte di stress, la causa dei cancri, i quali però sono risultati originati solo da agenti fungini. Vista l'età giovane dell'impianto, il modesto diametro e la ridotta chioma delle piante, è probabile che non si siano create condizioni di umidità in grado di scatenare gli attacchi del batterio *Brenneria nigrifluens*.

Un altro aspetto che è emerso dai suddetti rilievi è la prevalente esposizione dei cancri al fusto nella parte assolata. Questo aspetto è stato approfondito presso gli impianti di Cisterna di Latina (già considerati per le analisi relative alle tecniche colturali), dove è stata annotata l'esposizione dei singoli cancri presenti, di ogni singola pianta, facendo riferimento ai punti cardinali.

La figura 55 conferma come oltre il 55% dei cancri, con punte delle 85% nella piantagione meno vigorosa, siano localizzati nella zona del fusto esposta a Sud-Ovest, con a seguire le localizzazioni ad Est ed a Sud. Ciò è probabilmente legato al fatto che in dette zone l'ingresso dei patogeni potrebbe essere stato facilitato dalla presenza di microferite che si vengono a creare ad opera del sole diretto sul tronco o comunque degli sbalzi di temperatura tra le ore pomeridiane e quelle serali.

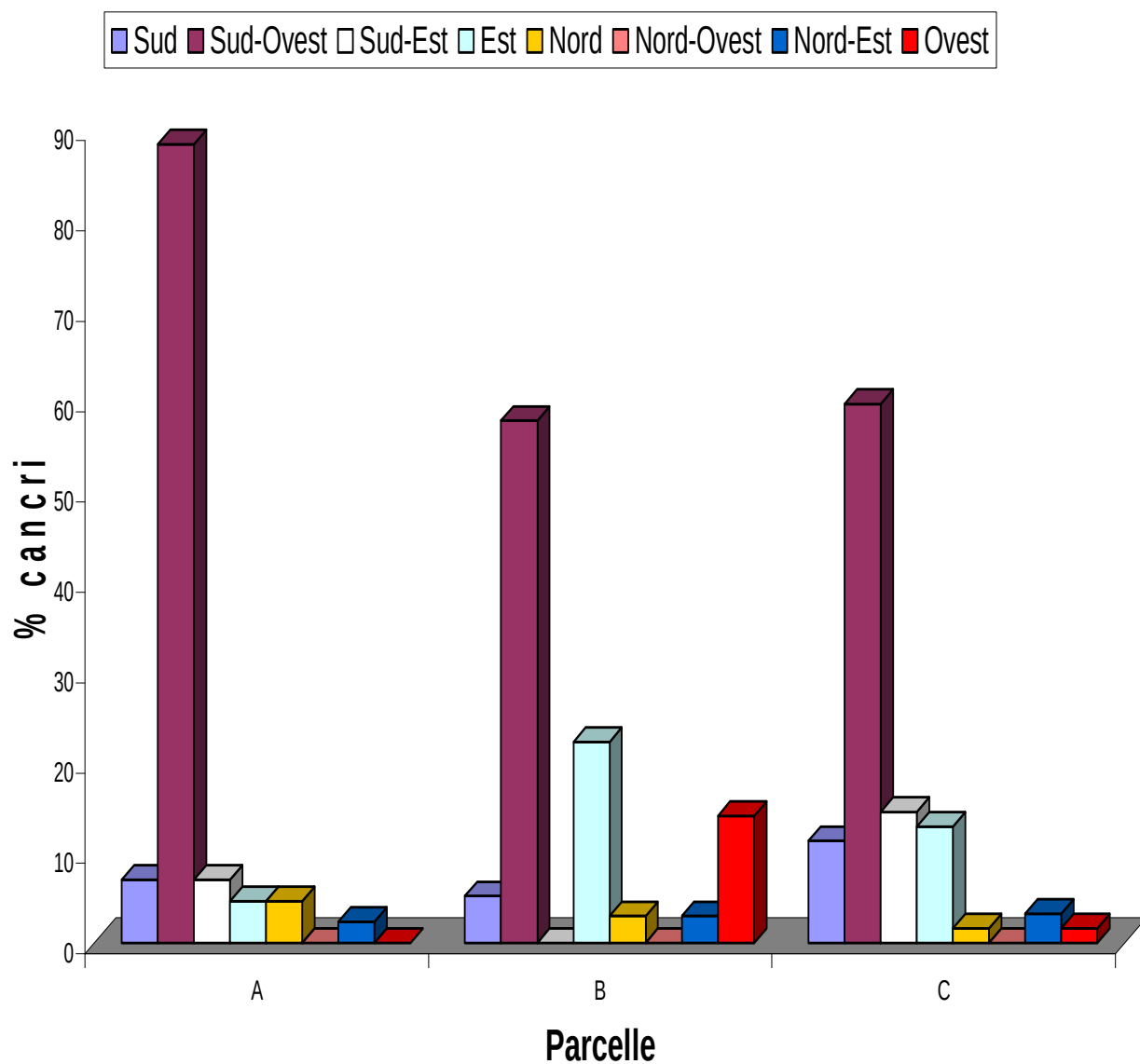


Fig.55.Cisterna di Latina. Settembre 2006. Piantagioni di *Juglans regia* al sedicesimo anno di età. Istogrammi relativi alle percentuali medie di cancri del fusto, caratterizzati da medesima esposizione.

4.4. RESISTENZA GENETICA ALLA MALATTIA

4.4.1. ANALISI DELLA RESISTENZA IN CAMPO

Tali rilievi sono stati possibili nell'impianto di San Matteo delle Chiaviche, caratterizzato da cultivars diverse di *Juglans regia* in confronto con *Juglans nigra* e un ibrido tra le due specie, denominato NG 23, nell'impianto pluriclonale di Rieti, dove sono presenti 4 cloni differenti di *Juglans regia* e negli impianti di Cisterna di Latina e di Loreto, dove invece sono presenti parcelle attigue, coetanee, di *Juglan regia* e *Juglans nigra* (Tab.21). Nelle figure 56 e 57, sono riportati gli istogrammi relativi ai valori medi della percentuale delle piante colpite e del numero di cancri per pianta rispettivamente relativi a ciascuna cultivar presente nell'impianto di san Matteo delle Chiaviche. Da tali rappresentazioni emerge che tutte le cultivars di *J. regia* risultano molto colpite dalla malattia, con differenze che, quantunque rilevanti, non sono statisticamente significative, anche per l'elevatissima variabilità tra gli individui.

Per contro emergerebbe una netta differenza tra le suddette cultivar di *J. regia* e *J. nigra*, praticamente esente dalla malattia. Anche l'ibrido NG23 tra le due specie (*J. nigra* x *J. regia*), ha mostrato attacchi irrisori.

Una assoluta resistenza verso il cancro del fusto da parte di *J. nigra* è stata confermata anche negli impianti di Loreto e di Cisterna di Latina, dove parcelle di quest'ultima specie adiacenti a quelle molto colpite colpite di *J. regia* erano praticamente esenti dalla malattia. Quantunque detti confronti non derivino da piantagioni *ad hoc*, l'assenza di cancri su numerose piante di *J. Nigra*, vicine e parallele a *J. Regia*, fortemente colpite dalla malattia, sembrerebbe mostrare una indubbia resistenza da parte di tale specie.

Quanto all'impianto commerciale di Rieti (Figg.58 e 59), costituito da quattro diversi cloni di *Juglans regia* (Umbra, Midland, Franquette e Parisienne) ed attaccato però da cancri si sola origine fungina, i cloni più colpiti sono apparsi Umbra e Parisienne, cui segue il clone Franquette ed infine Midland, l'unico che in realtà si discosta dagli altri con un valore statisticamente significativo.

Infine, dalle analisi effettuate presso l'impianto di Cisterna di Latina, si confermano i risultati di San Matteo delle Chiaviche, *J. nigra* risulta infatti esente da cancri al fusto, al contrario di *J. regia* che risulta invece particolarmente colpito, con più di 3 cancri per pianta e quasi il 60% delle piante colpite.

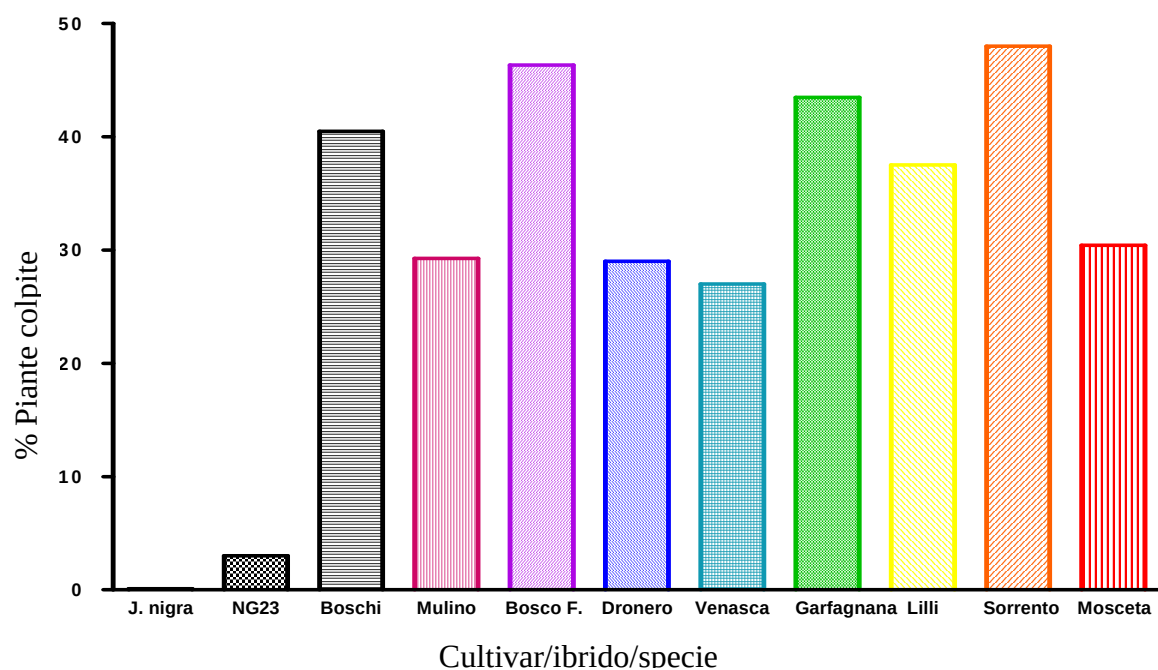


Fig.56. Piantagione di noce da legno in S. Matteo delle Chiaviche (MN). Istogrammi della percentuali di piante colpite da “cancri corticali” nelle diverse cultivar di *Juglans regia*, in *Juglans nigra* e nel loro ibrido NG23.

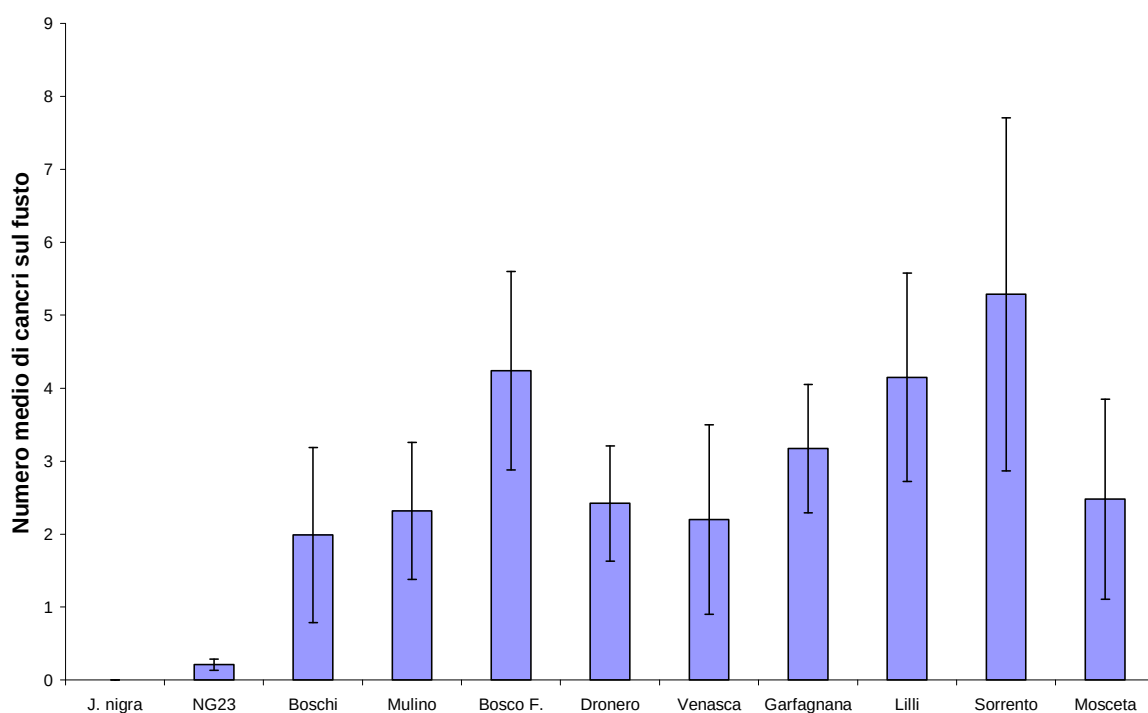


Fig.57. Piantagione da legno in San Matteo delle Chiaviche (MN). Istogrammi delle intensità medie di attacco del cancro al fusto (numero di cancri per pianta) relativi alle diverse cultivars di *Juglans regia*, a *Juglans nigra* ed al loro ibrido NG23.

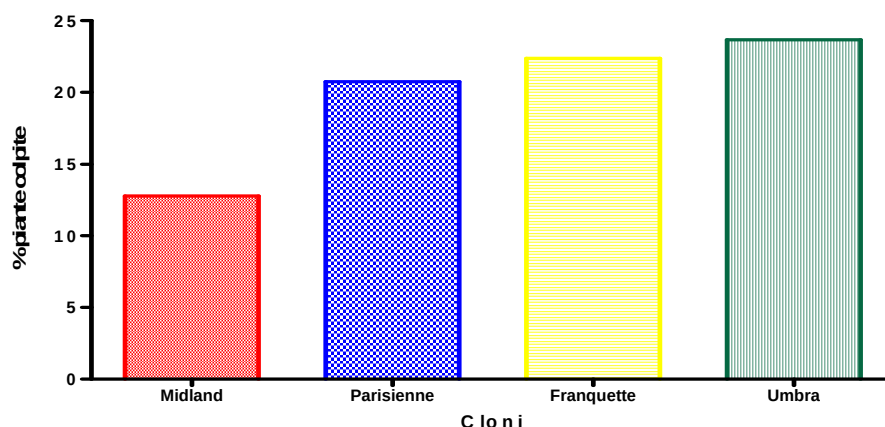


Fig.58. Piantagione di noce da legno in Rieti. Istogrammi della percentuale di piante colpite da “cancri corticali” nei diversi cloni di *Juglans regia*.

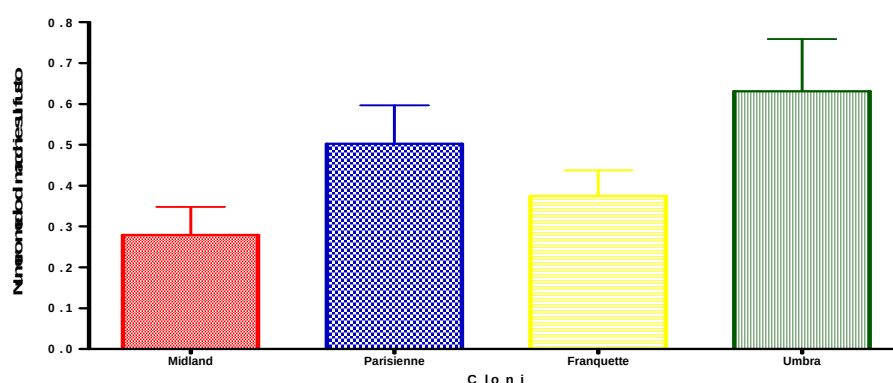


Fig.59. Piantagione di noce da legno in Rieti. Istogrammi dell’intensità di attacco media dei cancri corticali al fusto (numero di cancri per pianta) nei quattro cloni di *Juglans regia*.

PIANTAGIONE (LOCALITÀ)	SPECIE	PIANTE CONSIDERATE (NUMERO)	INCIDENZA DEL CANCRO AL FUSTO	
			% PIANTE COLPITE	N° MEDIO DI CANCRI PER PIANTA
San Matteo Delle Chiaviche	<i>Juglans regia</i>	250	30	1,01±0,3
	<i>Juglans nigra</i>	20	0	0
	<i>J. regia</i> x <i>J.nigra</i> (NG23)	60	0	0,1
Loreto	<i>Juglans regia</i>	200	40	7±2,3
	<i>Juglans nigra</i>	50	0	0
Cisterna di Latina	<i>Juglans regia</i>	150	60	3,32±1,2
	<i>Juglans nigra</i>	50	0	0

Tab. 20. Comportamento verso il cancro del tronco da parte di *Juglans nigra* in confronto a *Juglans regia* ed a un loro ibrido (NG23), presso tre piantagioni colpite dalla malattia.

4.4.2. INDAGINI SULLA RESISTENZA ATTRAVERSO INOCULAZIONI ARTIFICIALI IN SERRA

Il lavoro condotto attraverso inoculazioni artificiali di talee in ambiente controllato, oltre ad ottenere ulteriori informazioni in merito alla resistenza del cancro del fusto da parte di differenti cultivars o cloni di *Juglans regia*, in confronto con *Juglans nigra* ha permesso di rilevare il comportamento verso la malattia da parte di specie diverse di *Juglans*, di loro ibridi o di generi consimili. Dalle indagini preliminari, condotte utilizzando materiale genetico proveniente dalla piantagione di San Matteo delle Chiaviche di Mantova, sono stati messi in evidenza alcuni importanti aspetti procedurali di base, estremamente utili per il proseguo delle ricerche. In particolare è emerso che:

1. le tecniche di inoculazione dei vari patogeni, nelle varie serie di saggi hanno offerto risultati sempre concordanti tra loro, evidenziandone l'idoneità ai fine delle indagini;
2. relativamente alle due tipologie di inoculazioni utilizzate per il batterio *Brenneria nigrifluens*, quella a spot e quella a taglio, sembrerebbe che esse portino a risultati pressoché analoghi;
3. per ottenere risultati comparabili con il comportamento in campo, l'epoca migliore per effettuare le inoculazione è apparsa la primavera, appena dopo la ripresa vegetativa;
4. le inoculazioni condotte su talee disidratate, quantunque inducano lesioni di maggiore estensione, non modificano il trend delle risposte relativo a materiale fresco;
5. mentre *Brenneria nigrifluens*, *Fusarium solani* e *Botryosphaeria* spp. inducono lesioni di rilevanti dimensioni, sia pur variabile con il materiale genetico, i fungilli *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaeria* sp. hanno mostrato scarsa capacità a produrre necrosi. Per questo motivo, questi due ultimi patogeni sono stati esclusi dalle indagini successive;
6. dei tre suddetti patogeni che hanno dimostrato indurre necrosi, il batterio *Brenneria nigrifluens*, più che degradazioni, è risultato essenzialmente produrre imbrunimenti dei tessuti; *Fusarium solani* è l'unico che, accanto a necrosi interne induce anche alterazioni cancerose esterne, talora addirittura con screpolature aperte; *Botryosphaeria* spp. induce necrosi senza fessurazioni esterne, generalmente in estensione più marcata rispetto agli altri due agenti;

7. in ogni caso le alterazioni indotte si sviluppano per lo più in senso longitudinale, tanto che per misurare l'estensione, si è ritenuto opportuno indicarne la lunghezza, risultata pressochè proporzionale al "volume" delle alterazioni.

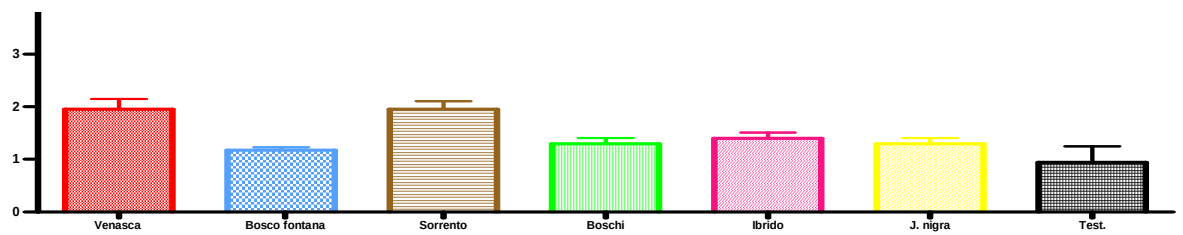
Ciò premesso, di seguito vengono illustrati, in successione, i risultati relativi al materiale genetico proveniente rispettivamente: 1) dalla piantagione di San Matteo delle Chiaviche di Mantova (del Sig. Maurizio Mattioli), comprendente diverse cultivar di *Juglans regia*, unitamente a *Juglans nigra* ed al loro ibrido NG23; 2) dall' impianto dell'Azienda Ovale di Roma, comprendente *Juglans regia*, *Juglans nigra* e gli ibridi NG23 (*J. regia* x *J. nigra*) e Mj 209 (*J. regia* x *J. major*); 3) dall'impianto dell'Azienda Cesurni di Tivoli, comprendente specie diverse di *Juglans* in confronto con una specie di *Carya* e due di *Pterocarya*. Aziende queste ultime appartenenti al C.R.A., del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali.

4.4.2.1. Resistenza di cultivars diverse di *Juglans regia*

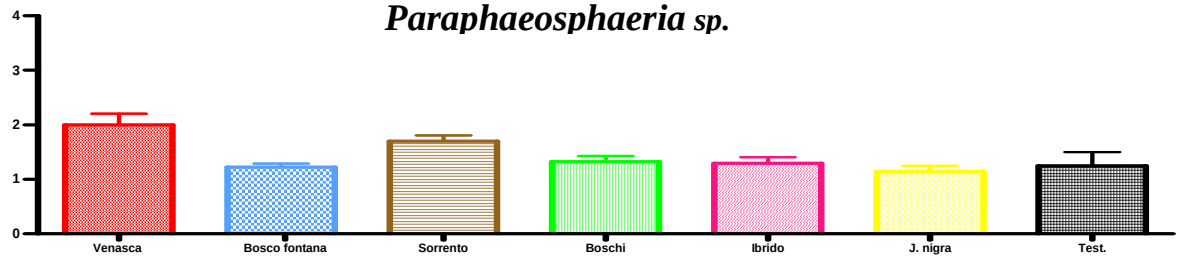
Dalla prova condotta con il materiale genetico di San Matteo delle Chiaviche, (Tab. 21; Figg. 60 e 61) emerge in particolare che:

- il patogeno che, ad un mese dalle inoculazioni, provoca le lesioni più estese è risultato *Botryosphaeria* spp., seguita da *Fusarium solani* e *Brenneria nigrifluens*, la quale, più che necrosi si conferma provocare imbrunimenti;
- Inoculazioni effettuate con 3 diverse specie di *Botryosphaeria* (*B. parva*, *B. dothiea* e *B. obtusa*) hanno prodotto lesioni del tutto analoghe tra di loro, per questo motivo nelle prove successive è stata usata solo *B. parva*.
- modesta è risultata l'azione necrotica di *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaeria* sp., che inducono necrosi poco superiori a quelle registrate per il testimone non inoculato;
- le necrosi più estese si sono registrate sulle quattro provenienze di *Juglans regia* (Bosco fontana, Venasca, Boschi e Sorrento), che non sembrerebbero mostrare significative differenze tra loro, seguite a distanza da quelle dell'ibrido NG23 tra *J. regia* e *J. nigra* e quindi da *Juglans nigra*.

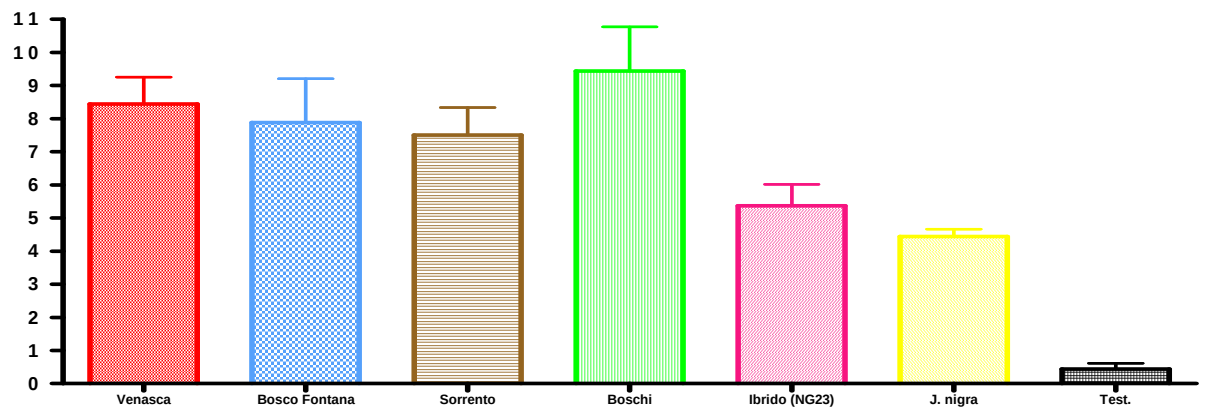
Phomopsis juglandina



Paraphaeosphaeria sp.



Brenneria nigrifluens



Fusarium solani

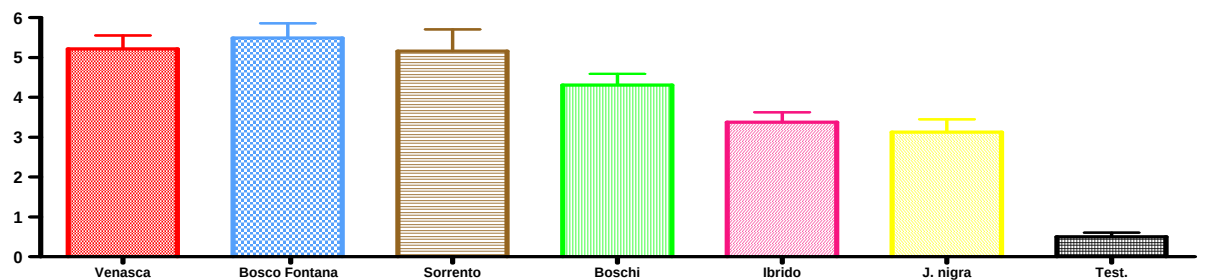
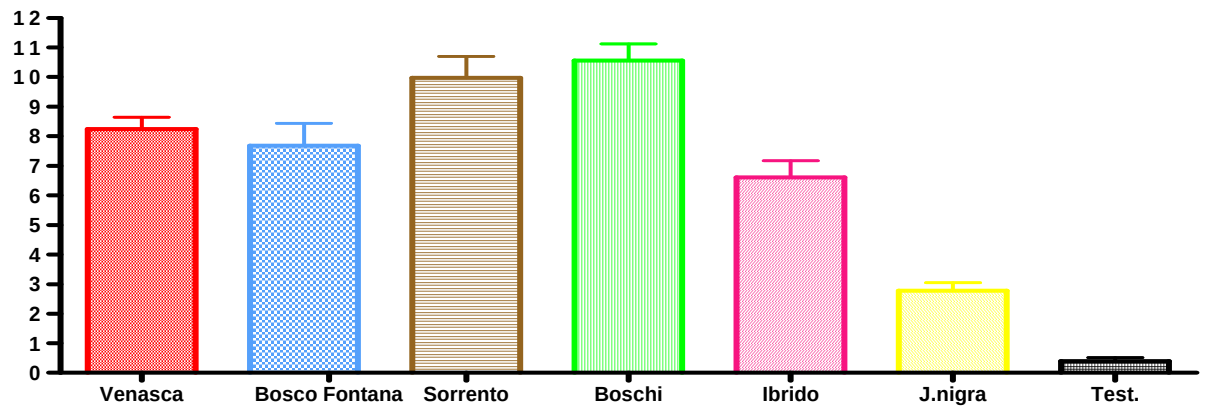
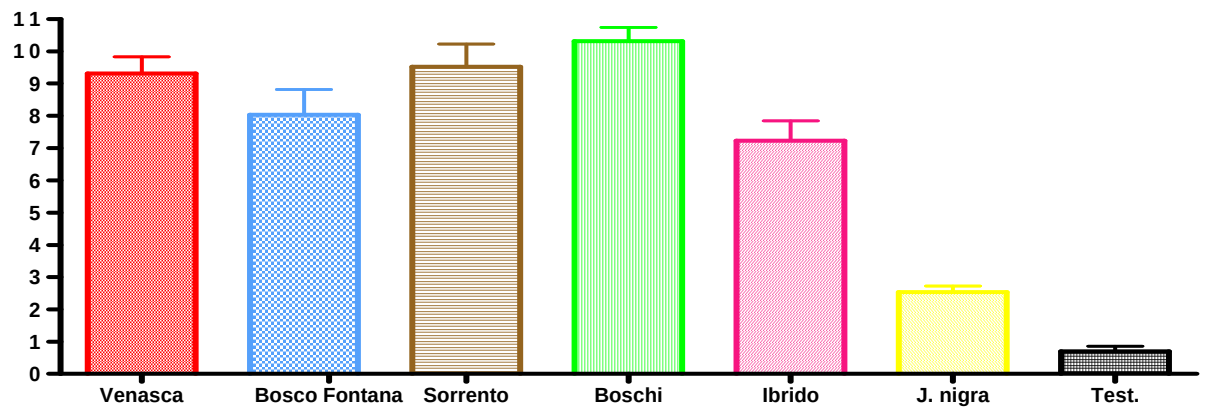


Fig.60. Istogrammi delle ampiezze delle necrosi su talea da inoculazioni artificiali di *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaeria* sp., *Brenneria nigrifluens* e *Fusarium solani* in diverse cultivars di *Juglans regia*, in *Juglans nigra* e nel loro ibrido (NG23), in confronto con il testimone senza inoculazione fungina.

Botryosphaeria parva



Botryosphaeria dothidea



Botryosphaeria obtusa

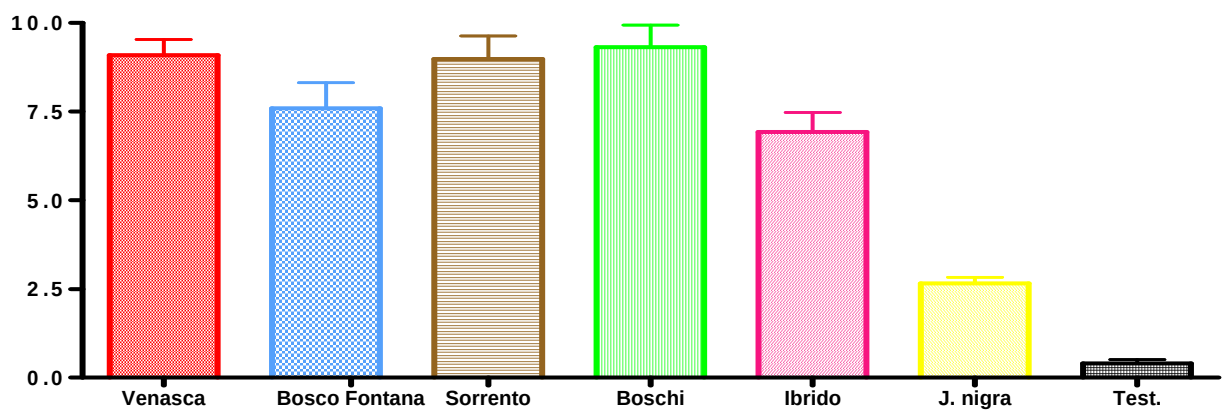


Fig. 61. Istogramma delle ampiezze (cm) delle necrosi indotte da inoculazioni artificiali di *Botryosphaeria parva*, *Botryosphaeria obtusa* e *Botryosphaeria dothidea* in cultivars diverse di *Juglans regia*, in *Juglans nigra* e nel loro ibrido NG23.

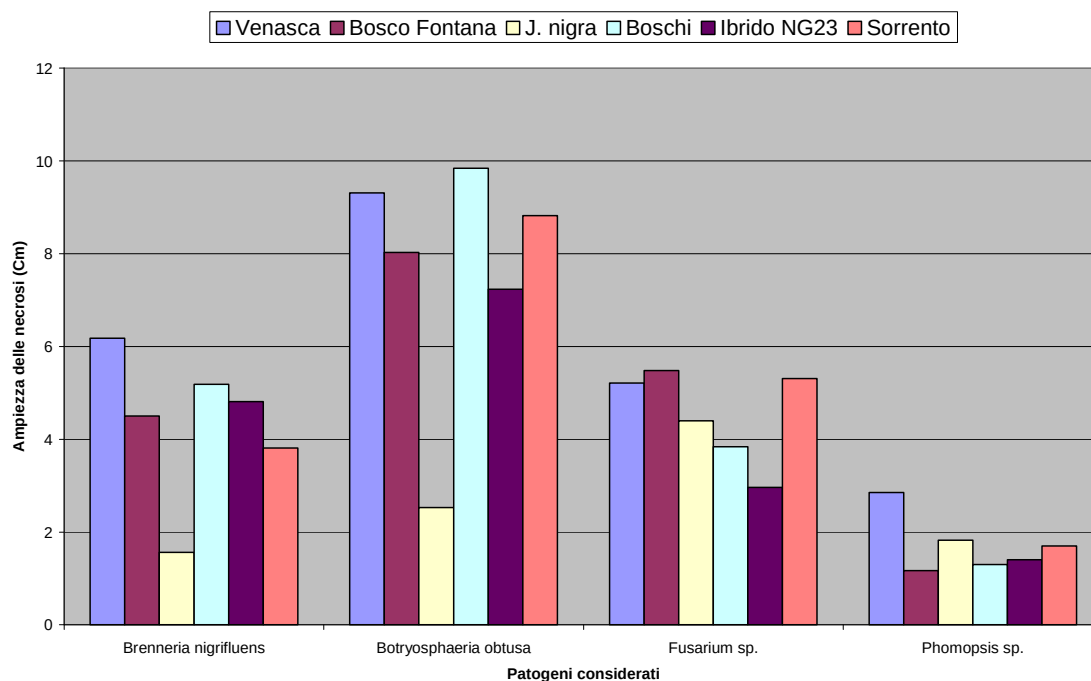


Fig.62. Istogramma delle ampiezze (cm) delle necrosi nelle varie specie, cultivar o ibridi in seguito ad inoculazioni artificiali con *Brenneria nigrifluens*, *Botryosphaeria parva*, *Fusarium solani* e *Phomopsis juglandina*.

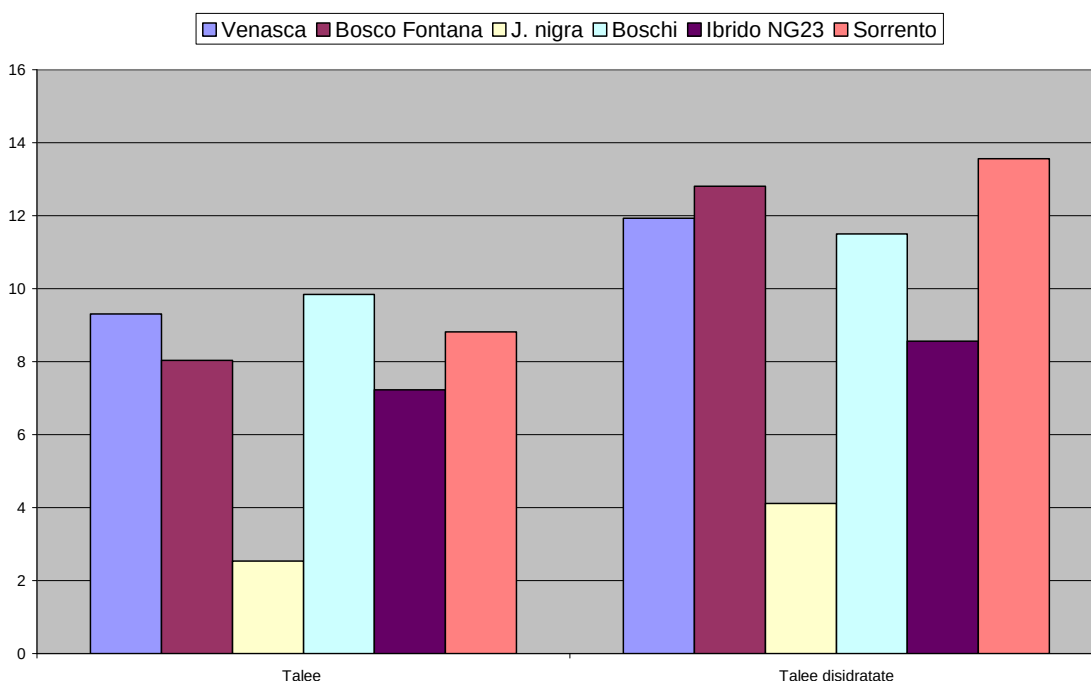


Fig. 63. Istogramma delle ampiezze (cm) delle necrosi nelle varie specie, cultivar o ibridi di *Juglans* in seguito ad inoculazioni artificiali con *Botryosphaeria parva* su talee fresche e disidratate.

PATOGENI INOCULATI		CULTIVARS				IBRIDO	SPECIE
		<i>Venasca</i>	<i>Bosco Fontana</i>	<i>Sorrento</i>	<i>Boschi</i>	<i>J.regia</i> x <i>J. nigra</i>	<i>Juglans nigra</i>
		Ampiezze delle necrosi (cm)					
<i>Brenneria</i>		8,43±2,2	7,87±3,7	7,5±2,3	9,4±3,7	5,3±1,8	4,4±0,7
<i>Botryosphaeria</i>	<i>parva</i>	8,2±2,2	7,6±4,2	9,9±4,0	10,5±3,1	6,6±3,1	2,7±1,5
	<i>obtusa</i>	9,0±2,4	7,5±4,0	8,9±3,6	9,3±3,5	6,9±3,1	2,6±0,9
	<i>dothidea</i>	9,3±2,8	8,0±4,4	9,5±4,0	10,3±2,4	7,2±3,4	2,5±1,0
<i>Fusarium</i>		5,2±1,9	5,4±2,1	5,1±3,1	4,3±1,5	3,3±1,4	3,1±1,8
<i>Phomopsis</i>		1,9±0,8	1,1±0,2	1,9±0,6	1,3±0,4	1,4±0,5	1,3±0,4
<i>Paraphaeosphaeria</i>		2,0±0,9	1,2±0,3	1,7±0,4	1,3±0,4	1,3±0,4	1,1±0,4
Testimone		0,4±0,11	0,5±0,09	0,9±0,3	0,8±0,2	0,3±0,1	0,6±0,1

Tab.21. Ampiezza delle necrosi (cm) indotte da inoculazioni artificiali con *Brenneria*, *Botryosphaeria*, *Fusarium*, *Phomopsis* e *Paraphaeosphaeria* su cultivars diverse di *Juglans regia*, su *Juglans nigra* e su un loro ibrido, NG23.

4.4.2.2. Resistenza di *Juglans nigra*, *Juglans regia* e relativi ibridi

E' stato messo in evidenza (Tab. 22; Fig.64) come *J. regia*, abbia presentato lesioni più ampie con tutti e tre gli agenti utilizzati, *Brenneria nigrifluens*, *Botriospaheria parva* e *Fusarium solani*, al contrario, *J. nigra* ha mostrato essere più resistente, con lesioni mediamente molto inferiori. Valori intermedi si sono ottenuti con i 2 ibridi analizzati NG23 e MJ 209.

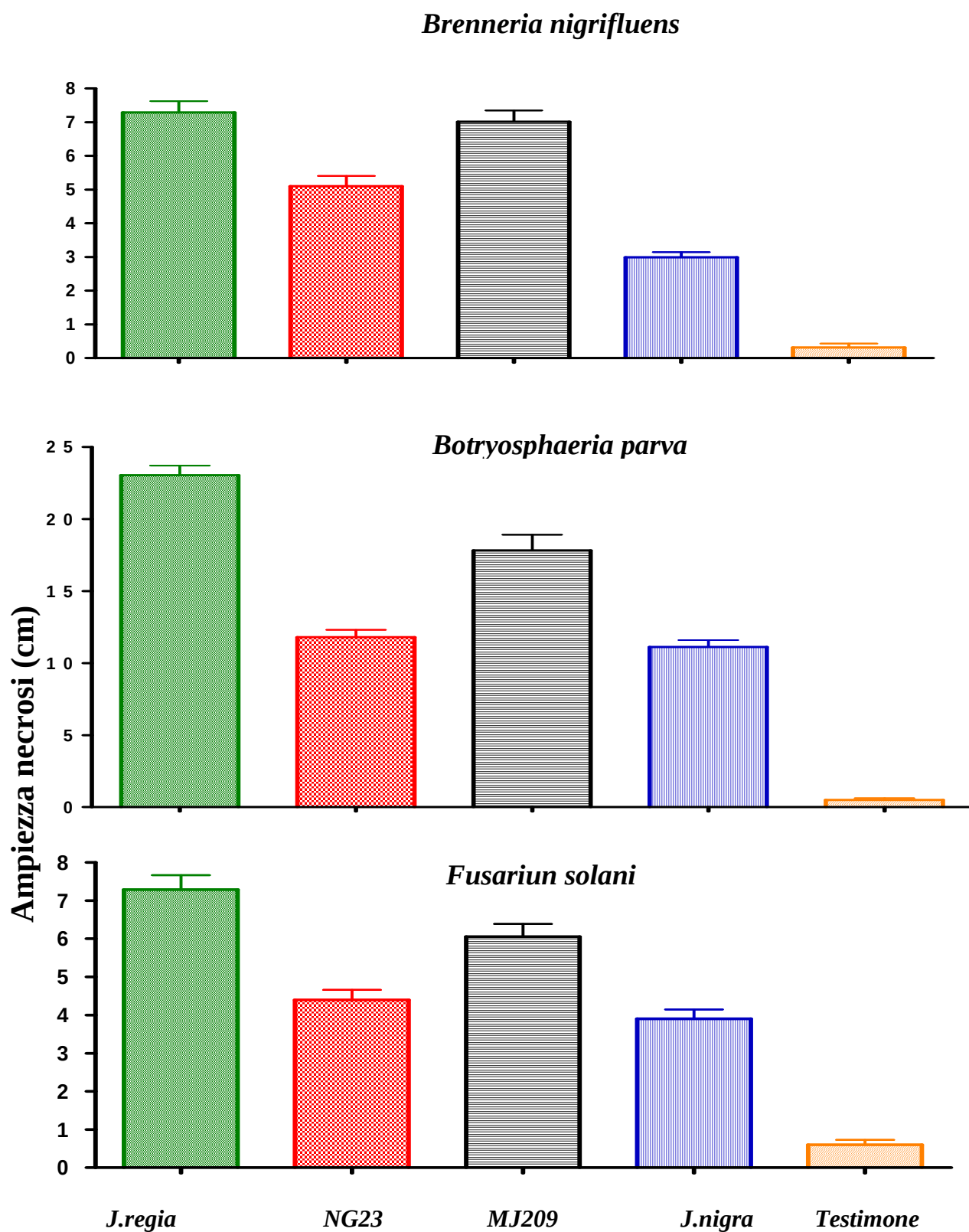


Fig.64. Ampiezza delle necrosi (cm) indotte da *Fusarium solani*, *Botryosphaeria parva* e *Brenneria nigrifluens* attraverso inoculazioni artificiali, su *Juglans regia*, *Juglans nigra* e gli ibridi NG 23 (*J.regia* x *J. nigra*) e MJ 209 (*J. Regia* x *J. major*).

PATOGENI INOCULATI	SPECIE		IBRIDI	
	<i>Juglans regia</i>	<i>Juglans nigra</i>	<i>J.regia</i> x <i>J. nigra</i> (NG203)	<i>J.regia</i> x <i>J. major</i> (MJ209)
	Ampiezze delle necrosi (cm)			
<i>Brenneria</i>	7,2±2,1	2,9±1,9	5,0±2,1	7,0±0,9
<i>Botryosphaeria</i>	23,0±4,2	11,1±2,9	11,8±3,17	17,8±6,9
<i>Fusarium</i>	7,2±2,3	3,9±1,5	4,3±1,6	6,0±2,1
Testimone	0,5±0,2	0,7±0,1	0,8±0,4	0,4±0,2

Tab.22. Ampiezza delle necrosi (cm) a seguito di inoculazioni artificiali con *Brenneria*, *Botryosphaeria* e *Fusarium* su *Juglans regia*, *Juglans nigra* e sugli ibridi NG23 e MJ209.

4.4.2.3. Resistenze di specie diverse di *Juglans* in confronto con due generi simili, *Carya* e *Prerocarya*

Anche in questo screening il patogeno che ha creato le lesioni più ampie è risultato essere *Botryosphaeria parva*, seguita da *Fusarium solani* e *Brenneria nigrifluens* (Tab. 23; Figg. 65 e 66). Quanto alle risposte da parte delle diverse specie *Juglans*, *J. regia* ha sempre presentato le lesioni più ampie, con tutti i patogeni utilizzati, al contrario di *J. nigra*, che ha mostrato lesioni mediamente molto inferiori. Lesioni estese, al pari di *Juglans regia*, si sono riscontrate anche su *Juglans cordiformis*, *Juglans cinerea*, *Pterocarya stenoptera* e *Juglans microcarpa*. Valori ridotti, del tutto simili a *Juglans nigra* si sono riscontrati su *Juglans hindsii*, *Carya illinoensis*, *Pterocarya fraxinifolia*.

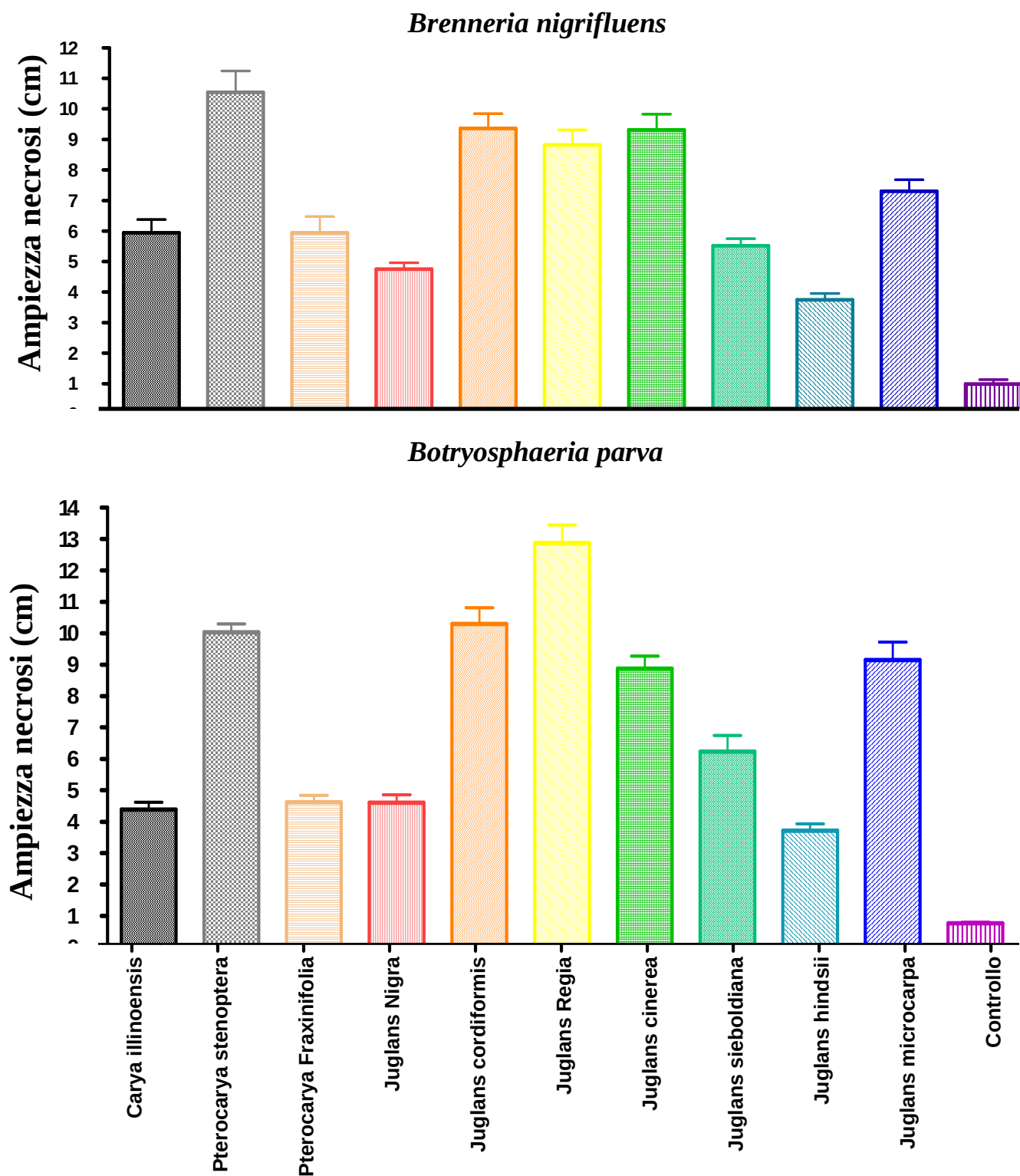


Fig.65. Istogramma delle ampiezze (cm) delle necrosi indotte *Brenneria nigrifluens* e *Botryosphaeria parva* in seguito ad inoculazione artificiale su talee di specie diverse di *Juglans* e generi affini.

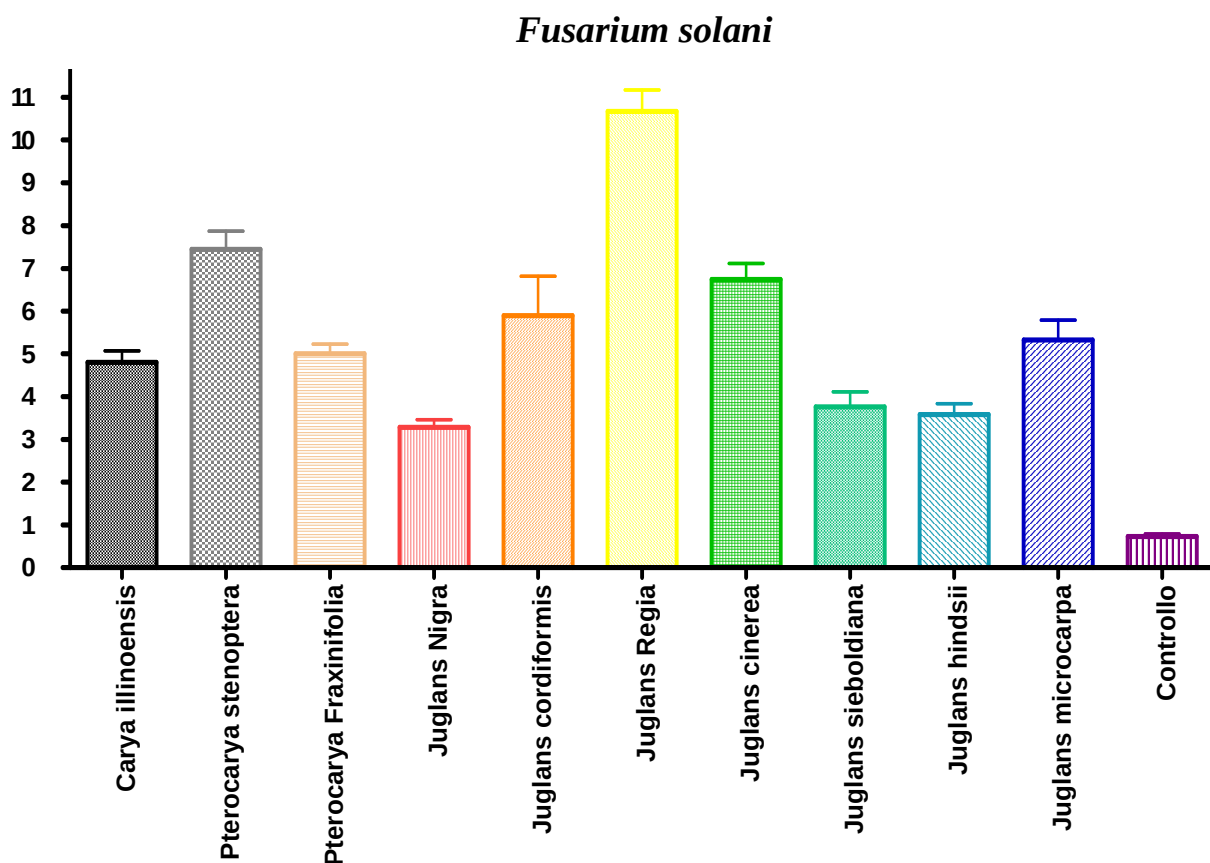


Fig.66. Istogramma delle ampiezze (cm) delle necrosi indotte da *Botryosphaeria parva* e *Fusarium solani* in seguito ad inoculazione artificiale su talee di specie diverse di *Juglans* e generi affini.

PATOGENI INOCULATI	CARYA	PTEROCARYA		JUGLANS						
	<i>C. illinoensis</i>	<i>P. stenoptera</i>	<i>P. fraxinifolia</i>	<i>J. nigra</i>	<i>J. cordiformis</i>	<i>J. regia</i>	<i>J. cinerea</i>	<i>J. seboldiana</i>	<i>J. hindsii</i>	<i>J. microcarpa</i>
	Ampiezze delle necrosi (cm)									
<i>Brenneria</i>	5,9±2,0	10,5±4,4	5,9±3,0	4,7±1,3	9,3±3,1	8,8±3,0	9,31±2,9	5,5±1,4	3,7±1,3	7,3±2,1
<i>Botryosphaeria</i>	4,3±1,4	10,0±1,6	4,6±1,2	4,6±1,5	10,2±2,5	12,8±3,6	8,8±2,2	6,2±2,0	3,7±1,3	9,1±2,8
<i>Fusarium</i>	4,8±1,6	7,4±2,7	5,0±1,3	3,2±1,1	5,8±4,1	10,6±3,1	6,7±2,1	3,7±1,5	3,5±1,5	5,3±2,2
TGestimone	0,5±0,2	0,7±0,2	1,0±0,4	0,9±0,3	0,8±0,2	0,7±0,1	0,6±0,3	0,4±0,1	0,8±0,2	0,9±0,2

Tab.23. Ampiezza delle necrosi (cm) a seguito di inoculazioni artificiali con i principali patogeni agenti di necrosi corticale, isolati da cancri attivi su fusto di noce (*Brenneria*, *Botryosphaeria* e *Fusarium*) su differenti specie di *Juglans regia* e su sue generi simili, *Carya* e *Pterocarya*.

5. SINTESI E CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Le indagini condotte con questa tesi di Dottorato hanno portato a risultati molto interessanti, sia nei riguardi dell'eziologia del cancro del fusto del noce da legno ed alcuni fattori predisponenti, sia per quanto concerne il comportamento genetico verso i presunti agenti da parte di specie e/o cultivars diverse di *Juglans*.

Dalle nostre ricerche, in sintesi è emerso quanto in appresso.

- Dei vari microrganismi isolati dai cancri sul fusto, il batterio *Brenneria nigrifluens* ed i 4 patogeni fungini *Botryosphaeria* spp, *Fusarium solani*, *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaeria* sp., sono risultati agenti di necrosi corticali, di cui i primi tre pressochè sempre presenti e pertanto presumibilmente coinvolti nella malattia.
- *Brenneria nigrifluens* è sempre isolabile nelle lesioni giovani; man mano che passa il tempo si riduce la sua isolabilità, fino talora a scomparire nelle lesioni più vecchie, lasciando il posto agli agenti fungini.
- In seguito ad inoculazioni artificiali su giovani piante di *Juglans regia*, mentre *Phomopsis juglandina* e *Paraphaeosphaeria* sp. non hanno causato alterazioni significative, *Brenneria nigrifluens*, *Botryosphaeria* spp. e *Fusarium solani* hanno indotto significative alterazioni patologiche. Più precisamente *Brenneria nigrifluens* ha prodotto estesi imbrunimenti sui tessuti; *Botryosphaeria* spp., da sola o combinata con *Brenneria nigrifluens*, ha causato necrosi e disfacimento dei tessuti; *Fusarium solani*, da solo o combinato con *Brenneria nigrifluens* e/o *Botryosphaeria* spp., ha indotto profonde necrosi cancerose.
- Indagini condotte *ad hoc* hanno dimostrato che le numerose colonie di *Botryosphaeria* isolate dai cancri non appartengono ad una unica specie, bensì almeno a tre distinte specie: *B. dothidea*, *B. parva* e *B. obtusa*, che con le inoculazioni artificiali hanno mostrato capacità necrotrofica pressoché analoga.
- Risulta una particolare analogia tra i microrganismi fungini associati alle necrosi rameali con quelli presenti nei cancri al fusto, con particolare riferimento a *Botryosphaeria* e *Fusarium*, rinvenuti, seppur con frequenza di isolamento variabile, in tutte le tipologie di cancri rameali considerate. È pertanto probabile che tali cancri ai rami, localizzati nelle chione delle piante, fungano da sorgente di inoculo o comunque contribuiscano ad innalzare la pressione d'inoculo.
- Dei vari microrganismi ritenuti coinvolti nella malattia, mentre il batterio non è mai stato isolato dai tessuti di piante asintomatiche (sane), gli agenti fungini, in particolare

Botryosphaeria spp. e *Fusarium solani*, sono stati sempre rinvenuti anche nei tessuti corticali sani, sia del fusto, che di rami di diversa età. Appare pertanto evidente una attitudine endofitica di tali patogeni fungini, dimostrando di essere in grado (al contrario di *Brenneria nigrifluens*) di trascorrere un lungo periodo in fase latente nei tessuti sani. È probabile che essi passino allo stato patogenetico allor quando il batterio avvia le lesioni, partecipando, insieme a questo, alla colonizzazione dei tessuti ed allo sviluppo del cancro.

- Non è stato riscontrato alcun tipo di interazione (antagonismo o sinergismo) tra i vari agenti patogeni riscontrati nei cancri del fusto.
- Una più elevata densità delle piante sembra predisporre gli attacchi della malattia, probabilmente a causa della maggiore copertura delle chioma che provoca condizioni ambientali favorevoli (elevata umidità, velo liquido, bassa illuminazione, ecc.) alle infezioni dei patogeni, *Brenneria nigrifluens* in particolare.
- Buone concimazioni ed irrigazioni non sembrano mostrare effetti positivi contro la malattia. Anzi, in qualche caso, le parcelle con ottime fertilizzazioni ed apporti idrici e con piante più vigorose hanno mostrato più intensi attacchi della malattia di quelle meno concimate ed irrigate. Ciò probabilmente per la più elevata densità delle chiome che, come sopra indicato, va a creare condizioni favorevoli alle infezioni.
- In ogni caso la malattia è sembrata colpire con maggiore intensità le zone di tronco esposte a sud-ovest.
- In campo, mentre non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra cultivars diverse di *Juglans regia*, la specie *J. nigra* e l'ibrido NG 23 tra *J. nigra* e *J. regia* hanno mostrato una assai maggiore resistenza alla malattia.
- Le inoculazioni artificiali su talee di *Juglans* effettuate con i tre patogeni ritenuti coinvolti nella malattia, *Brenneria nigrifluens*, *Botryosphaeria* spp. e *Fusarium solani*, hanno evidenziato notevole suscettibilità da parte delle diverse cultivars di *J. regia*, senza differenze significative, verso tutti e tre gli agenti. È stata inoltre confermata una resistenza assai elevata da parte di *J. nigra* e notevole da parte degli ibridi NG23 tra *J. regia* x *J. nigra* e MJ209 tra *J. nigra* x *J. major*, specie affine a *J. nigra*. Mostrano una certa resistenza alla malattia ed ai relativi agenti, anche *Juglans hindsii*, *Carya illinoensis* e *Pterocarya fraxinifolia*, mentre sono risultati suscettibili, al pari di *Juglans regia*, anche *Juglans cordiformis*, *Juglans cinerea*, *Juglans microcarpa* e *Pterocarya stenoptera*.

In conclusione, le ricerche condotte con questa tesi di Dottorato hanno risposto agli obiettivi predefiniti, facendo luce sia sull'eziologia del cancro del noce sia su alcuni fattori predisponenti, sia sulla predisposizione genetica alla malattia.

Nel complesso emergerebbe che la malattia del cancro del noce è causata da più patogeni. Il batterio *B. nigrifluens* sembrerebbe avviare le lesioni, nelle quali, piuttosto celermente, si insediano (forse direttamente dalla fase endofitica) i patogeni fungini *Botryosphaeria* spp. e *Fusarium solani*, estendendo ed aggravando le alterazioni e, in qualche caso, sostituendosi addirittura al batterio. *Paraphaeosphaeria* spp. e *Phomopsis juglandina* risultano invece saltuariamente aggregati.

Una elevata densità delle chiome, vuoi quando causata da ristretto sesto d'impianto, anche a causa di consociazioni con altre specie, vuoi quando indotta da buone irrigazioni e concimazioni, sembrerebbe favorire la malattia.

J. nigra, specie già utilizzata da più parti per coltivazioni industriali, è risultata assai meno suscettibili alla malattia rispetto a *J. regia*, sia dietro inoculazioni artificiali che in campo. Detta resistenza sembrerebbe anche essere trasmessa agli ibridi di *Juglans nigra*. Detta specie potrebbe pertanto rappresentare un interessante punto di riferimento per eventuali futuri lavori di selezione e miglioramento del noce da legno.

Per quanto sopra, dal punto di vista pratico, per contrastare la malattia, si suggerisce di offrire ampie spaziature alle piante, cercando di sfavorire l'elevata densità delle chiome, che creano condizioni favorevoli alla malattia (ristagno di umidità, persistenza di un velo liquido lungo il fusto ecc.), agevolando lo sviluppo in altezza delle piante ed intervenendo eventualmente con oculati sfoltimenti. Sono a nostro avviso da prediligere le concimazioni bilanciate, rispetto a quelle esclusivamente azotate, che tendono ad infoltire il fogliame.

Non è a parer nostro da ostacolare l'impiego di *J. nigra* o suoi ibridi con *J. regia*, di cui qualcuno è già molto promettente, anche per la notevole resistenza a pressoché tutte le più pericolose malattie nei nostri ambienti. È consigliabile semmai di sviluppare ricerche tecnologiche per rendere più pregiato il legno di tale specie.

È auspicabile in ogni caso che vengano rivolte sempre più attenzioni a programmi di miglioramento genetico di *J. regia* con *J. nigra* (o specie resistenti alla malattia), mirando a progenie che uniscano una buona resistenza al cancro del tronco, ed ovviamente alle altre importanti malattie, un buon accrescimento e soddisfacenti caratteristiche tecnologiche del legno.

6. BIBLIOGRAFIA

- ALLEGRO G., DELLA BEFFA G., 2001. Un nuovo problema entomologico per la pioppicoltura italiana: *Platypus mutatus* (Chapuis) (Coleoptera, Platypodidae). *Sherwood-Foreste ed alberi oggi*, 66: 31-34.
- ANSELMi N., 2001 a. Problematiche fitopatologiche in Italia negli impianti da legno di latifoglie nobili. *Informatore Fitopatologici* 7-8; 12-19.
- ANSELMi N., 2001b. Principali malattie degli impianti industriali di latifoglie di pregio. *Annali dell'Accademia Italiana di Scienze Forestali*. Vol XLIX: 77-99.
- ANSELMi N., GOVI G., 1996. *Patologia del legno*. Edagricole: 397 pp.
- ANSELMi N., CELLERINO G. P., MAZZAGLIA A., 2003. Le problematiche fitopatologiche delle colture da legno in Italia. In *“L'arboricoltura da legno: un'attività produttiva al servizio dell'ambiente*. “Libro bianco” sulle produzioni legnose fuori foresta in Italia. Edizioni Avenue media, Bologna, 159-167.
- ANSELMi N., MAZZAGLIA A., GENTILI E., LIBRANDI I., NASINI M., CEFALO G., 2004. Indagini sulle problematiche delle latifoglie di pregio nel Lazio. *Atti del convegno: Problematiche fitopatologiche delle latifoglie di pregio nella regione Lazio*. Aprile 2004, 17-21.
- BAGNARESI U., 1997. Introduzione. In *“Il noce comune per la produzione legnosa”* (Giannini R., Mercurio R., eds), Edizioni Avenue media, Bologna, 7-8.
- BAGNARESI U., GIANNINI R., 1997. L'impiego di latifoglie con legno di pregio nell'arboricoltura in ambiente mediterraneo. *Arboricoltura da legno: quale futuro?*, Nuoro, 30-31 ottobre, pp. 77-85.
- BANFI E., CONSOLINO F., 1996. *Alberi*. Istituto geografico De Agostani, Novara, pp 312.
- BARNETT H. L., HUNTER B. B., 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Third edition. Burgess Publishing Co, 508.
- BELISARIO A., 1996. Le principali malattie del noce comune. *Informatore fitopatologico*, 46: 20-25.
- BELISARIO A., 2004. Lotta alla *Phytophthora*. Convegno “problematiche fitopatologiche delle latifoglie di pregio nella regione lazio”.
- BELISARIO A., CACCIOLA S.O., MAGNANO DI SAN LIO G., 1997. *Phytophthora cactorum* on walnut seedlings in Italian nurseries. *European Journal of Forest Pathology*, 27: 137-146.

- BERNHARD R., 1981. Hybridation interspécifique et amélioration des plantes. II: cas des espèces ligneuses à multiplication végétative. C.R. Académie d'agriculture de France N.S. 12: 1013-1024.
- BERTI S., 1997. Caratteristiche tecnologiche e trasformazione del legno. In “Il noce comune per la produzione legnosa” (Giannini R., Mercurio R., eds), Edizioni Avenue media, Bologna, 261-272.
- BERTOLOTTO C., PISANELLI A., CANNATA F., 1996. La coltivazione del noce da legno nelle aree interne: indagine conoscitiva nell'Italia centrale e meridionale. EM-Linea Ecologica 2: 53-59.
- BOSCO M., FAVILLI F., LUMINI E., TANI A., 1997. L'ecologia del noce comune. In “Il noce comune per la produzione legnosa” (Giannini R., Mercurio R., eds), Edizioni Avenue media, Bologna, 43-52.
- BRINKMAN K.A., 1957. Silvical characteristics of black walnut. Cent. States For. Exp. Stn. Misc. Release, 22: 1-15.
- BURESTI E., 2003. Progettazione e realizzazione di impianti da arboricoltura da legno. Man. ARSIA.
- BURESTI E., MORI P., RAVAGNI S., 2001. Piantagioni miste con Pioppo e noce comune: vantaggi e svantaggi di una scelta complessa. Sherwood, n°71, 11-17.
- CARMICHAEL J. W., KENDRIK W. B., CONNERS I. L., SIGLER L., 1980. Genera of *Hyphomycetes*. Alberta: The University of Alberta, 386.
- CARRELLA D., SPIGO P., DE VITA N. 2003. Un caso di cancro superficiale del noce in Campania. Informatore Fitopatologico 7-8/2003; 32-33.
- CLAY K., 1988. Fungal endophyte of grasses: A defensive mutualism between plants and fungi. Ecology, 69: 10-16.
- COLLETTI L., 1998. L'attuazione del Regolamento CEE 2080/92 in Italia nel quadriennio 1994-97. Atti 2° congresso Nazionale di Selvicoltura, Venezia 21-27 Giugno, 279-326.
- COLLETTI L., 2001. Risultati dell'applicazione del Regolamento CEE 2080/92 in Italia. Sherwood n°70 (8/01) pp. 23-31.
- CORONA P., CALLEGARI C., MERCURIO R., VANNUCCINI M., 2000. Rappresentazione analitica della produzione legnosa di piantagioni di noce comune. L'Italia Forestale e Montana n°3 pp.185-196.
- CORONA P., LUCANI B., 1997. Considerazioni e osservazioni sul rimboschimento e l'arboricoltura da legno nel territorio marchigiano. EM-Linea Ecologica 2: 44-50.

- CORONA P., SCOTTI R., TARCHIANI N., 1998. Valutazione della produttività stazionale in funzione dei caratteri pedoclimatici in piantagioni forestali. L'Italia Forestale e Montana p. 6-19.
- DODE L.A., 1909. *Contribution à l'étude di genre Juglans*. Bull. Soc. Dendrol. France 11: 22-50.
- FORTE V., 2000. Il noce. Quarta edizione, tecnica e pratica, Calderini Edagricole. Bologna.
- FOWELLS H.A., 1965. Silvics of forest trees of the United States. (Ed. Fowells H.A.) USDA Handb. 271, 762 pp.
- FUNK C. R., HALISKY P.M., JOHNSON M.C., SIEGEL M.R., STEWART A.V., AHMAD S., HURLEY R.H. E HARVEY I.C, 1983. An endophytic fungus and resistance to sod webworms: association in *Lolium perenne* L. BioTechnology, 1: 189-191.
- FUNK D.T., 1970. Genetics of black walnut (*Juglans nigra*). USDA, For. Serv.
- FUNK D.T., Case P.J., Rietveld W.J. & Phares R.E., 1979. Effects of juglone on the growth of coniferous seedlings. Forest Sci. 25 (3): 452-4.
- GARAVEL L., 1960. Le noyer noir d'Amerique. Revue Forestiere Française 6:362-73.
- GARAVEL L., 1972. Une possibilité nouvelle: la production de bois de noyer. Office National des Forêts, Bull. Tech. 3:5-8.
- GELLINI R., GROSSONI P., 1997: Botanica forestale, II. Angiosperme. Ed. CEDAM, Padova.
- GELLINI, GROSSONI, 1997 – Botanica forestale, vol II. Ed. CEDAM.
- GIANNINI R., MERCURIO R., Eds., 1997. Il noce comune per la produzione legnosa. Edizioni Avenue media, Bologna: pp 312.
- GOIDANICH G., 1959. Manuale di patologia vegetale. Edizioni agricole di Bologna.
- GONZALEZ R., LOPEZ-LOPEZ, M.J. BIOSCA, E.G. LOPEZ, F. SANTIAGO, R. LOPEZ, M.M. First report of bacterial deep bark canker of walnut caused by *Brenneria (Erwinia) rubrifaciens* in Europe. Plant disease. June 2002. v. 86 (6), p.696.
- KRUSSMANN G., 1984- 1986. Manual of cultivated broad – leaved trees e shrubs - vol II-III.
- LAINER L., JOLY P., BONDOUX P. E BELLEMERE A., 1978. Mycologie et pathologie forestieres, Vol 1 : Mycologie forestiere . ed. Masson.
- LUISI N., MAGNANO DI SAN LIO G., 1997. Malattie. In “Il noce comune per la produzione legnosa” (Giannini R., Mercurio R., eds), Edizioni Avenue media, Bologna, 181-239.

- MARINELLI A. ROMANO S., 1999. L'arboricoltura da legno: aspetti finanziari e di mercato. In Atti del Convegno "L'arboricoltura da legno: Quale futuro?" Nuoro 30-31 ottobre 1997.
- MASTERS C.J., 1974. The controlled pollination techniques and analysis of intraspecific hybrids for black walnut (*Juglans nigra*) L. Ph.D. Thesis, Purdue Univ, W Lafayette, IN. 122 p.
- MAZZAGLIA A., FABI A., BELISARIO A., LIBRANDI I., CEFALO G., VARVARO L., ANSELMINI N., 2005. Bark cankers on English walnut: an emerging disease. Acta Hort. (ISHS) 705:437-442 (ISSN 0567-75-72).
- MAZZAGLIA A., FABI A., CEFALO G., 2004. Il cancro corticale del noce: grave malattia emergente. Ricerche sugli agenti eziologici. Atti Convegno RiSelvItalia, Milano, 16 Settembre, Poster (disponibile sul sito: www.ricercaforestale.it),
- MERCURIO R., 1988. Il noce da legno nell'Italia centro-settentrionale. Cellulosa e Carta 2:24-33.
- MERCURIO R., 1991. Produzione legnosa. In Il noce comune per la produzione legnosa (Giannini R., Mercurio R., eds), Edizioni Avenue media, Bologna, 165-173.
- MERCURIO R., MINOTTA G., 2000. Arboricoltura da legno. Ed. CLUEB, Bologna, 203 pp.
- MERCURIO R., TABACCHI G., 1997. Produzione legnosa. In Il noce comune per la produzione legnosa (Giannini R., Mercurio R., eds), Edizioni Avenue media, Bologna, 165-173.
- MERENDI A. 1956. Preziosa latifoglia americana. Il noce nero *Juglans nigra* L. L'Italia Agricola 883-88.
- MINOTTA G., 2003. L'arboricoltura da legno: un'attività produttiva al servizio dell'ambiente. Libro bianco sulle produzioni legnose fuori foresta in Italia. Edizioni Avenue media, Bologna: pp 243.
- MORONE, C., JANSE, J.D., SCORTICHINI, M., 1998. Bark canker of Persian walnut (*Juglans regia*) trees incited by *Erwinia nigrifluens* in Italy. Journal of Phytopathology, 146(11-12), p.637-639.
- NAKABONGE G., GRYZENHOUT M., ROUX J., WINGFIELD B. AND WINGFIELD J.M. Celoporthe dispersa gen. et sp. From native *Myrtales* in South Africa, Studies in Micology 55 : 255-267. 2006
- NARDI S., ROSSINI E., 2003. Una nuova malattia dei noceti: Una batteriosi da *Erwinia nigrifluens*. Servizio Fitosanitario Regione Marche.

- NATALE F., 1993 – Ruolo economico degli imboschimenti con noce. EM-Linea Ecologica 1:8-12.
- NICCOLI A., TIBERI R., 1997. Difesa dagli insetti e altri animali dannosi al noce. In “Il noce comune per la produzione legnosa” (Giannini R., Mercurio R., eds), Edizioni Avenue media, Bologna, 241-255.
- PETILLO G., 1993. Le esigenze delle industrie di trasformazione riguardo al legno di noce. In Atti Conv. Imboschimenti con noce: orientamenti culturali e produttivi, Porano, TR. Linea Ecologica 1 (Speciale): 26-30.
- PETRINI O., 1988. 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, 179-197.
- PEYRE P. & LANCOSME E., 1941. Les noyers indigènes et exotiques. Editions Jouve & Cie . Paris.
- PRZYBIL K., 2002. Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoot. Forest Pathology. 32: 387-394.
- RAGAZZI A., MORICCA S., CAPRETTI P., DELLA VALLE I., 2004. Endophytic presence of *Discula Quercina* on Declining *Quercus cerris*. Journal of phytopathology, vol. 147 issue 7-8: 437.
- RINK G. , 1985. Black walnut: an american wood. USDA For. Serv. Leaflet. FS-270: 1-7.
- ROGER N.P., 1949. The growth and development of black walnut on coal strip-mined land in southeast Kansas. Kans. Acad. Sci. Trans. 52: 99-104.
- SACCARIDI, A. ET AL., 1998. Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on English walnut (*Juglans regia*) in the Veneto region (northern Italy). Journal of Plant Pathology, 80(1), p.63-65.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEI S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H. A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Nature (London), 239: 487-497.
- SCARASCIA MUGNOZZA G., DE ANGELIS P., MATTEUCCI G., VALENTINI R., 1998. Foreste e cambiamenti climatici. Atti del Secondo Congresso Nazionale di Selvicoltura. 1: 97-119.Venezia.

- SCORTICHINI M., 1999. Rinvenimento di *Erwinia nigrifluens* su noce da legno nel Lazio. *Informatore Fitopatologico* 9/1999; 52-54.
- SCORTICHINI M., MORONE C., JANSE J.D., 1998. Bark Cancer of Persian Walnut (*Juglans regia*) Trees Incited by *Erwinia nigrifluens* in Italy. *Phytopathology* 146, 637-639.
- SCORTICHINI, M., 1999. Rinvenimento di *Erwinia nigrifluens* su noce da legno nel Lazio. *Informatore Fitopatologico*, 49(9), 52-54.
- 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.
- SIEBER T., 1988. Endophytische Pilze in Nadeln von gesunden und geschädigten Fichten (*Picea abies* (L.) Karsten). *Eur. J. For. Pathol.*, 18: 321-342.
- SKOLMEN R.G., 1968. Wood of Koa and black walnut similar in most properties. USDA Pacific South. For. & Range Exp. Stn., Berkeley, California, For. Serv. Res. Note PSW-164: 1-4.
- TRYON E.H. & TRUE R.P., 1964. Relative susceptibility of Appalachian hardwood species to spring frosts occurring after bud break. W. Va. University Agr. Exp. Stn. Bull. 503, 15pp.
- VON ARX J. A., 1987. *Plant Pathogenic Fungi*. Berlin, Stuttgart J., Cramer Verlag, 288.
- WHITE T.J., BRUNS T., LEE S.B., TAYLOR J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications* (eds. Innis M.A.; Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J.). Academic Press: San Diego, USA. Pp. 315-322.
- WHITEHEAD D.R., 1965. Pollen morphology in the Juglandaceae. II. Survey of the family. *J. Arnold. Arbor.* 46: 369-410.
- WILLIAMS – WOODWARDS L., 2001. Simplified fungi identification key. Cooperative Extension service. College of Agricultural & Environmental Sciences, University of Georgia, Special Bulletin, 37, 11.

ALEEGATO A

JUGLANDETUM DELL'AZIENDA SPERIMENTALE CESURNI DI TIVOLI (C.R.A.)

DESCRIZIONE STAZIONALE

L'Azienda sperimentale "Cesurni" è situata nel comune di Tivoli, a tre Km da Bagni di Tivoli ed occupa una superficie di 46,76,00 ha lungo il fiume Aniene. Essa appartiene alla Sezione Operativa Periferica del C.R.A. – Istituto Sperimentale per la Pioppicoltura di Casale Monferrato (AL), denominata Unità di Ricerca Forestale (U.R.F.) di Roma.

L'attività dell'U.R.F. si concentra su ricerche inerenti l'arboricoltura da legno di latifoglie di pregio (noci, ciliegi), da biomassa e fitorisanamento (eucalitto, robinia, pioppi) e di alcune conifere mediterranee (pini, cedri ecc.).

Le ricerche riguardano principalmente il miglioramento genetico volto alla selezione di varietà clonali o da seme a seconda delle specie considerate. In particolare, il Gruppo di Ricerca delle Latifoglie ha come obiettivo il miglioramento genetico per le caratteristiche di accrescimento, di qualità del legno e di resistenza alle malattie.

L'U.R.F. dispone di strumentazione di campo e di laboratorio, di apposite dotazioni per la conservazione dei semi, per l'allevamento di piantine in ambiente controllato (serre) ed in pieno campo (vivai), di due Aziende sperimentali e di un'adeguata attrezzatura informatica per l'elaborazione dei dati.

L'Azienda Cesurni è destinata prevalentemente ad importanti arboreti con funzione di collezione come il *Populetum mediterraneum* in cui sono rappresentati i cloni di diverse specie di pioppo e ibridi interspecifici maggiormente diffusi in coltura nel bacino del mediterraneo, il *Cerasetum* frutto di un campionamento a livello nazionale di *Prunus avium*, l'*Ontanetum* e lo *Juglandetum* che rappresenta una delle più vaste raccolte di specie appartenenti alla famiglia delle *Juglandaceae* esistenti a livello nazionale se non europeo.

Il clima di cui gode la zona è di tipo mediterraneo e le precipitazioni annue medie sono di circa 869 mm, ma la loro distribuzione è piuttosto irregolare, con un minimo accentuato nei mesi che vanno da giugno ad agosto. La temperatura media annua è di 15,3 °C, cioè di poco inferiore a quella di Roma, poiché l'Azienda è soggetta all'azione mitigatrice dei venti provenienti dai monti Tiburtini.

Il suolo deriva dalla sedimentazione recente dei depositi alluvionali del fiume Aniene; l'eterogeneità dei detriti gli conferisce una costituzione chimica e fisica assai equilibrata e una buona fertilità.

Lungo il fiume prevalgono i suoli sabbioso-argillosi (più del 65% di sabbia), mentre nella parte centrale dell'Azienda sono più frequenti terreni di medio impasto (argilla tra 20-30% e sabbia tra 40-60%). Il contenuto di carbonato di calcio è assai variabile: dal 15% nelle zone che costeggiano il fiume, a più del 30% in altre aree.

DESCRIZIONE DELL'ARBORETO

Iniziato a costruire nel 1991 e proseguito scalarmente negli anni 1992-93-95-96-97 in funzione della reperibilità di nuovo materiale, lo *Juglandetum* si estende su una superficie totale attualmente di circa 4 ettari ed è comunque prevista un'ulteriore sua espansione qualora si reperisca nuovo materiale.

L'arboreto prevede un nucleo centrale con dispositivo sperimentale a blocchi randomizzati completi di diverse provenienze primarie e secondarie appartenenti a diverse specie di *Juglans*, *Carya*, e *Pterocarya* e parcelle elementari quadrialbero (fig. 31). Lateralmente sono disposte in filari altre specie con scarso numero di piante tale da non permettere repliche significative o di specie e/o provenienze aggiunte negli anni successivi. Appartiene allo *Juglandetum* anche un confronto di provenienze europee di *J. regia* e suoi ibridi costituito nel 1995. Questi impianti sperimentali prevedono una fila di margine per evitare effetti di bordo. L'adozione di un sesto d'impianto in quadro, 5 X 5 m, risponde all'esigenza di porre ciascun individuo nelle identiche condizioni di spazio e luce su ogni lato.

Le pratiche colturali eseguite prima e dopo la costituzione dell'impianto possono riassumersi in: aratura profonda 60 cm, seguita da una smorganatura; impianto di materiale a radice nuda di due anni, con il fittone tagliato a 20 cm e interrato fino al colletto. Le piantine sono state prodotte nello stesso vivaio interno all'Azienda. Erpicazioni tre volte l'anno per i primi tre anni, ridotte a due dopo la chiusura della chioma. Negli ultimi sette anni due sfalci d'erba l'anno durante l'estate; prima potatura di formazione nel 1993 seguita negli anni successivi sui vari ampliamenti con eliminazione dei ricacci basali e delle doppie punte.

MATERIALE JUGLANDETUM			
Numero	Specie	Provenienza	Paese
93	<i>Carya illinoensis</i>	Roma	Italia
52	<i>Jugans cinerea</i>	/	USA
322	<i>Juglans cinerea</i>	/	USA
330	<i>Juglans cinerea</i>	Montana	USA
331	<i>Juglans hindsii</i>	Montana	USA
147	<i>Juglans major</i>	California	USA
50	<i>Juglans microcarpa</i>	/	USA
98	<i>J. n x J. r.</i>	Kishinev	USSR
132	<i>Juglans nigra</i>	/	Francia
151	<i>Juglans nigra</i>	/	Francia
72	<i>Juglans nigra</i>	Feltre (BL)	Italia
119	<i>Juglans nigra</i>	/	USA
323	<i>Juglans nigra</i>	/	USA
130	<i>Juglans nigra</i>	Carbondale Illinois	USA
107	<i>Juglans nigra</i>	Northern Massachussetts	USA
105	<i>Juglans nigra</i>	Southern Massachussetts	USA
127	<i>Juglans nigra</i>	Boone 1 Missouri	USA
123	<i>Juglans nigra</i>	Laclede 1 Missouri	USA
124	<i>Juglans nigra</i>	Laclede 5 Missouri	USA
120	<i>Juglans nigra</i>	Osage Missouri	USA
128	<i>Juglans nigra</i>	Phelps 1 Missouri	USA
125	<i>Juglans nigra</i>	Saline 1 Missouri	USA
126	<i>Juglans nigra</i>	Saline 2 Missouri	USA
121	<i>Juglans nigra</i>	Texas Missouri	USA
122	<i>Juglans nigra</i>	Texas 2 Missouri	USA
131	<i>Juglans nigra</i>	Wisconsin	USA
158	<i>Juglans regia</i>	Grenoble	Francia
102	<i>Juglans regia</i>	Neve Yaar	Israele

103	<i>Juglans regia</i>	Neve Yaar	Israele
104	<i>Juglans regia</i>	Neve Yaar	Israele
57	<i>Juglans regia</i>	Leofreni Carsoli (AQ)	Italia c
275	<i>Juglans regia</i>	Alta Valle Marecchia (AR)	Italia c
40	<i>Juglans regia</i>	Az. Rincine/Londa (FI)	Italia c
41	<i>Juglans regia</i>	Az. Rincine/Londa (FI)	Italia c
279	<i>Juglans regia</i>	Macerata	Italia c
58	<i>Juglans regia</i>	S. Ginesio (MC)	Italia c
44	<i>Juglans regia</i>	Petraia/Gubbio (PG)	Italia c
45	<i>Juglans regia</i>	Bellangelo/Gubbio	Italia c
46	<i>Juglans regia</i>	Belvedere/Gubbio	Italia c
47	<i>Juglans regia</i>	Biscina/Gubbio	Italia c
59	<i>Juglans regia</i>	Ceselli/Scheggino (PG)	Italia c
409	<i>J. regia "malizia"</i>	/	Italia m
48	<i>Juglans regia</i>	Savignano Irpino AV	Italia m
73	<i>Juglans regia</i>	Nosrale - Montecalvo (AV)	Italia m
74	<i>Juglans regia</i>	Benevento	Italia m
61	<i>Juglans regia</i>	Cicala (CZ)	Italia m
62	<i>Juglans regia</i>	Decollatura (CZ)	Italia m
273	<i>Juglans regia</i>	Cicala/Decollatura (CZ)	Italia m
329	<i>Juglans regia</i>	Decollatura (CZ)	Italia m
96	<i>Juglans regia</i>	Accadia (FG)	Italia m
97	<i>Juglans regia</i>	Carmiano (FG)	Italia m
89	<i>Juglans regia</i>	Mistretta (ME)	Italia m
90	<i>Juglans regia</i>	Marocchina - M. Elicona (ME)	Italia m
75	<i>Juglans regia</i>	Sorrentina - Averno (SA)	Italia m
76	<i>Juglans regia</i>	Battipaglia (SA)	Italia m
278	<i>Juglans regia</i>	Salerno	Italia m
88	<i>Juglans regia</i>	Monti Iblei (SR)	Italia m
328	<i>Juglans regia</i>	Sorrento	Italia m
71	<i>Juglans regia</i>	Feltrina - Feltre (BL)	Italia s

326	<i>Juglans regia</i>	Arson/Feltre (BL)	Italia s
327	<i>Juglans regia</i>	Lamen/Feltre (BL)	Italia s
277	<i>Juglans regia</i>	Castello di Serravalle (BO)	Italia s
274	<i>Juglans regia</i>	Cesena (FO)	Italia s
276	<i>Juglans regia</i>	Zocca (MO)	Italia s
333	<i>Juglans regia</i>	Gorgan	Iran
272	<i>Juglans regia</i>	/	Turchia
242	<i>Juglans regia</i>	Konya/Eregli	Turchia
243	<i>Juglans regia</i>	Malatya/Merende	Turchia
99	<i>Juglans regia</i>	Kishinev	USSR
100	<i>Juglans regia</i>	Kishinev	USSR
101	<i>Juglans regia</i>	Kishinev	USSR
111	<i>Juglans regia</i>	Sotchi	USSR
325	<i>J. s. cordiformis</i>	/	USA
106	<i>J. sieboldiana</i>	Massachusetts	USA
324	<i>J. sieboldiana</i>	/	USA
340	<i>Pter. fraxinifolia</i>	/	Italia
141	<i>Pter. stenoptera</i>	California	USA

* s= settentrionale; c= centrale; m= meridionale.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei porgere il mio più sincero ringraziamento a tutto lo *staff* del Dipartimento di Protezione delle Piante dell'Università della Tuscia per il prezioso aiuto e sostegno. Ringrazio il mio tutore Prof. Naldo Anselmi per l'indispensabile guida durante questo percorso, il Prof. Leonardo Varvaro, Coordinatore del Dottorato, non solo per la sua disponibilità (ed attenzione), ma anche per le preziose indicazioni con cui ha contribuito ad alcune delicate fasi dell'impostazione di questo lavoro. Un particolare grazie al mio Co-Tutore, Dott. Alfredo Fabi per la pazienza ed i consigli, senza i quali, a volte, non sarei riuscito ad andare avanti.

Grazie inoltre al Dott. Angelo Mazzaglia, sempre presente e disponibile, a tutti i colleghi ed amici dottorandi, con particolare riferimento alla Dott.ssa Eleonora Rocco, per essermi stati sempre vicini ed avermi aiutato nei momenti di difficoltà. Infine un ringraziamento alla mia famiglia.