



FACOLTÀ DI AGRARIA
DIPARTIMENTO DI PROTEZIONE DELLE PIANTE

DOTTORATO DI RICERCA IN PROTEZIONE DELLE PIANTE
- XVIII CICLO -
Agr/12

**Aspetti biologici, patogenetici e biochimici di specie batteriche
coinvolte nella “moria” del nocciolo**

Dottorando

Dott. Giorgio Vuono

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Naldo Anselmi

Tutore

Chiar.mo Prof. Leonardo Varvaro

Cotutore

Dott. Giorgio Mariano Balestra

Triennio 2003-2005

INDICE

PARTE PRIMA: INTRODUZIONE	
1 IL NOCCIOLO.....	3
2 RUOLO DELLA CORILICOLTURA MONDIALE E NAZIONALE NEI MERCATI.....	4
3 PRINCIPALI AVVERSITÀ BIOTICHE.....	7
4 LA MORIA DEL NOCCIOLO.....	10
5 I SALI DI RAME IN AGRICOLTURA.....	12
6 QUORUM SENSING.....	15
7 VERIFICA DELLA PRODUZIONE DI AUTOINDUTTORI DA PARTE DI SPECIE BATTERICHE FITOPATOGENE.....	20
7.1 Influenza della fase di crescita e del terreno di coltura sulla produzione in vitro di autoinduttori.....	20
7.2 Bioindicatori utilizzati nel rilevamento della produzione di autoinduttori.....	21
PARTE SECONDA: LAVORO SPERIMENTALE	
I SCOPO DEL LAVORO.....	24
II MATERIALI E METODI.....	25
1 INDAGINI SULL'EZIOLOGIA DELLA MALATTIA.....	25
1.1 TERRENI DI CULTURA UTILIZZATI.....	25
1.2 BATTERI UTILIZZATI.....	28
1.3 ISOLAMENTI	31
1.4 CARATTERIZZAZIONE.....	31
1.4.1 Aggiornamento del database.....	32
1.4.2 Prove preliminari.....	32
1.4.3 Determinazione del profilo nutrizionale e caratterizzazione.....	34
1.5 COMPARAZIONE DEI PROFILI NUTRIZIONALI.....	35
1.6 PROVE DI PATOGENICITÀ.....	37
2 VERIFICA DELLA PRODUZIONE DI LATTONI DELL'OMOSERINA.....	39

2.1 BATTERI UTILIZZATI.....	39
2.2 TERRENI DI COLTURA UTILIZZATI.....	40
2.3 PROVE PRELIMINARI.....	41
2.4 SAGGIO PER LA VERIFICA DELLA PRODUZIONE DI LATTONI DELL'OMOSERINA.	42
3 VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI DIVERSI FORMULATI RAMEICI NEL CONTENIMENTO DELLA MORIA DEL NOCCIOLO.....	44
3.1 CARATTERISTICHE DEI NOCCIOLETI.....	44
3.2PRODOTTI CHIMICI UTILIZZATI.....	44
3.3TRATTAMENTI.....	45
3.4VERIFICA DELL'INCIDENZA DELLA MALATTIA E TRATTAMENTO STATISTICO DEI DATI.....	46
III) RISULTATI.....	47
1 INDAGINI SULL'EZIOLOGIA DELLA MALATTIA.....	47
1.1 ISOLAMENTI	47
1.2 CARATTERIZZAZIONE.....	47
1.2.1 Aggiornamento del database.....	47
1.2.2 Prove preliminari.....	48
1.2.3 Identificazione.....	50
1.3 COMPARAZIONE DEI PROFILI NUTRIZIONALI	51
1.4 PROVE DI PATOGENICITÀ.....	53
2. VERIFICA DELLA PRODUZIONE DI LATTONI DELL'OMOSERINA.....	55
2.1 PROVE PRELIMINARI.....	55
2.2 SAGGIO PER LA VERIFICA DELLA PRODUZIONE DI LATTONI DELL'OMOSERINA.	55
3 VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI DIVERSI FORMULATI RAMEICI NEL CONTENIMENTO DELLA MORIA DEL NOCCIOLO.....	58
3.1 VERIFICA DELL'INCIDENZA DELLA MALATTIA E TRATTAMENTO STATISTICO DEI DATI.....	58
IV) DISCUSSIONE.....	67
V) BIBLIOGRAFIA.....	74

Parte Prima: INTRODUZIONE

1. IL NOCCIOLO

Il nocciolo (*Corylus avellana* L.) è una pianta di modesto sviluppo (3-5 m) a portamento cespuglioso, probabilmente originaria dell'Asia minore. Oggi è presente in forma spontanea in molte zone temperate dell'emisfero boreale: in Giappone, in Cina, in Europa e nel Nord America.

Il nocciolo appartiene all'ordine delle *Fagales*, alla famiglia delle *Corylacee*, di cui fanno anche parte, oltre al genere *Corylus*, i generi *Ostrya* e *Carpinus*.

È pianta monoica e diclina, i fiori maschili sono amenti riuniti in gruppi ravvicinati di tre-cinque, si sviluppano alla fine dell'estate e fioriscono in inverno; i fiori femminili, solitari o riuniti a gruppi di due-tre, si sviluppano sui nodi dei rami dell'annata.

Tutte le cultivar oggi utilizzate sono autosterili, è quindi necessario consociare alla cultivar principale un impollinatore interfertile.

Il frutto è una nocula che racchiude un seme contenente il 60-65% di grassi, di cui il circa il 40% costituito da grassi monoinsaturi.

Il nocciolo è sufficientemente adattabile alle variazioni climatiche, ma predilige zone di coltivazione con medie annuali comprese tra 12 e 16°C, in cui le minime invernali non scendano al di sotto di -8°C, soglia di resistenza delle infiorescenze femminili, inoltre temperature superiori ai 35°C, accentuano eccessivamente la traspirazione e possono causare il disseccamento della lamina fogliare.

Può essere coltivato in asciutta in zone con precipitazioni annue di almeno 800 mm, con periodi siccitosi di durata inferiore al mese, su suoli dotati di una sufficiente capacità di campo. La specie non tollera le acque salse.

Il terreno ideale per la coltura è tendenzialmente sciolto, permeabile, con pH da 5,5 a 7,8, ricco di sostanza organica, con calcare attivo inferiore all'8% (Tombesi, 1991).

2. RUOLO DELLA CORILICOLTURA MONDIALE E NAZIONALE NEI MERCATI

La coltivazione del nocciolo è oggi localizzata in quattro aree principali: la più importante è situata sulla costa meridionale del Mar Nero (Turchia), le altre sono localizzate in Italia, in Spagna e negli Stati Uniti d'America (Oregon). In queste zone si concentra circa il 90% della produzione mondiale.

La Turchia è il primo produttore mondiale, nel 2004 nel paese euro-asiatico sono state prodotte 425000 t, segue l'Italia dove nello stesso anno sono state prodotte 134000 t, gli U.S.A. (33570 t), l'Azerbaijan (20000 t) e la Spagna (14000 t) (Fonte F.A.O.).

Vanno citate inoltre la Cina e l'Iran (nello stesso anno hanno prodotto ciascuna 13000 t di nocciole) e la Georgia (8800 t).

La maggior parte del prodotto della Turchia è destinato all'esportazione. Questa forte immissione di prodotto sul mercato avviene a prezzi estremamente concorrenziali e sfruttando favorevoli accordi commerciali con l'Unione Europea (De Salvador, 2001).

Questo fattore incide negativamente sull'andamento del mercato degli altri principali produttori. L'Italia infatti, nonostante sia a livello mondiale il secondo produttore, riveste la medesima posizione nella classifica dei maggiori importatori (Adua, 2002,).

Per questi motivi le prospettive di crescita del comparto devono puntare sulla qualità, su una ulteriore riduzione dei costi di produzione e su un aumento dell'efficienza della fase commerciale. In questo senso il riconoscimento del marchio I.G.P. ottenuto dall'Unione Europea per due varietà nostrane di nocciola (I.G.P. "Nocciola di Giffoni", I.G.P. "Nocciola del Piemonte") potrebbe essere un'opportunità da sfruttare per un'ulteriore valorizzazione del comparto.

Analizzando in dettaglio la situazione italiana si nota che anche nel nostro paese la produzione di nocciole è fortemente concentrata in aree limitate. Secondo i dati forniti dall'Istat sulle produzioni 2004, su una produzione nazionale di 143.355 t (dato lievemente superiore a quello fornito dalla F.A.O. per la stessa annata), 52673 t sono state prodotte in Campania, 50.724 t nel Lazio, 20.037 t in Piemonte e 17.945 t in Sicilia.

In Campania, nonostante il primato di produzione nazionale, il settore corilicolo soffre di carenze strutturali sia in fase produttiva che commerciale.

Il 70% della coltivazione si trova in ambienti collinari, in zone a volte impervie, difficilmente raggiungibili con mezzi meccanici (Tombesi, 2005), in cui la maggior parte delle operazioni colturali deve essere fatta a mano. In queste zone la meccanizzazione della raccolta spesso non è adeguata e gli impianti di essiccazione precari ne penalizzano la qualità, collocando le nocciole campane nella fascia di mercato occupata da quelle Turchie. Il panorama varietale campano è eterogeneo, le cultivar più diffuse sono: Mortarella (33%), S. Giovanni (32%), Tonda di Giffoni (10%), Tonda Bianca e Rossa (14%), Camponica (4%) (De Salvador, 2001). Va precisato che una larga base varietale può costituire un vantaggio da un punto di vista sanitario, ma pone limiti di natura commerciale e tecnologica in quanto determina l'offerta di un prodotto eterogeneo per forma e qualità, non rispondente alle esigenze dell'industria.

Inoltre la presenza sul territorio di molte piccole aziende, unita alla mancanza di associazionismo, determinano un'offerta del prodotto non concentrata e prezzi instabili (Piccirillo, 2003). Diverso discorso va fatto per le coltivazioni in pianura dove la maggiore dimensione aziendale, unita all'esclusivo utilizzo di cultivar di pregio (Tonda di Giffoni) e ad un livello di meccanizzazione adeguata rende il settore molto dinamico e competitivo.

Nel Lazio, seconda regione italiana per quantità prodotta, la coltivazione del nocciolo si è diffusa nel dopoguerra, da allora l'incremento è stato costante fino ad arrivare agli attuali 20000 ha, di questi il 90% circa sono in provincia di Viterbo (Bignami, 2002).

La Tonda Gentile Romana rappresenta circa il 90% del patrimonio varietale della regione, questa cultivar è apprezzata dall'industria e manifesta buona adattabilità a diverse condizioni climatiche. Altra cultivar presente sul territorio è il Nocchione, usato come impollinatore della cultivar principale. Da alcuni anni però si tende ad utilizzare in questo ruolo la Tonda di Giffoni, cultivar dal frutto qualitativamente superiore.

La produzione fortemente concentrata in un territorio limitato e la conseguente dipendenza dell'economia locale dalla coltura rendono il settore molto dinamico

soprattutto per quanto riguarda il ricorso alla meccanizzazione. Le piccole aziende meccaniche locali si sono, infatti, impegnate nell'ideazione e nella costruzione di nuove e molto efficienti macchine per la raccolta.

L'offerta è concentrata per la presenza di associazioni di produttori che raccolgono il prodotto e lo gestiscono in post-raccolta (Bignami, 2002). Le associazioni provvedono inoltre a seguire gli agricoltori nell'itinerario tecnico.

Per quanto riguarda il Piemonte, terza regione Italiana per produzione di nocciole (14 % della produzione nel 2004)(fonte Istat), la coltura è localizzata soprattutto nelle zone collinari delle province di Cuneo ed Asti (Valentini e Me, 2002). È coltivata quasi esclusivamente la varietà Tonda Gentile delle Langhe (IGP dal 1993). La produzione, rinomata per qualità, è assorbita completamente dall'industria dolciaria, a prezzi generalmente superiori a quelli delle altre varietà di nocciola.

Le aziende mediamente sono di piccole dimensioni, con meccanizzazione e pratiche colturali adeguate alle dimensioni aziendali.

Il quarto posto nella graduatoria nazionale di produzione è occupato dalla Sicilia, in un contesto però di progressivo abbandono della coltura (Alberghina, 2002), caratterizzata ancor più che in Campania da un germoplasma estremamente vario. Si sottraggono a questa tendenza solo poche aree di coltivazione, in particolare quella dei monti Nebrodi (Me) dove una piovosità sufficiente consente la coltivazione in regime asciutto, in un contesto rurale in cui questa specie mantiene una considerevole importanza socio-economica.

Riguardo alle rimanenti aree tradizionalmente coltivate a nocciolo, la funzione prevalente della coltura rimane probabilmente solo di tipo paesaggistico e di salvaguardia idrogeologica del territorio .

3. PRINCIPALI AVVERSITÀ BIOTICHE

Nonostante sia considerato coltura rustica il nocciolo è ospite di diversi fitofagi e crittogame parassite, alcuni dei quali possono provocare sensibili danni alla produzione, sia in termini di perdita di prodotto che di peggioramento qualitativo dello stesso.

Nella seguente rassegna vengono elencati i tratti principali dei problemi di carattere fitosanitario che più incidono sull'economia della coltura, o che vengono riscontrati con maggior frequenza nelle zone a maggior vocazione corilicola della penisola Italiana.

Tra i problemi di carattere **entomologico** vanno ricordati:

Diverse specie di cimici (*Gonocerus acuteangulatus* Goeze, *Palomena prasina* L., *Nezara viridula* L., *Piezodorus lituratus* F., *Raphigaster nebulosa* Poda) che pungono il frutto in formazione per trarne nutrimento. Il danno causato può essere di due tipi, in funzione della fase di sviluppo del frutticino al momento della puntura: se questa avviene con il seme non ancora completamente sviluppato (fine maggio-giugno) si ha l'aborto del frutto o vuoto traumatico, se invece lo sviluppo del frutto è completo si ha il cimiciato. Questo altera le caratteristiche organolettiche del frutto, è rilevabile sezionando il frutto; le nocciole colpite presentano aree più chiare in corrispondenza delle parti raggiunte dagli stiletti delle cimici.

Il Balanino (*Curculio nucum* L.), questo coleottero curculionide trascorre una parte del suo ciclo biologico su piante con frutti a polpa succulenta (ciliegi, peschi, peri ed altre), a fine maggio, inizio giugno, gli adulti si trasferiscono sul nocciolo dove continuano ad alimentarsi sui suoi frutti, si stima che una femmina possa danneggiare fino a 150 nocciole. Contemporaneamente gli adulti cominciano ad accoppiarsi e le femmine iniziano la deposizione delle uova all'interno dei frutti, le larve si nutrono della parte edule prima di bucare il guscio e raggiungere il terreno dove si interrano. Tra i fitofagi, il balanino è forse quello che causa i danni maggiori alle produzioni.

Problemi differenti sono causati dalla presenza dell'anisandro (*Anisandrus dispar* F.), la femmina di questo coleottero scolitide scava delle gallerie nel tronco in cui ovidepone. Il danno diretto causato dall'insetto assume rilevanza solo in

caso di attacchi massicci, oltre a questo però va considerato un danno indiretto dovuto all'apertura di ferite che possono costituire sito di penetrazione per numerosi agenti patogeni. Generalmente l'insetto attacca piante deperite ma in qualche caso vengono colpite anche piante giovani in pieno vigore vegetativo.

Sul nocciolo vengono inoltre sovente riscontrati attacchi di afidi che però raramente causano danni tali da giustificare trattamenti fitosanitari. Gli afidi che parassitizzano il nocciolo sono l'afide verde (*Corylobium avellanae* Schrank) e l'afide crema (*Myzocallis coryli* Goeze).

Tra i lepidotteri va ricordata la falena brumale (*Operophtera brumata* L.) che ovidepone sui rami di nocciolo durante l'inverno, le larve si nutrono delle giovani foglie in accrescimento. Come per gli afidi il danno causato dalla falena è, nella maggior parte dei casi, molto limitato.

Molto diffuso è un altro parassita appartenente anch'esso all'ordine degli artropodi, l'acaro eriofide (*Phytoptus avellanae* Nal.), che parassitizza le gemme e le trasforma lentamente in galle, il danno sulla pianta è costituito dalla perdita di funzionalità delle gemme colpite, raramente però il numero di queste è tale da influire sulla produzione (Viggiani *et al.*, 1978; Bianco e Danise 2002).

Diverse sono anche le **malattie crittogamiche** che avversano la coltura tra queste, per la frequenza con cui vengono riscontrate, vanno citate:

Il mal dello stacco, malattia ad eziologia fungina il cui agente è *Cytospora corylicola* Sacc. che, una volta penetrato nell'ospite attraverso una ferita, compromette in un primo momento l'attività vasale causando il disseccamento dei rami colpiti e successivamente, in seguito allo sviluppo del micelio nel cilindro centrale, la stabilità dello stesso causando la facile rottura dei rami o delle branche colpite.

Il mal bianco, il cui agente eziologico è il fungo *Phyllactinia guttata* Wallr.. La malattia si manifesta sotto forma di macchie circolari di colore giallo intenso sulla pagina inferiore delle foglie, in corrispondenza delle quali si sviluppano le ife e i corpi riproduttori agamici dei frutti. Successivamente sulle stesse aree si sviluppano i cleistoteci, visibili ad occhio nudo.

Il mal bianco non è considerato malattia molto dannosa in quanto i sintomi si evidenziano generalmente in periodi molto vicini alla raccolta e non compromettono in alcun modo la produzione.

Stesso discorso va fatto per il seccume indotto in tarda estate/inizio autunno dagli attacchi del fungo *Labrella coryli* Desm..

Diminuizioni della produzione possono essere causate dal marciume bruno dei frutti, soprattutto in annate caratterizzate da clima caldo umido che favorisce l'evoluzione della malattia. L'agente eziologico della malattia è la *Monilia fructigena* Pers.. I sintomi riscontrabili sono imbrunimenti dell'involucro esterno e del pericarpo dell'achenio, i frutti colpiti generalmente cadono prematuramente ma possono anche rimanere sulla pianta. Su questi frutti, in primavera si formano i conidi, che trasportati dal vento o altri vettori germinano sui giovani frutticini ed in presenza di ferite, penetrano causando nuove infezioni.

Per chiudere questa rapida rassegna delle più importanti alterazioni del nocciolo citiamo le più importanti malattie ad eziologia batterica. Molto diffusa ma poco importante per l'economia della coltura è la batteriosi indotta da *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* Miller *et al.*, questo batterio causa danni su gemme, foglie, su giovani germogli e sui frutti sui quali causa aree necrotiche puntiformi sulla cupola, in qualche caso l'infezione si estende all'esocarpo ma non interessa mai il seme (Viggiani *et al.*, 1978; Bianco e Danise 2002) .

Un discorso a parte merita la moria del nocciolo che nelle nostre zone causa ingenti danni alla coltura, le caratteristiche di questa malattia verranno ampiamente trattate nel proseguo del lavoro.

4. LA MORIA DEL NOCCIOLO

La patologia conosciuta come “moria del nocciolo” è comparsa nell’Alto Lazio nella seconda metà degli anni ottanta (Aloj *et al.*, 1987). La malattia, che in un primo momento sembrava avere un’incidenza limitata si è in breve tempo aggravata, fino a costituire il problema fitopatologico di maggiore impatto nella corilicoltura laziale.

L’agente eziologico della “moria” è stato identificato in un batterio appartenente al genere *Erwinia* gruppo *amylovora* (Varvaro *et al.*, 1990; Varvaro, 1994).

Successivamente la malattia è stata anche associata all’azione di *Pseudomonas avellanae* (Scortichini, 1994; Janse *et al.*; 1996). Questa specie batterica isolata per la prima volta in Grecia (Psallidas, 1987), causa su nocciolo il cancro batterico i cui sintomi sono analoghi a quelli manifestati dai noccioli affetti da moria nell’Alto Lazio.

Le differenze tra la sintomatologia descritta in Grecia (Psallidas e Panagopoulos, 1979) e quella osservata nell’alto Lazio sono sostanzialmente in quest’ultima la mancanza di cancri sulle branche colpite e la produzione di essudati biancastri in fase avanzata d’infezione.

Il quadro sintomatologico della malattia osservabile nell’alto Lazio, è il seguente. Il primo sintomo osservabile consiste in un viraggio del colore della vegetazione verso un verde più pallido, a cui segue un rapido appassimento delle foglie, che assumono una colorazione rosso mattone e rimangono attaccate alla pianta per lungo tempo. Sezionando le branche malate si riscontrano ampie necrosi che interessano la zona corticale e quella cambiale.

Il batterio penetra per ferita e si diffonde velocemente in tutta la pianta causandone la morte in breve tempo.

Come per tutte le malattie ad eziologia batterica il controllo è principalmente affidato a pratiche agronomico-culturali quali: miglioramento generale delle condizioni del nocciolo, individuazione tempestiva ed asportazione del materiale vegetale infetto, ecc.; ed a trattamenti con prodotti rameici per diminuire la quantità di inoculo presente in campo.

Negli ultimi anni un nuovo prodotto chimico a base di Acybenzolar-S-metile (Bion[®]) è stato registrato per il contenimento di questa grave patologia del nocciolo. Il Bion è un induttore di resistenza analogo dell'acido salicilico che viene distribuito da solo o in miscela con dei formulati a base di rame.

Nonostante questo, la progressione della malattia è rimasta costante fino ad oggi interessando quasi esclusivamente le zone dei colli Cimini e dei colli Sabatini, in particolare la parte racchiusa nella caldera del lago di Vico e la zona di Vico Matrino situate rispettivamente nei comuni di Caprarola e Capranica (Fig. 1).

Altre zone ad alta densità corilicola situate in comuni limitrofi o addirittura in quelli citati sembrano essere immuni dalla malattia o comunque interessate solo in modo marginale.

Alcuni studi effettuati negli ultimi tempi, mettendo in relazione la diffusione della malattia con parametri climatici, pedologici ed idrografici, evidenziano una chiara correlazione tra presenza della malattia e temperature più basse unite ad un'alta frequenza di gelate tardive (Fabi *et al.*, 2004).

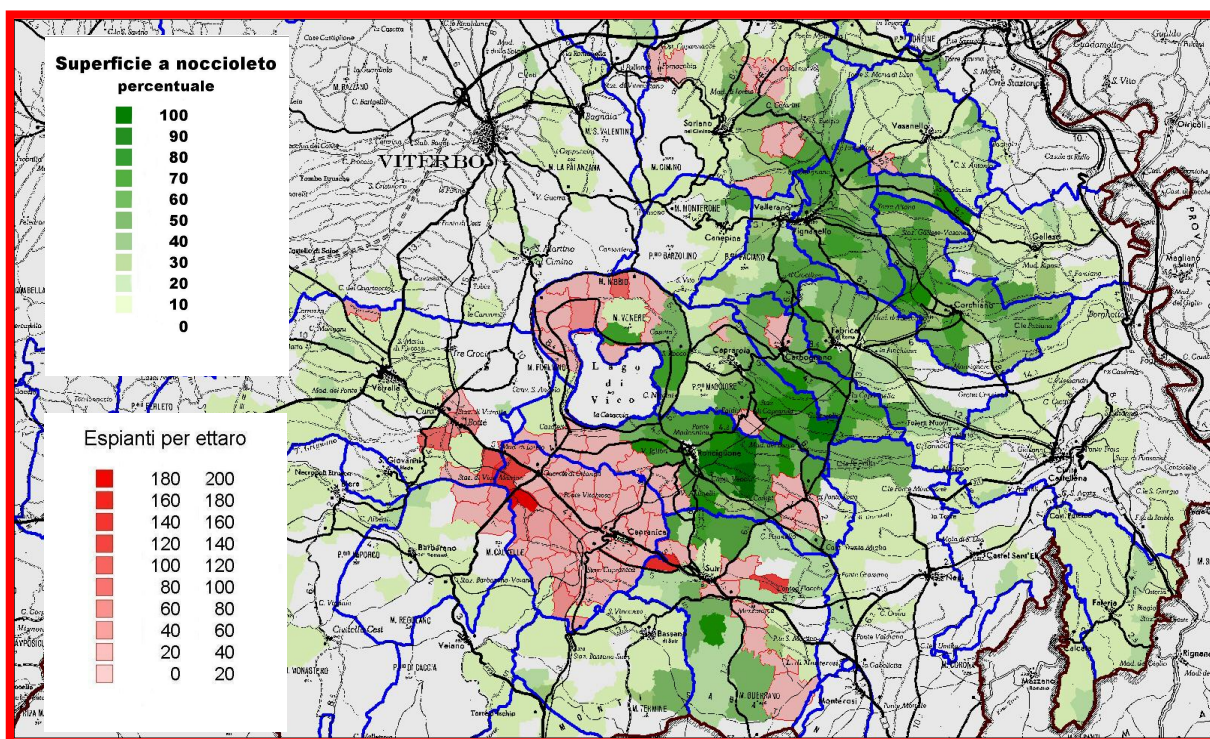


Fig 1: Superficie coltivata a nocciolo nell'area dei colli Cimini e sabatini (in verde) ed espianti dovuti alla patologia nel periodo 2003-2005 (in rosso) (Fabi *et al.*, 2005).

5. I SALI DI RAME IN AGRICOLTURA

Il primo riferimento alle capacità anticrittogamiche del rame risale al 1807, anno in cui il botanico francese Prevost notò che le spore del fungo *Ustilago tritici*, agente eziologico del carbone dei cereali, non germinavano quando poste in acqua bollita in recipienti di rame. Questa osservazione però non ebbe risvolti pratici fino a quando il viticoltore francese Millardet notò l'efficacia antiperonosporica del latte di calce preparato in recipienti di rame. Ebbe così origine la poltiglia bordolese, composto ottenuto dalla reazione del solfato di rame con idrato di calcio.

Oggi il rame, ad oltre un secolo del suo primo utilizzo in agricoltura, riveste ancora un ruolo di primaria importanza in fitoiatria, per alcuni vantaggi che presenta rispetto ai moderni fitofarmaci di sintesi. Questi sono: l'ampio spettro di azione; lo scarso rischio di innesco di fenomeni di resistenza; la prolungata azione protettiva dovuta alla lenta solubilizzazione dei suoi Sali e l'attività antibatterica.

Accanto agli effetti positivi però vanno citati anche quelli negativi. Questi sono: a) l'accumulo nel suolo, il rame infatti interagisce con i costituenti del terreno i quali possono renderlo insolubile impedendone la percolazione verso gli strati del terreno più profondi, inoltre elevate disponibilità di rame nel terreno interferiscono con i processi di assorbimento del ferro causando clorosi clorosi ferrica, questi fenomeni sono rilevabili soprattutto in terreni acidi; b) I fenomeni di fitotossicità, il rame può provocare, ustioni e/o rugginosità su varietà più sensibili, necrosi dei tessuti, riduzione della fotosintesi, riduzione dello sviluppo della pianta, danni alle membrane cellulari.

Lo ione Cu^{++} , forma del rame attiva contro batteri e alcuni funghi, agisce all'esterno della pianta esclusivamente per contatto. Nei funghi impedisce la germinazione delle spore e dei conidi, e nei batteri agisce nella fase di pre-penetrazione, diminuendo la quantità di inoculo.

In seguito ai trattamenti effettuati, i microrganismi assorbono il rame in dosi elevatissime rispetto alle loro esigenze. In piccole quantità il rame è indispensabile al metabolismo microbico. Assorbito in quantità elevate esso causa l'insorgenza di fenomeni tossici, determinati dall'alterazione della permeabilità della membrana cellulare e la denaturazione di diversi enzimi dovuta alla

sostituzione di ioni metallici strutturali dell'enzima con lo ione Cu^{++} (Martelli, 1984).

I sali di rame usati comunemente in agricoltura sono: idrossido di rame $[\text{Cu}(\text{OH})_2]$, ossicloruro di rame $[\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3]$, solfato di rame $[\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}]$, ossido rameoso $[\text{Cu}_2\text{O}]$ (Muccinelli, 1997). Questi, presenti sul mercato in differenti formulazioni, si differenziano tra loro per differenti capacità di solubilità, adesività, prontezza d'intervento, persistenza e fitotossicità (Donnarumma e La torre, 2000). Le principali proprietà chimico fisiche che determinano questi parametri sono: forma e finezza delle particelle, che si traduce in una migliore e più uniforme distribuzione del prodotto; solubilità in acqua che determina la prontezza di intervento, in quanto solo la parte di rame sotto forma ionica al momento del trattamento è immediatamente disponibile, la rimanente quota è resa disponibile gradualmente in seguito all'azione di solubilizzazione dell'anidride carbonica, presente nell'aria ed emessa dalle piante durante il processo di respirazione, di secrezioni dell'ospite e dello stesso patogeno.

Altri parametri da considerare sono il pH e la percentuale di rame sul peso o sul volume totale.

L'utilizzo dei sali di rame inoltre gioca un ruolo fondamentale nel controllo di molti patogeni in agricoltura biologica, i rischi di inquinamento ambientale già citati però hanno portato ad una restrizione del suo uso prima libero. Il Reg. CE N° 473 del 15/03/2002 ha infatti posto dei vincoli per certe colture limitanti all'utilizzo del rame.

In questo contesto le industrie produttrici di fitofarmaci si sono mosse immettendo sul mercato dei prodotti rameici le cui formulazioni hanno delle caratteristiche tali da permettere l'impiego di dosi molto ridotte di rame metallo per unità di superficie. Questo risultato è stato raggiunto attraverso due vie, la prima prevede l'utilizzo di particelle di estrema finezza che garantiscono una elevata ed uniforme copertura, ed una migliore adesività sulla vegetazione, la seconda si basa sull'utilizzo di sali metallici chelati o complessati con peptidi e aminoacidi che dovrebbero rendere possibile la penetrazione all'interno dei tessuti vegetali.

Va rilevato però che la maggiore reattività di queste formulazioni è spesso accompagnata da un aumento di fitotossicità.

6. QUORUM SENSING

Acquisizioni recenti nello studio dell'espressione genica nei batteri indicano che molte specie utilizzano un sistema di comunicazione intercellulare. Questo fenomeno, denominato "Quorum sensing" (Fuqua *et al.*, 1994) è un meccanismo biologico che permette ai microrganismi di regolare l'espressione genica in risposta al maggiore o minore affollamento presente all'interno di una colonia batterica.

Per percepire la densità di popolazione di una colonia i batteri utilizzano delle molecole segnale chiamate autoinduttori (AI) prodotte in piccolissime quantità dai batteri stessi.

La regolazione della bioluminescenza in *Vibrio fischeri*, è stato il primo sistema legato al quorum sensing scoperto (Eberhard, 1972; Nealson *et al.*, 1970) e successivamente studiato in dettaglio. Indagando sul meccanismo alla base della bioluminescenza di questi microrganismi marini, si scoprì che il filtrato ottenuto da una coltura luminescente di alta densità cellulare, era in grado di indurre luminescenza in una coltura non luminescente a bassa densità. In seguito (Kaplan e Greenberg, 1985) si scoprì che l'agente in grado di indurre la luminescenza nelle colture era un autoinduttore che andava accumulandosi durante lo sviluppo della colonia e che, raggiunta una soglia limite, attivava i geni che codificavano per la bioluminescenza. La molecola responsabile dell'attivazione della bioluminescenza in *Vibrio fischeri* è stata identificata in un derivato di un lattone dell'omoserina coniugato con una catena laterale acilica, il 3-oxoesanoil-omoserina lattone (OHHL) (Eberhard *et al.*, 1981).

Nel modello di *Vibrio fischeri* queste molecole entrano liberamente nella cellula e interagiscono con una proteina di regolazione (LuxR), inducendo la trascrizione di un operone che codifica i geni implicati nella luminescenza e di un altro gene (*luxI*) che determina la produzione dell'autoinduttore, mantenendone costante il livello.

In altre specie batteriche Gram-negative sono stati individuati sistemi analoghi, in cui il mediatore chimico è un lattone dell'N-acil omoserina (N-AHL),

The diagram illustrates the quorum sensing mechanism in Gram-negative bacteria. Inside the cell, Acyl-HSL synthesis occurs via a cycle involving LuxI, SAM, ACP-SH, Acyl-ACP, and 5'-MTA. Acyl-HSL is secreted and binds to LuxR-type proteins in the environment. The complex enters the cell and binds to the lux-type box, activating the transcription of target genes.

I lattoni dell'N-acilomoserina (fig. 3) sono gli autoinduttori più utilizzati e più studiati nelle specie batteriche Gram-negative. Sono costituiti da un gruppo lattonico legato, attraverso un legame ammidico ad una catena acilica, la lunghezza di questa, le sostituzioni sulla stessa e la presenza di uno o più legami insaturi determinano la specificità del segnale (Càmara *et al.*, 1998; Fuqua *et al.*, 1996). La lunghezza della catena acilica può variare da 4 a 16 atomi di carbonio, le sostituzioni più frequenti sono state riscontrate sul terzo atomo di Carbonio della catena, dove può essere presente, un gruppo carbonilico, un gruppo idrossilico o un atomo di ossigeno. Al momento sono stati rilevati solo due

composti che presentano doppi legami sulla catena acilica, questi sono il 7,8-cis-N-(3-oxoesanoil) omoserina lattone ed il 7,8-cis-N-(tetradecenoil) omoserina lattone, prodotti rispettivamente da *Rhizobium leguminosarum* e *Rhodobacter sphaeroides* (Shripsema *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1996; Puskas *et al.*, 1997).

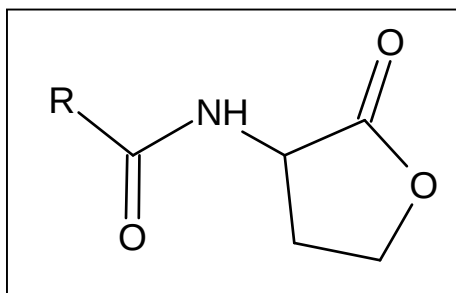


Figura 3. Struttura chimica dei lattoni dell'omoserina, in posizione R è inserita la catena acilica la cui struttura conferisce specificità al segnale.

I lattoni dell'omoserina sono chimicamente stabili a pH neutro o acido in soluzione acquosa (Schaefer *et al.*, 2000). In ambiente basico l'anello lattonico è soggetto ad idrolisi alcalina (Voelkert e Grant, 1970).

Il processo metabolico che porta alla formazione dei lattoni dell'omoserina (Fig. 2) è a carico di una proteina denominata di tipo I (LuxI in *V. fischeri*), che regola sia il processo di sintesi che quello di catalisi dei lattoni dell'omoserina. La frazione acilica della molecola deriva da composti intermedi della catena metabolica di produzione degli acidi grassi, coniugati con un trasportatore di gruppi acilici denominato Acyl Carrier Protein (ACP), mentre il lattone dell'omoserina deriva dalla S-adenosilmetionina (SAM), prodotto derivato dalla metionina, normalmente coinvolto in varie reazioni di metilazione.

La reazione implica la formazione di un legame amminico tra il primo atomo di carbonio dalla catena acilica trasportata dalla ACP e l'azoto del gruppo amminico della SAM, la formazione del lattone dell'omoserina ed il rilascio dello stesso. Il prodotto finale della reazione è la 5'-metiltioadenosina che viene utilizzato per nuovi cicli di sintesi.

In tabella I sono riportate alcune delle molecole con funzione di autoinduzione comunemente riscontrate in specie batteriche che utilizzano sistemi di tipo "quorum sensing" e le rispettive abbreviazioni con cui queste vengono indicate.

Tabella I: Abbreviazioni utilizzate per indicare le molecole attivatrici del “quorum sensing”.

BHL	N-Butanoil-L-omoserina lattone
HHL	N-exanoil-L-omoserina lattone
OHL	N-octanoil-L-omoserina lattone
dHL	N-decanoil-L-omoserina lattone
dDHL	N-dodecanoil-L-omoserina lattone
TDHL	N-tetradecanoil-L-omoserina lattone
OHHL	N-(3-oxo-esanoil)-L-omoserina lattone
OOHL	N-(3-oxo-octanoil)-L-omoserina lattone
ODHL	N-(3-oxodecanoil)-L-omoserina lattone
OdDHL	N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-omoserina lattone
OtDHL	N-(3-oxo-tetradecanoyl)-L-omoserina lattone
HBHL	N-(3-idrossibutirril)-L-omoserina lattone
HHHL	N-(3-idrossiesanoil)-L-omoserina lattone
HOHL	N-(3-idrossioctanoil)-L-omoserina lattone
HDHL	N-(3-idrossidecanoil)-L-omoserina lattone

Alcune delle funzioni biologiche mediate da sistemi di comunicazione intercellulare sono state individuate, altre sono materia di studio. Tra le prime vanno ricordate: la biosintesi di sostanze antibiotiche, la produzione di fattori di virulenza, la biosintesi di esopolisaccaridi con possibile formazione di biofilm, l'aumento della frequenza di coniugazione e quindi dello scambio di materiale genetico, la bioluminescenza, il passaggio da fasi di quiescenza a fasi di attività.

Nella tabella II sono riportati alcuni dei batteri fitopatogeni in cui è stata rilevata produzione di autoinduttori.

Anche nelle specie batteriche Gram-positive sono stati individuati dei sistemi di comunicazione intercellulare: questi batteri usano comunemente peptidi o peptidi modificati come autoinduttori. Sono stati individuati molti meccanismi differenti per ottenere una risposta di tipo “quorum sensing”.

Il meccanismo più diffuso è rappresentato da una trasduzione del segnale attraverso un sistema a due componenti. La molecola segnale è un oligopeptide il

cui precursore viene prodotto ed elaborato all'interno della cellula. Il peptide-segnale ottenuto è poi secreto nell'ambiente circostante, dove può essere avvertito dalle altre cellule batteriche. Il peptide si lega al sensore (una istidino-kinasi), situato sulla membrana cellulare; l'attivazione dell'istidino-kinasi porta alla fosforilazione della proteina che regola la risposta, e l'interazione con un'altra proteina regolatoria facilita l'attivazione trascrizionale. In alternativa, il peptide segnale può essere captato grazie a una oligopeptide permeasi che lo veicola all'interno della cellula batterica, dove può anche agire direttamente come induttore (Lazdunski *et al.*, 2004).

Tab II: Alcune delle specie batteriche fitopatogene in cui sono stati individuati meccanismi di tipo "quorum sensing".

Specie batterica	Autoinduttore	Funzione indotta	Referenze bibliografiche
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	OOHL	Coniugazione (trasferimento del plasmide Ti)	Zhang e Kerr 1991; Zhang <i>et al.</i> 1993; Piper <i>et al.</i> 1993; Fuqua e Winans 1994.
<i>Erwinia carotovora</i>	OHHL	Fattori di virulenza	Pirhonen <i>et al.</i> , 1993.
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	OHHL, HHL, DHL	Sintesi della pectatoliasi	Nasser <i>et al.</i> 1998; Reverchon <i>et al.</i> 1998.
<i>Pantoea stewarti</i>	OHHL	Produzione di esopolisaccaridi	Bech von Bodman e Farrand 1995. Beck von Bodman <i>et al.</i> , 1998).
<i>Pseudomonas</i> sp.	OHHL, HHL	Produzione esopolisaccaridi Sopravvivenza epifitica	Beck von Bodman <i>et al.</i> 2003.
<i>Ralstonia solanacearum</i>	OHL, HOOL, HHL	Transizione da fase quiescente a fase parassitaria	Beck von Bodman <i>et al.</i> 2003.
<i>Xanthomonas campestris</i>	OOHL, altre sostanze a basso peso molecolare.	Fattori di virulenza Produzione esopolisaccaridi	Cha <i>et al.</i> 1998; Barber <i>et al.</i> 1997; Chun <i>et al.</i> 1997 ; Poplasky <i>et al.</i> 1998.

7. VERIFICA DELLA PRODUZIONE DI AUTOINDUTTORI DA PARTE DI SPECIE BATTERICHE FITOPATOGENE

La produzione di autoinduttori è un processo regolato da molti fattori come temperatura, fonti di nutrimento a disposizione, densità di popolazione della colonia batterica. Variazioni delle condizioni ambientali hanno una grossa ripercussione sulla quantità prodotta della molecola segnale.

Risulta quindi molto complesso determinare le condizioni ottimali per la rilevazione *in vitro* di un'eventuale produzione di N-AHL o di altri autoinduttori.

Un grosso passo in avanti è stato compiuto con la messa a punto di bioindicatori in grado di rilevare l'eventuale produzione di autoinduttori anche se presenti in piccole quantità, questi tuttavia hanno differente sensibilità e specificità in funzione del tipo di sostanza prodotta.

Per ogni specie batterica occorre individuare il terreno di coltura appropriato, la temperatura ottimale e la fase di crescita in cui la produzione di autoinduttori è massima, l'indicatore biologico più adatto.

Risultati negativi sono quindi difficili da interpretare in quanto non si possono distinguere casi in cui la specie oggetto di studio non produce autoinduttori, da altri in cui le condizioni sperimentali applicate sono errate.

7.1. Influenza della fase di crescita e del terreno di coltura sulla produzione in vitro di autoinduttori

Eberhard (1972) nel corso di uno studio sul fenomeno della bioluminescenza in *Vibrio fischeri*, rilevò la presenza di un inibitore dell'autoinduzione quando il batterio era messo in coltura su terreni complessi. Questa sostanza non veniva prodotta quando venivano utilizzati substrati poveri di nutrienti. L'autore ne dedusse che la produzione di autoinduttori era un fenomeno che si manifestava *in vitro* esclusivamente quando veniva utilizzato il secondo tipo di substrato nutritivo.

Successivamente Bainton *et al.* (1992) analizzando il surnatante di 40 specie batteriche cresciute in differenti substrati, osservarono che la produzione di N-

AHL era minima nei terreni di coltura ricchi di nutrienti convenzionalmente usati per la crescita dei batteri, bassa nella maggior parte dei casi, quando venivano utilizzati substrati poveri, alta utilizzando quest'ultimo tipo di substrati in: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*.

In seguito molti autori, affrontando studi sulla verifica della produzione di lattoni dell'omoserina o di altri induttori del "quorum sensing", hanno utilizzato terreni di coltura poveri di nutrienti per l'esecuzione delle prove sperimentali.

Un secondo punto da chiarire era quello della determinazione della fase di crescita in cui si massimizza la produzione di autoinduttori. Gli studi effettuati fino ad oggi suggeriscono che la fase di crescita tardo-esponenziale e il primo periodo di quella stazionaria sono gli intervalli di tempo in cui è più probabile rilevare un'eventuale produzione di autoinduttori (Cha *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 1994; Shaw *et al.*, 1997).

7.2. Bioindicatori utilizzati nel rilevamento della produzione di autoinduttori

L'introduzione dell'uso di indicatori biologici nello studio dei meccanismi del "quorum sensing" ha determinato una forte accelerazione nella ricerca, in quanto precedentemente era molto difficoltoso e laborioso rilevare la presenza di molecole molto piccole, sintetizzate dai batteri in quantità minime e solo in condizioni sperimentali particolari.

La maggior parte degli indicatori biologici utilizzati per il rilevamento della presenza di lattoni dell'N-omoserina sono dei mutanti incapaci di sintetizzare N-AHL, ma che in presenza di autoinduttori esogeni esprimono il carattere indotto da queste molecole nel fenotipo naturale.

La specificità e la sensibilità di questi microrganismi nei confronti dei diversi autoinduttori varia notevolmente. È quindi prassi comune usarne diversi in parallelo, in modo da coprire uno spettro più ampio possibile di molecole segnale individuabili.

Uno tra i bioindicatori più impiegati sfrutta la capacità di *Chromobacterium violaceum*, un batterio comune in acqua e terreno, di produrre un pigmento color

porpora che esplica azione antibatterica, la violaceina (Lichstein, e van de Sand, 1945). La sintesi della violaceina è indotta dalla produzione da parte del batterio di N-esanoil-L-omoserina lattone (HHL) (McClellan *et al.*, 1997).

Il ceppo di *C. violaceum* modificato, denominato CV026, è un mutante *mini-tn5* violaceina negativo, non in grado di produrre l'induttore ma con capacità di produrre il pigmento in seguito ad incubazione in presenza di N-AHL esogeno.

C. violaceum CV026 è sensibile ai N-AHL con catene aciliche lunghe dai 4 ai 6 atomi di carbonio (McClellan *et al.*, 1997).

Nello stesso studio gli autori hanno anche rilevato che la produzione di violaceina del mutante è inibita da N-AHL con lunghe catene aciliche (da 10 a 14 atomi di Carbonio), l'indicatore può essere quindi anche utilizzato per la rilevazione di questi composti mediante l'aggiunta al terreno di coltura di OHHL o HHL. In questo caso il risultato positivo è la mancata produzione di violaceina.

Un altro gruppo di indicatori biologici molto usati sono quelli basati sull'emissione di luminescenza. Questi sono plasmidi, inseriti in cellule competenti di *Escherichia coli*, portanti un gene che codifica per la proteina di ricezione degli AHL. Questo gene, in presenza di una AHL adeguata attiva la trascrizione del gruppo genico *luxCDABE*, producendo una luminescenza proporzionale alla concentrazione di AHL presente.

Di questo gruppo fanno parte: il pSB401, portante il recettore LuxR di *V. fischeri* che è molto recettivo a concentrazioni nanomolari di OHHL e a concentrazioni micromolari di OdDHL; il pSB 536 portante il recettore AhvR di *Aeromonas hydrophila* che è recettivo a concentrazioni nanomolari di OdDHL e dDHL; il pSB1075 derivato da *P. aeruginosa* che è molto recettivo alla presenza di OdDHL (Brelles-mariño e Bedmar 2001).

Un terzo gruppo di bioindicatori è costituito da mutanti di *A. tumefaciens*, che manifestano la presenza di N-AHL colorando in blu il terreno di coltura dopo l'incorporazione di 5-bromo-4-cloro-3-β-D-galattopiranoside (X-Gal).

La funzione di questi mutanti come biosensori deriva dalla presenza di un costrutto binario: infatti un primo plasmide contiene il gene *traR* (omologo di LuxR) posto sotto il controllo di un promotore forte, mentre un secondo porta il gene *lacZ* fuso a un promotore regolato da TraR (*traI::lacZ*). Il ceppo mutato,

incapace di produrre la molecola di autoinduttore endogena a causa della mancanza del plasmide Ti, è invece in grado di rispondere alla somministrazione di un'ampia gamma di AHLs, attraverso l'induzione di attività β -galattosidasi, evidenziata da una colorazione blu della colonia del batterio (Shaw *et al.*, 1997).

Fanno parte di questo gruppo: *A. tumefaciens* NT1 (pSVB33) (pJM 749) (Piper *et al.*, 1993); *A. tumefaciens* A136 (pCF218) (pCF372) (Fuqua e Winans, 1996); *A. tumefaciens* pDC141E33 (Shaw *et al.*, 1997); *A. tumefaciens* WCF 47 (pCF218) (pCF372) (Zhu *et al.*, 2003).

Tutti i bioindicatori derivati da ceppi di *A. tumefaciens* sono in grado di rilevare la presenza di lattoni dell'omoserina con catene aciliche dalla lunghezza superiore ai 6 atomi di carbonio. Il numero di molecole individuabili e la sensibilità a quantità sempre minori dell'autoinduttore è andato affinandosi dai primi bioindicatori ai più recenti.

I) SCOPO DEL LAVORO

Allo Stato attuale le conoscenze sulla patologia oggetto del presente lavoro ed in particolare le caratteristiche di incidenza e diffusione della malattia, indicano nella “moria del Nocciolo” una patologia molto grave ma capace di diffondersi solo in condizioni climatiche particolari o, in ogni caso, in presenza di fonti di stress per la pianta.

Gli obiettivi del presente lavoro e le tappe intermedie prefisse per la sua realizzazione sono i seguenti:

Approfondire le indagini finora condotte sugli agenti eziologici a cui, in tempi diversi, è stata imputata la malattia. Questo attraverso una serie di isolamenti da materiale sintomatico, la caratterizzazione sia degli isolati ottenuti che di altri provenienti da isolamenti precedenti, la determinazione del profilo metabolico tipico delle diverse specie batteriche associate alla moria del nocciolo, al fine di evidenziare eventuali differenze sia tra le specie che all'interno di queste, e dei cicli di inoculazioni per verificare la patogenicità sia di nuovi isolati che di ceppi noti.

Avviare uno studio sulla capacità di patogeni coinvolti nella moria di produrre autoinduttori di processi di “quorum sensing”, allo scopo di approfondire le conoscenze sul processo infettivo e sull'interazione ospite-patogeno incorrente nella patologia in oggetto. Il lavoro si propone di determinare le condizioni ottimali per la produzione *in vitro* di autoinduttori da parte di batteri oggetto dello studio, e di verificare l'eventuale produzione di autoinduttori mediante l'uso di indicatori biologici.

In ultimo è stata valutata *in vivo* l'efficacia di formulati rameici a basso contenuto di rame nel contenimento della malattia.

II) MATERIALI E METODI

1 INDAGINI SULL'EZIOLOGIA DELLA MALATTIA

1.1 TERRENI DI CULTURA UTILIZZATI

Per l'esecuzione di questa fase del lavoro sono state utilizzati i seguenti terreni di coltura. La sterilizzazione è stata fatta mediante autoclavaggio a 121°C per 20 minuti.

ANS (agar nutritivo saccarosio)

Brodo nutritivo	8 g
Saccarosio	50 g
Agar tecnico	18 g
Acqua distillata	1000 ml

Dopo la sterilizzazione il terreno è stato raffreddato alla temperatura di 50°C, quindi versato in piastre petri del diametro di 10 cm. Dopo la sterilizzazione le piastre sono state poste in termostato per 12 ore, alla temperatura di 33°C per eliminare la condensa formatasi.

YDC

Destrosio	20 g
estratto di lievito	10 g
CaCO ₃	20 g
Agar Tecnico	18 g
Acqua distillata	1000 ml

Il terreno è stato distribuito in tubi da batteriologia in quantità di 5 ml/tubo prima della sterilizzazione, dopo i tubi sono stati fatti solidificare a becco di clarino, in ghiaccio di acqua per evitare la precipitazione del carbonato di calcio.

ANG (agar nutritivo glicerolo)

Brodo nutritivo	8 g
Glicerolo	20 g
Agar tecnico	18 g
Acqua distillata	1000 ml

Il terreno è stato distribuito in tubi da batteriologia in quantità di 5 ml/tubo prima della sterilizzazione, dopo i tubi sono stati fatti solidificare in posizione inclinata (becco di clarino).

BUG™ (Biolog Universal Growth) Biolog®

BUG agar	57 g
Acqua distillata	1000 ml

Il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANS.

LB (brodo Luria-Bertani)

Cloruro di sodio	10 g
Tryptone	10 g
Estratto di lievito	5 g
Acqua distillata	1000ml

LB agar

Per ottenere LB agar sono stati aggiunti 18 g/l H₂O di agar tecnico al brodo LB. Il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANS.

TSI (Triple sugar iron agar)

Peptone da caseina	15 g
Peptone da carne	5 g
Estratto di carne	5 g
Estratto di lievito	3 g
Cloruro di sodio	5 g
Lattosio	10 g
Saccarosio	10 g

D(+) glucosio	1	g
Citrato ferrico	0,5	g
Sodio tiosolfato	0,5	g
Rosso fenolo	0,024	g
Agar tecnico	12	g
Acqua distillata	1000	ml

Il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANS.

KB (substrato B di King)

Peptone da caseina	10	g
Peptone da carne	10	g
Glicerolo	10	g
K ₂ HPO ₄	1,5	g
MgSO ₄	1,5	g
Agar tecnico	15	g
Acqua distillata	1000	ml

Il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANS.

1.2 BATTERI UTILIZZATI

I ceppi di *Pseudomonas avellanae* utilizzati per l'aggiornamento del database del sistema Biolog[®] sono stati reperiti presso la “National Collection of Plant Pathogenic Bacteria”, Harpenden, UK (NCPBPB). L'elenco completo è riportato nella tabella III.

Tabella III: Ceppi di *Pseudomonas avellanae* utilizzati per l'aggiornamento del database del sistema Biolog[®] e per l'analisi del profilo nutrizionale.

Specie	Ceppo	provenienza
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 3489	Grecia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 3490	Grecia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 3491	Grecia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 3872	Italia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 3874	Italia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 4221	Italia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 4222	Italia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 4223	Italia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 4224	Italia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 4225	Grecia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 4226	Grecia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 4227	Italia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBPB 4228	Grecia

Per la comparazione dei profili nutrizionali di *Pseudomonas avellanae* sono stati utilizzati i medesimi ceppi batterici (tabella III) con l'aggiunta di quelli riportati in tabella IV, il ceppo NCPBPB 3487 è stato reperito presso la National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, il ceppo BPiC 636 è stato fornito dal Dr. P.G. Psallidas, Benaki Phytopathological Institute, Greece, i ceppi 153, 7B, 8B, provengono da isolamenti da materiale sintomatico svolti presso il Dipartimento Protezione delle Piante.

Per la comparazione dei profili nutrizionali delle enterobatteriacee sono stati utilizzati i ceppi batterici riportati in tabella V.

Tabella IV: Ceppi di *Pseudomonas avellanae* utilizzati per l'analisi del profilo nutrizionale

Specie	Ceppo	provenienza
<i>Pseudomonas avellanae</i>	NCPBP 3487	Grecia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	BPC 636	Grecia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	153	Italia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	7 B	Italia
<i>Pseudomonas avellanae</i>	8 B	Italia

Tabella V: Ceppi di *Enterobacteriaceae* utilizzati per l'analisi del profilo nutrizionale

Batteri	Ceppo	Ospite
<i>Brenneria rubrifaciens</i>	NCPBP 2020	<i>Juglans regia</i>
<i>Brenneria nigrifluens</i>	NCPBP 564	<i>Juglans regia</i>
<i>Erwinia amylovora</i>	A 26	<i>Malus communis</i>
Isolato da nocciolo	Fe 29	<i>Corylus avellana</i>
Isolato da nocciolo	60	<i>Corylus avellana</i>
Isolato da nocciolo	87	<i>Corylus avellana</i>
Isolato da nocciolo	41	<i>Corylus avellana</i>
Isolato da nocciolo	39	<i>Corylus avellana</i>
Isolato da nocciolo	3	<i>Corylus avellana</i>

Per l'esecuzione delle prove di patogenicità sono stati utilizzati i seguenti ceppi batterici:

2003

44 RV; 46 RV; 52 RV; 54 RV; 75 RV; 17 TN; 19 TN; 5 TC; 20 RC; 22 RC; 30 RN; 31 RN; 32 RN; isolati da materiale sintomatico e caratterizzati con il sistema Biolog[®] nel corso del presente lavoro.

7 B; 8 B; 29; 74; 153; isolati da materiale sintomatico e caratterizzati come *P. avellanae* in base al profilo degli acidi grassi.

3; 39; 41; 60; 87; isolati da materiale sintomatico e caratterizzati in base al confronto del profilo degli acidi grassi, scelti per la loro similarità con specie appartenenti al gruppo *amylovora* del genere *Erwinia*, ottenuti all'epoca dei primi studi della malattia (Varvaro, 1994).

Come controllo positivo è stato utilizzato il ceppo di *P. avellanae* NCPPB 3487.

2004

7 B; 8 B; 29; 153; già inoculati l'anno precedente.

Come controllo positivo sono stati utilizzati i ceppi NCPPB 3487, NCPPB 3872 e BPiC 636.

FE 29; FE 30 isolati da materiale sintomatico appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriacee.

Sono stati inoltre inoculati i ceppi noti: *Brenneria quercina* ES 102, *Brenneria salicis* NCPPB 487, *Brenneria rubrifaciens* NCPPB 2020, *Brenneria nigrifluens* NCPPB 564.

2005

Sono stati inoculati gli stessi ceppi del 2004 eccetto quelli appartenenti al genere *Brenneria*.

La denominazione dei ceppi è quella loro assegnata presso il Dipartimento Protezione Piante dell'Università della Tuscia, Viterbo. Il ceppo di controllo *P. avellanae* BPiC 636 è stato fornito dal Benaki Phytopathological Institute, Atene Grecia. Il ceppo *B. quercina* ES 102 è stato fornito dal Dott. Norman Schaad, Agricultural Service Foreign Disease, Wood Service Research Unit, Washington D.C. U.S.A. I ceppi contraddistinti dalla sigla NCPPB, provengono dall'omonima collezione.

1.3 ISOLAMENTI

Nel corso di tutto il periodo di studio sono stati prelevati campioni sintomatici su cui sono stati eseguiti degli isolamenti dell'agente eziologico.

La tecnica di isolamento applicata è stata la seguente:

I campioni legnosi, in condizioni di sterilità, sono stati prima disinfettati esternamente con alcool etilico a 95° e quindi flambati leggermente, per eliminare eventuali inquinanti. Dopo aver asportato con un bisturi sterile la parte corticale esterna, sono stati prelevati sul fronte di avanzamento della necrosi, varie porzioni legnose che, poste in una goccia di acqua distillata sterile, venivano triturate finemente. Dalla sospensione ottenuta è stata prelevata una aliquota che è stata strisciata su ANS per la separazione delle cellule batteriche. Le piastre sono state quindi incubate a 26° fino ad avvenuto sviluppo delle colonie batteriche (24-72 ore in funzione della velocità di crescita).

Per la conservazione dei batteri nel breve periodo sono stati utilizzati: YDC per le Enterobatteriacee e per le Xanthomonadacee, ANG per gli altri isolati. Per la conservazione dei batteri nel lungo periodo è stato utilizzato brodo nutritivo Luria-Bertani (LB) addizionato del 15% di glicerolo come criopreservante (protegge i batteri da eventuali danni da congelamento).

1.4 CARATTERIZZAZIONE

Alcuni degli isolati ottenuti sono stati caratterizzati in base alla determinazione del profilo degli acidi grassi, presso la National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, UK (NCPBPB).

Per una caratterizzazione in tempi più rapidi, questa volta sulla base della determinazione del profilo biochimico, è stato utilizzato il sistema Biolog®.

La determinazione del profilo nutrizionale si basa sulla verifica della capacità, da parte delle specie batteriche saggiate, di ossidare 95 differenti fonti di carbonio (Fig.2), contenute in una piastra con micropozzetti.

Il sistema Biolog® utilizza una reazione di ossido-riduzione per indicare con una variazione colorimetrica la respirazione di sospensioni di cellule vive. I

micropozzetti inizialmente sono incolori, quando un composto chimico nel micropozzetto è utilizzato dal microorganismo, avviene un “burst” della respirazione che causa l’ossidazione del composto e la conseguente riduzione del colorante a base di tetrazolio, che assume una colorazione porpora. La combinazione dei pozzetti in cui è avvenuta la reazione costituisce una “impronta metabolica” caratteristica del microorganismo.

1.4.1 Aggiornamento del database

A questo scopo il database del programma è stato supplementato del profilo biochimico di *P. avellanae* di cui era sprovvisto. Questo è stato fatto inserendo, replicato per due volte, il profilo di 13 ceppi noti Tabella III.

Gli isolati sono stati strisciati su BUG agar ed incubati a 26°C per 48 ore, quindi strisciati ancora una volta sullo stesso terreno di coltura e reincubati alla stessa temperatura per 24 ore. Trascorso il secondo periodo di incubazione una aliquota di patina batterica di ciascun isolato è stata disciolta in 20 ml di soluzione fisiologica (Biolog inoculating fluid GN/GP; 0,40% NaCl, 0,03% Pluronic F-68, 0,02% Gellan Gum) fino al raggiungimento di una densità ottica di 0,52, ad una lunghezza d’onda di 590 nm, corrispondente ad una densità di circa 10^8 u.f.c./ml. La sospensione batterica è stata distribuita nelle piastre contenenti le varie fonti di carbonio in quantità di 150 µl per micropozzetto ed incubata a 30°C. Ogni 12 ore, il grado di colorazione dei singoli pozzetti è stato determinato attraverso una scansione spettrofotometrica alle lunghezze d’onda di 590 µm e 750 µm. Al raggiungimento del punto di utilizzazione finale (end point) le matrici ottenute sono state utilizzate per l’aggiornamento del database.

1.4.2 Prove preliminari

I ceppi batterici ottenuti sono stati sottoposti ad alcune prove preliminari al fine di rendere più precisa l’identificazione.

La prima delle prove eseguite è stata la verifica della colorazione di Gram al fine di selezionare i microrganismi Gram-negativi.

Sono state verificate sia l'eventuale produzione di capsula di levano su ANS, sia la fluorescenza su terreno B di King.

È stata quindi eseguita la verifica della presenza dell'enzima citocromo-ossidasi evidenziata mediante l'uso di un donatore di elettroni, l'NN-dimetil-1-4-fenilendiammina. La prova è stata eseguita ponendo in una piastra Petri un dischetto di carta da filtro del diametro di circa 1 cm, sul quale è stata distribuita una aliquota di patina batterica cresciuta per 24 ore. È stata quindi posta sul dischetto una goccia del reagente diluito ad una concentrazione pari all'1%. La prova prevede in caso di reazione positiva la colorazione, dal rosa al viola intenso, della patina batterica nei trenta secondi successivi all'aggiunta del reagente.

Gli isolati risultati ossidasi negativi sono stati fatti crescere in tubi contenenti TSI agar, solidificato a becco di clarino, al fine di selezionare quelli appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

L'uso di questo terreno di coltura evidenzia, attraverso una variazione colorimetrica l'abilità dei batteri di fermentare tre zuccheri: glucosio, saccarosio e lattosio, le cui concentrazioni sono rispettivamente 0,1%, 1% e 1%. Un indicatore di pH contenuto nel terreno reagisce, colorandosi di giallo, alla produzione di acidi derivati dalla fermentazione dei carboidrati.

L'inseminazione è stata eseguita prima per infissione e successivamente per semina superficiale.

La fermentazione dei carboidrati è stata determinata in base all'estensione della reazione dovuta alla conseguente produzione di acidi. Una produzione di acidi limitata alla parte basale del tubo indica l'utilizzazione del solo glucosio, che essendo presente quantità di dieci volte inferiore agli altri zuccheri causa una reazione poco estesa.

L'estensione della colorazione a tutto il tubo indica la fermentazione di uno tra lattosio e saccarosio o di entrambi che, presenti in concentrazione maggiore, causano una reazione più estesa (Tabella VI). La crescita su TSI inoltre può evidenziare la riduzione del tiosolfato di sodio a idrogeno solfato attraverso un viraggio verso il nero del terreno di coltura, la produzione di altri gas invece è evidenziata dalla rottura del substrato agarizzato o dal distacco dello stesso dal fondo del tubo.

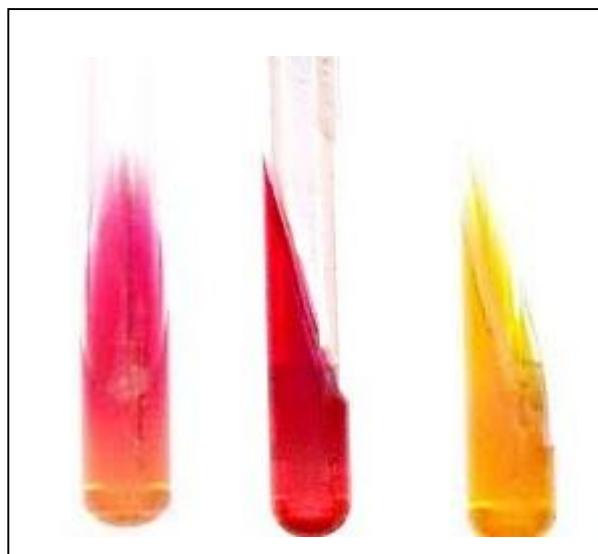


Figura 4: Alcune delle reazioni possibili in seguito all'inoculazione in tubo di TSI agar. A) Fermentazione del solo glucosio. B) nessuna fermentazione. C) Fermentazione del glucosio, di uno tra lattosio e saccarosio o di entrambi.

Tabella VI: Possibili risultati della prova di crescita su TSI degli isolati batterici per la loro attribuzione alla famiglia delle Enterobatteriacee. Il colore rosso indica reazione alcalina, il colore giallo indica reazione acida. Per superficie si intende la parte del terreno solidificata a becco di clarino. Non sono state considerate la produzione di gas e di idrogeno solfato in quanto non utili alla caratterizzazione di enterobatteriacee fitopatogene.

Risultati (superficie /fondo)	Simbolo	Interpretazione	Attribuzione
Rosso/Giallo	K/A	Fermentazione del glucosio	Enterobatteriacee
Giallo/Giallo	A/A	Fermentazione del glucosio, lattosio e/o saccarosio	Enterobatteriacee
Rosso/Rosso	K/K	Nessuna fermentazione	Altra famiglia
Non virato/Non virato	NV/NV	Nessuna fermentazione	Altra famiglia

1.4.3 Determinazione del profilo nutrizionale e caratterizzazione

Per la determinazione del profilo nutrizionale gli isolati sono stati strisciati su BUG agar ed incubati a 26°C per 48 ore, quindi strisciati ancora una volta sullo stesso terreno di coltura e reincubati alla stessa temperatura per 24 ore. Trascorso il secondo periodo di incubazione una aliquota di patina batterica di ciascun isolato è stata disciolta in 20 ml di soluzione fisiologica (0,40% NaCl, 0,03% Pluronic F-68, 0,02% Gellan Gum) fino al raggiungimento di una densità ottica di

0,61 per le Enterobatteriacee e 0,52 per gli altri isolati, ad una lunghezza d'onda di 590 nm, questi parametri di torbidità corrispondono a circa 10^8 u.f.c./ml.

La sospensione batterica è stata distribuita nelle piastre contenenti le varie fonti di carbonio in quantità di 150 µl per micropozzetto ed incubata a 30°C per 18-24 ore. Trascorso il periodo di incubazione il grado di colorazione dei singoli pozzetti è stato determinato attraverso una scansione spettrofotometrica alle lunghezze d'onda di 590 µm e 750 µm, l'impronta metabolica così ottenuta è stata comparata con quelle presenti nel database del programma Microlog™ System 4.2.

1.5 COMPARAZIONE DEI PROFILI NUTRIZIONALI

L'utilizzo del sistema Biolog® ha inoltre permesso di generare, per ogni isolato, una matrice che esprime la sua capacità di utilizzazione di 95 differenti fonti di carbonio, le matrici ottenute sono state utilizzate per generare, col programma Microlog™ System 4.2. dei dendrogrammi mediante l'utilizzo di un algoritmo di clusterizzazione di tipo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Un primo confronto ha riguardato 18 isolati di *Pseudomonas avellanae*, in parte depositati presso l'NCPPB di provenienza sia Italiana che Greca, ed in parte provenienti da isolamenti da materiale sintomatico effettuati in questo Dipartimento ed identificati in base al profilo degli acidi grassi, all'analisi del DNA ribosomiale 16S, ed al profilo nutrizionale (Tabelle III e IV).

Un secondo confronto ha riguardato isolati appartenenti alla famiglia della Enterobatteriacee, provenienti da isolamenti da materiale sintomatico (Tabella V).

I profili nutrizionali sono stati ottenuti seguendo la metodologia descritta nel paragrafo precedente. Per ogni isolato sono state eseguite tre repliche, che sono state mediate dal sistema per la determinazione del profilo metabolico.

GN2 MicroPlate™

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Water	α -Cyclodextrin	Dextrin	Glycogen	Tween 40	Tween 80	N-Acetyl-D-Galactosamine	N-Acetyl-D-Glucosamine	Adonitol	L-Arabinose	D-Arabitol	D-Cellobiose
B1	i-Erythritol	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
	D-Fructose	L-Fucose	D-Galactose	Gentiobiose	α -D-Glucose	m-Inositol	α -D-Lactose	Lactulose	Maltose	D-Mannitol	D-Mannose
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D-Melibiose	β -Methyl-D-Glucoside	D- Psicose	D-Raffinose	L-Rhamnose	D-Sorbitol	Sucrose	D-Trehalose	Turanose	Xylitol	Pyruvic Acid Methyl Ester	Succinic Acid Mono-Methyl Ester
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
Acetic Acid	Cis-Aconitic Acid	Citric Acid	Formic Acid	D-Galactonic Acid Lactone	D-Galacturonic Acid	D-Gluconic Acid	D-Glucosaminic Acid	D-Glucuronic Acid	α -Hydroxybutyric Acid	β -Hydroxybutyric Acid	γ -Hydroxybutyric Acid
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
p-Hydroxy-phenylacetic Acid	Itaconic Acid	α -Ketobutyric Acid	α -Ketoglutaric Acid	α -Ketovaleric Acid	D,L-Lactic Acid	Malonic Acid	Propionic Acid	Quinic Acid	D-Saccharic Acid	Sebacic Acid	Succinic Acid
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Bromosuccinic Acid	Succinamic Acid	Glucuronamide	L-Alaninamide	D-Alanine	L-Alanine	L-Alanyl-Glycine	L-Asparagine	L-Aspartic Acid	L-Glutamic Acid	Glycyl-L-Aspartic Acid	Glycyl-L-Glutamic Acid
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
L-Histidine	Hydroxy-L-Proline	L-Leucine	L-Ornithine	L-Phenylalanine	L-Proline	L-Pyroglutamic Acid	D-Serine	L-Serine	L-Threonine	D,L-Carnitine	γ -Aminobutyric Acid
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
Urocanic Acid	Inosine	Uridine	Thymidine	Phenylethylamine	Putrescine	2-Aminoethanol	2,3-Butanediol	Glycerol	D,L- α -Glycerol Phosphate	α -D-Glucose-1-Phosphate	D-Glucose-6-Phosphate

Fig. 5 : Fonti di carbonio analizzate dal sistema Microlog™ System 4.2. per la determinazione del profilo nutrizionale dei batteri gram-negativi. (da: Biolog GN2 MicroPlate™, instruction of use).

1.6. PROVE DI PATOGENICITÀ

Per l'esecuzione delle prove di patogenicità sono state utilizzate delle giovani piante di nocciolo di circa un anno di età della cultivar Tonda gentile romana.

Sono state utilizzate, per ogni isolato due tecniche differenti.

Nel primo caso l'inoculo batterico è stato preparato nel seguente modo: dopo una serie di passaggi su piastre contenenti ANS sono stati strisciati su tubi contenenti ANG solidificato a becco di clarino ed incubati per 48 ore a $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ quindi trasferiti in tubi analoghi ed incubati alla stessa temperatura per 24 ore. Trascorso il secondo periodo di incubazione, sono stati posti nel tubo contenente la sottocoltura 6 ml di acqua distillata sterile in cui, mediante agitazione è stata portata in sospensione la patina batterica. La sospensione è stata quindi centrifugata per 10 minuti alla velocità di 10000 g ed alla temperatura di 8°C . La patina batterica ottenuta dopo l'allontanamento del surnatante è stata risospesa in 6 ml di acqua distillata sterile e diluita fino ad ottenere una concentrazione di 10^8 u.f.c./ml.

Gli inoculi sono stati effettuati depositando una goccia della sospensione batterica su una ferita creata artificialmente in seguito all'asportazione di una gemma.

Alternativamente, gli isolati batterici selezionati per le prove sono stati strisciati in tubi di ANG e lasciati crescere per 48 ore a 26°C , quindi trasferiti in altri tubi del medesimo terreno di coltura per 24 ore alla stessa temperatura. La patina batterica ottenuta è stata sospesa in acqua distillata sterile, la sospensione ottenuta è stata distribuita su piastre di ANG in quantità di 0,1 ml/piastra.

Dopo altre 24 ore di incubazione la patina batterica ottenuta è stata utilizzata per le inoculazioni.

La tecnica di inoculazione adottata in questo caso è stata la seguente: utilizzando un bisturi sterile è stata fatta un'incisione sulla corteccia della pianta fino all'altezza della zona cambiale, in questa ferita è stata quindi applicata la patina batterica utilizzando il medesimo bisturi, la ferita è stata quindi sigillata con parafilm.

Una prima serie di inoculi è stata effettuata nel mese di gennaio 2003 in serra. Sono stati inoculati 24 ceppi batterici di cui 11 provenienti da isolamenti recenti ascrivibili alle famiglie Pseudomonadacee e Xanthomonadacee, 5 identificate come *P. avellanae* (quattro identificati attraverso l'analisi del profilo degli acidi grassi, il quinto identificato utilizzando l'analisi del ribosoma 16S (Proietti Zolla, 2005) ed il sistema Biolog[®] e risultato positivo a precedenti prove di patogenicità), e i restanti sette appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriacee, molto vicini sotto il profilo biochimico alle specie batteriche originariamente appartenenti al gruppo di *E. amylovora*. Come controllo positivo è stato utilizzato il ceppo di *P. avellanae* NCPPB 3872 isolato in Italia.

Sono state eseguite quattro repliche per isolato, le piantine sono state collocate in serra.

Una seconda serie di inoculi è stata effettuata nel mese di aprile 2004. Le piantine inoculate sono state in parte collocate in cella climatica a 25° C, 80% di umidità, illuminate per 16 ore al giorno, ed in parte collocate in serra.

Sono stati inoculati: 2 ceppi appartenenti alla famiglia delle enterobacteriacee dalla morfologia e dal profilo biochimico simile a quello dei generi *Erwinia* e *Brenneria*, 4 ceppi batterici identificati come *P. avellanae* sia mediante la determinazione del profilo degli acidi grassi che dal confronto del profilo biochimico utilizzando il sistema Biolog[®]. Come controllo positivo sono stati inoculati tre ceppi noti di *P. avellanae*, uno di provenienza italiana e due di provenienza greca. Sono stati inoltre inoculati dei ceppi noti di: *Brenneria quercina*, *Brenneria salicis*, *Brenneria rubrifaciens*, *Brenneria nigrifluens*, che si possono accostare, o per sintomatologia sull'ospite o per caratteristiche biochimiche, alla moria o ai ceppi batterici isolati da materiale sintomatico.

In questa serie di isolamenti sono state eseguite quattro repliche per isolato di cui due in serra e due in cella climatica.

Una terza serie di inoculi è stata effettuata nel mese di dicembre 2004. Sono stati inoculati gli stessi ceppi dell'anno precedente, sono state eseguite quattro repliche per isolato collocate tutte in serra.

2. VERIFICA DELLA PRODUZIONE DI LATTONI DELL'OMOSERINA

2.1 BATTERI UTILIZZATI

Sono stati saggiati per la verifica della produzione di lattoni dell'omoserina i ceppi di *Pseudomonas avellanae* riportati in tabella VII.

Sono stati selezionati sei ceppi noti depositati presso diverse collezioni ed un ceppo locale che era risultato patogeno in una serie di inoculazioni precedenti al presente lavoro di ricerca.

Tab. VII: Ceppi di *P. avellanae* utilizzati per la verifica della produzione di lattoni dell'omoserina.

Isolato	Provenienza
44	Grecia
NCPPB 4226	Grecia
NCPPB 3872	Italia
NCPPB 4221	Italia
NCPPB 4224	Italia
BPic 636	Grecia
7 B	Italia

I ceppi contraddistinti dalla sigla NCPPB provengono dalla batterioteca della National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, UK.

Il ceppo contraddistinto dalla sigla BPIC proviene dalla collezione del Benaki Phytopathological Institute, Atene GR.

Il ceppo 7B proviene dalla batterioteca del Dipartimento Protezione Piante, Università degli Studi Della Tuscia, Viterbo, IT.

I ceppi utilizzati come indicatori biologici della presenza di lattoni dell'omoserina sono i seguenti:

Chromobacterium violaceum CV026, mutante mini-tn5 violaceina negativo di *C. violaceum* ATCC 31532 (American Type Culture Collection, Rockville, MD,

USA), non produce naturalmente violaceina, ma riacquista questa capacità in presenza di C4-HLS e C6-HLS (McClellan *et al.*, 1997).

Il ceppo utilizzato di *C. violaceum* CV026 proviene dalla collezione della National Collection of Type Culture, Londra, UK) dove è contraddistinto dalla sigla NCTC 13278.

A. tumefaciens WCF 47 (pCF218) (pCF372) è stato fornito dal Prof. Stephen C. Winans (Cornell University, Ithaca, NY, USA). È un ceppo privo del plasmide Ti, è avirulento, non produce tumori e non produce autonomamente OOHl (molecola che media la risposta di tipo “quorum sensing” nella specie). È invece dotato di un plasmide (pCF218) che esprime il fattore di trascrizione TraR (risposta alla presenza di AHL) e di un secondo plasmide (pCF372), recante il promotore del fattore di trascrizione (*traI-lacZ*).

I due plasmidi che determinano la risposta agli AHL portano dei fattori di resistenza alla tetraciclina ed alla spectinomomicina in modo da venire trasmessi alle generazioni successive.

A. tumefaciens WCF 47 risulta sensibile ad AHL con catene aciliche di lunghezza variabile da 6 a 14 atomi di carbonio (Zhu *et al.*, 1998).

Tra tutti i biosensori utilizzati in studi analoghi su altre specie batteriche, la scelta è caduta sulla combinazione dei due ceppi precedentemente descritti, in quanto questa permetteva di saggiare la presenza di una gamma molto ampia di lattoni dell'omoserina con una buona sensibilità.

Come controllo positivo è stato utilizzato un ceppo virulento di *A. tumefaciens* (DAPP-PG-252) proveniente dalla batterioteca del Dipartimento Protezione Pianta dell'Università degli Studi di Perugia.

2.2 TERRENI DI COLTURA UTILIZZATI

Per la conservazione dei batteri nel lungo periodo, essi sono stati incubati per una notte in **LB** (brodo nutritivo Luria-Bertani) (par II.1.) e conservati a -80°C nello stesso brodo nutritivo arricchito di glicerolo (15%) come criopreservante.

Per la crescita su substrato solido sono stati utilizzati, **ANS** e **LB agar**.

Per le prove di verifica della produzione di lattoni dell'omoserina sono stati utilizzati **ABM**, **ABG**, **LB** brodo nutritivo, **LB agar**, quest'ultimo in due concentrazioni agar/acqua: 1,8% agar per i ceppi oggetto del saggio, 0,5% agar per i bioindicatori.

AB minimal medium

K ₂ HPO ₄	3	g
NaH ₂ PO ₄	1	g
NH ₄ Cl	1	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,3	g
KCl	0,15	g
CaCl ₂	0,01	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,0025	g
Acqua distillata	1000	ml

ABM e ABG sono stati ottenuti supplementando l'AB minimal medium (Chilton *et al.*, 1974) con 5 g/l di glucosio o mannitolo.

Tutti i substrati utilizzati per la coltura di *A. tumefaciens* WCF 47 (pCF218) (pCF372) sono stati supplementati di 50 µg/ml di spectinomycin e 4,5 µg/ml di tetraciclina per conservare nelle diverse sottocolture i due plasmidi che determinano la reazione positiva alla presenza di AHL.

2.3 PROVE PRELIMINARI

È stata eseguita una serie di prove preliminari atte a stabilire quale fosse il substrato nutritivo idoneo all'esecuzione delle prove e quale fosse il punto della fase di crescita in cui veniva massimizzata la produzione di lattoni dell'omoserina (se presenti e rilevabili).

Per la determinazione del terreno nutritivo agarizzato da utilizzare per i saggi su piastra sono stati utilizzati: LB agar, ABM e ABG.

Per la determinazione della curva di crescita di *P. avellanae* si è proceduto nel modo seguente:

Per ogni isolato batterico è stata effettuata una sottocoltura su LB agar, da cui dopo 48 ore di incubazione, alla temperatura di 26°C ne è stata ricavata una seconda. Dopo un periodo di incubazione di 24 ore è stata prelevata con un'ansa sterile una aliquota di patina batterica, che è stata utilizzata per inoculare un tubo contenente 5 ml di brodo LB. Il tubo è stato quindi posto per 24 ore in agitazione in agitatore orbitale a 100 giri/minuto alla temperatura di 26°C. Allo scadere del periodo di incubazione 5 µl della sospensione ottenuta sono stati utilizzati per inoculare un secondo tubo contenente 5 ml di brodo di LB che è stato posto in agitazione nelle stesse condizioni del precedente. Dopo 24 ore, 250 µl della sospensione batterica ottenuta sono stati utilizzati per inoculare 250 ml di brodo di LB.

Le beute quindi sono state messe in agitazione a 150 giri/minuto a 26°C. Al momento dell'inoculazione e dopo 3, 6, 12, 24 e 72 ore sono stati effettuati dei prelievi che, dopo una serie di diluizioni decimali, sono stati piastrati. Le piastre sono state incubate a 26°C per 48 ore, dopodiché è stato eseguito il conteggio delle colonie sviluppate. I dati sono stati utilizzati per la determinazione della curva di crescita.

2.4 SAGGIO PER LA VERIFICA DELLA PRODUZIONE DI LATTONI DELL'OMOSERINA

Per la prova che prevedeva l'utilizzo di *Chromobacterium violaceum* CV026 gli organismi oggetto di saggio sono stati strisciati al centro di una piastra Petri contenente LB agar come substrato nutritivo, e incubati per 24 ore a 27°C. Dopo questo periodo di crescita, 5ml di LB agar soffic (0,5% agar), contenente 5 µl di una sospensione dell'indicatore biologico cresciuto per una notte in brodo nutritivo (LB), sono stati versati nella piastra e reincubati per una notte alla stessa temperatura.

Il risultato positivo è determinato da una colorazione porpora del terreno di coltura nei dintorni delle specie saggate, dovuta alla produzione di violaceina innescata nel bioindicatore dalla presenza di idonee AHL (McClellan *et al.*, 1997).

Come controllo positivo è stato utilizzato il ceppo di *Pseudomonas corrugata* NCPPB 2445.

A causa dello sviluppo molto lento di *P. avellanae* su LB, era possibile che la crescita batterica non avesse raggiunto la fase stazionaria al momento dell'aggiunta del bioindicatore, la prova è stata quindi ripetuta variando il primo periodo di incubazione a 48 e 72 ore.

Come controllo negativo è stato utilizzato lo stesso bioindicatore.

Per la prova che prevedeva l'utilizzo di *Agrobacterium tumefaciens* WCF 47, la metodologia applicata è stata identica alla precedente con le seguenti modifiche: ai substrati utilizzati per la crescita del bioindicatori sono stati aggiunti 50 µg/ml di spectinomicina e 4,5 µg/ml di tetraciclina per il mantenimento dei plasmidi che determinano la reazione positiva alla presenza di AHL. Dopo il secondo periodo di incubazione sono stati distribuiti 50 µl per piastra di una soluzione di X-Gal (20 mg/ml in dimetilformammide).

L'aggiunta dell'X-Gal al termine dell'incubazione rispetto alla sua incorporazione nel terreno di coltura (procedura seguita dalla maggior parte degli autori) incrementa la sensibilità del saggio (McLean *et al.*, 2004).

Il risultato positivo è determinato da una colorazione bluastra del terreno di coltura attorno alle specie saggiate, dovuta all'idrolisi dell'X-gal in seguito alla presenza di idonee AHL (Fuqua e Winans 1996).

Come controllo positivo è stato utilizzato un ceppo virulento di *Agrobacterium tumefaciens* (DAPP-PG-252).

Come controllo negativo è stato utilizzato lo stesso bioindicatore.

3. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI DIVERSI FORMULATI RAMEICI NEL CONTENIMENTO DELLA MORIA DEL NOCCIOLO

3.1 CARATTERISTICHE DEI NOCCIOLETI

Per l'esecuzione delle prove *in vivo* sono stati selezionati, come sede delle prove, tre noccioleti in cui era già segnalata la moria, situati nell'areale dove si è registrata la maggiore incidenza della malattia. Due situati in località Vico Matrino, comune di Capranica, ed il terzo all'interno della caldera del lago di Vico nel comune di Caprarola. Uno dei noccioleti in località Vico Matrino è condotto in regime irriguo. In tutti i tre siti la cultivar utilizzata è la Tonda Gentile Romana. Nei due siti di Vico Matrino è utilizzato come impollinatore il 'Nocchione', in quello situato nella caldera del lago di Vico sono state impiantate alcune piante della cultivar Tonda di Giffoni. Nei noccioleti, fatta eccezione per la moria che negli anni precedenti è stata causa dell'espianto di un alto numero di noccioli, non sono stati riscontrati altri problemi fitosanitari di rilievo.

In ogni noccioleto sono state ricavate cinque parcelle, contenenti ciascuna circa 40 piante.

Preliminarmente sono state effettuate analisi del suolo per verificare le condizioni chimico-fisiche del terreno.

3.2 PRODOTTI CHIMICI UTILIZZATI

I prodotti fitosanitari utilizzati per il contenimento della malattia sono: un prodotto a base di solfato tribasico di rame (15% rame metallo), un peptidato di rame da idrossido (7% rame metallo), un peptidato di rame da solfato (5% rame metallo) ed un solfato tribasico di rame con contenuto di rame metallo pari al 24%.

3.3 TRATTAMENTI

Le prove sono state effettuate per tre anni consecutivi, nel noccioleto situato nel comune di Capranica, per due anni nel noccioleto situato nel Lago di Vico.

Ricapitolando, in ciascun sito erano presenti: **(a)** una parcella non trattata con alcun prodotto per il contenimento della moria; **(b)** una parcella trattata con il solfato tribasico di rame a concentrazione di rame metallo inferiore (15%); **(c)** Una parcella trattata con il peptidato di rame da idrossido; **(d)** Una parcella trattata con il peptidato di rame da solfato; **(e)** Una parcella trattata con il solfato tribasico a maggior concentrazione di rame metallo.

Le quantità distribuite e il numero di interventi annui sono riportati in tabella VIII.

Tab VIII: Trattamenti effettuati e dosi distribuite

Tesi a (2003-2005)	Non trattata
Tesi b (2003-2005)	Solfato tribasico di rame (15 %) 250ml/100 l H ₂ O + 1 tratt. (Nov)
Tesi c (2003)	Peptidato di rame da idrossido (7%) 300ml/100 l H ₂ O 3 tratt. (Apr-Giu) + 1 tratt. (Nov)
Tesi c (2004-2005)	Peptidato di rame da idrossido (7%) 300ml/100 l H ₂ O 4 tratt. (Apr-Giu) + 1 tratt. (Nov)
Tesi d (2003)	Peptidato di rame da solfato (5%) 400ml/100 l H ₂ O 3 tratt. (Apr-Giu) + 1 tratt. (Nov)
Tesi d (2004-2005)	Peptidato di rame da solfato (5%) 400ml/100 l H ₂ O 4 tratt. (Apr-Giu) + 1 tratt. (Nov)
Tesi e (2003)	Solfato tribasico di rame (24%) 200ml/100 l H ₂ O 3 tratt. (Apr-Giu) + 1 tratt. (nov)
Tesi e (2004-2005)	Solfato tribasico di rame (24%) 200ml/100 l H ₂ O 4 tratt. (Apr-Giu) + 1 tratt. (Nov)

3.4 VERIFICA DELL'INCIDENZA DELLA MALATTIA E TRATTAMENTO STATISTICO DEI DATI

Nel corso della stagione vegetativa, ogni dieci giorni, sono stati eseguiti rilievi visivi e fotografici delle piante di nocciolo che presentavano sintomi di moria.

Al comparire del primo sintomo (viraggio del colore delle foglie verso un verde più pallido) le piante venivano segnalate. Nei sopralluoghi successivi, se il quadro sintomatologico evolveva nel modo tipico della moria, la data del primo rilievo veniva confermata.

Per il trattamento statistico dei dati ottenuti, sono state utilizzate tabelle di contingenza. In particolare, tenuto conto della numerosità dei campioni e del fatto che, viste le caratteristiche della malattia, l'unità statistica da considerare non poteva non essere l'intera pianta, è stato applicato il test di Fisher. L'intervallo di confidenza è stato fissato al 95%.

Per ogni anno, in ogni singola parcella dei singoli siti, è stata analizzata la variazione delle piante malate rispetto a quelle sane.

Variazioni significative sono quindi attese in caso di notevole aggravamento del quadro sanitario

III) RISULTATI

1 INDAGINI SULL'EZIOLOGIA DELLA MALATTIA

1.1 ISOLAMENTI

Nel corso di tutto il periodo di studio sono stati prelevati campioni sintomatici su cui sono stati eseguiti degli isolamenti dell'agente eziologico.

I numerosi ceppi batterici ottenuti sono stati sottoposti ad una serie di analisi preliminari di tipo morfologico, colturale, fisiologico e biochimico.

I risultati di queste analisi li hanno ricondotti tutti ai generi e alle specie degli altri ceppi, provenienti da isolamenti precedenti, conservati nella batterioteca del Dipartimento Protezione delle Piante.

È stato quindi deciso di utilizzare questi ultimi per l'esecuzione delle prove.

1.2 CARATTERIZZAZIONE

1.2.1 Aggiornamento del database

Al fine di rendere possibile l'identificazione di *P. avellanae* mediante l'utilizzo del sistema BIOLOG™ è stato creato un database utente attraverso l'inserimento dei profili nutrizionali, replicati per tre volte, di 13 ceppi noti (punto di utilizzazione finale) riportati in tabella I.

Il quadro di utilizzazione registrato nelle condizioni sperimentali adottate è stato il seguente: sono stati utilizzati nella totalità dei casi, saccarosio, acido succinico, acido bromosuccinico; nel 92 % dei casi è stata rilevata l'utilizzazione di, D-fruttosio, D-mannosio ed estere metilico dell'acido piruvico; Ad essere utilizzati nell'83% dei casi sono stati, L-arabinosio, acido succinamico e γ acido aminobutirrico; nel 75% dei casi è stata registrata l'utilizzazione di Tween 40, D-raffiniosio, glicerolo; Nel 67 % delle letture risultava positivo il test del D-mannitolo; nel 54 % dei casi è stato invece utilizzato acido α ketoglutarico.

Con percentuali inferiori al 50% è stata rilevata l'utilizzazione di: D-psicosio (38%); Acido citrico (33%); Twen 80, D-arabitol, lattone dell'acido D-galattico, acido malonico, acido quinic, L-alanina, L-alanil glicina, L-serina (25%); L-alaninamide e uridina (21%); eritritolo, acido D-glicil glutammico, acido cis aconitico (17%); D-galattosio, D-alanina (12%); acido acetico (8%).

Gli altri substrati presenti nelle piastre (Fig. 2) non sono state utilizzate in nessun caso.

Per verificare la funzionalità del nuovo database alcuni ceppi noti di *P. avellanae* (NCPBP 3847 e BPic 636) non utilizzati per l'implementazione della banca dati, ed alcuni isolati locali (153, 7 B, 8 B) identificati come *P. avellanae* mediante il confronto del profilo degli acidi grassi, e dell'analisi del ribosoma 16S (Proietti Zolla, 2005) sono stati utilizzati per la determinazione del profilo nutrizionale e confronto col profilo nutrizionale di *P. avellanae*. In tutti i casi l'identificazione è stata corretta con alto grado di similarità.

1.2.2 Prove preliminari

Tra gli isolati provenienti da isolamenti da materiale sintomatico, effettuati nel 2002 e non ancora identificati sono stati selezionati quelli gram-negativi, su cui è stata verificata: l'eventuale produzione di capsula di levano su ANS, la fluorescenza su terreno B di King e la presenza dell'enzima citocromo-ossidasi. Gli isolati risultati ossidasi-negativi sono stati inoculati su TSI agar (par. II.4.2). I risultati ottenuti sono riportati in Tabella IX.

Tabella IX: Risultati delle prove preliminari

Isolato	Formazione capsula di levano	Fluor	Gram	Ox	TSI
44 RV	+	+	-	-	NV/NV
46 RV	+	-	-	-	NV/NV
52 RV	+	+	-	-	NV/NV
54 RV	+	+	-	-	K/K
75 RV	+	-	-	-	NV/NV
17 TN	-	-	-	-	K/K
19 TN	-	-	-	-	K/K
5 TC	+	+	-	-	K/K
20 RC	-	-	-	-	NV/NV
22 RC	-	-	-	-	NV/NV
30 RN	-	-	-	-	K/A
31 RN	+	-	-	-	NV/NV
32 RN	+	-	-	-	K/K

1.2.3 Identificazione

È stato quindi determinato il profilo nutrizionale secondo la procedura descritta nel paragrafo II.4.3. e comparato col database del sistema Microlog™ System 4.2.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

44 RV: Specie identificata; *Pseudomonas syringae* il profilo della pv *syringae* risulta essere il più vicino.

46 RV: Specie e varietà patologica identificate; *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*.

52 RV: Specie e varietà patologica identificate; *Pseudomonas syringae* pv *syringae*.

54 RV: Specie e varietà patologica identificate; *Pseudomonas syringae* pv *syringae*.

75 RV: La piastra presentava un numero eccessivo di fonti “Border line” (pozzetti colorati ma che non avevano raggiunto la soglia di positività) facendo considerare manualmente i più vicini alla soglia come positivi, l’identificazione ottenuta è stata *Pseudomonas avellanae*.

17 TN: Specie e varietà patologica identificate: *Xanthomonas campestris* pv *Phaseoli*.

19 TN: Genere identificato *Xanthomonas*, la specie *X. campestris* pv *dieffenbachiae* risulta essere la più vicina.

5 TC: Specie identificata; *Pseudomonas syringae*, il profilo della pv *tabaci* risulta essere il più vicino.

20 RC: Genere identificato *Xanthomonas*.

22 RC: Specie e varietà patologica identificate *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

30 RN: Enterobatteriacea, specie identificata *Pantoea agglomerans*.

31 RN: Specie e varietà patologica identificate *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

32 RN: Genere identificato *Pseudomonas*.

C'è da rilevare che nel database del programma Microlog™ System 4.2. non è presente il profilo nutrizionale di *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* e non è stato possibile inserire il profilo della specie nel database utente, in quanto non era disponibile un numero sufficiente di ceppi noti, in modo da garantire un'identificazione corretta.

Va infine detto che in altre prove svolte in sede, isolati precedentemente identificati con altri metodi come *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* sono stati successivamente identificati dal Biolog™ come *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, non è quindi da escludere che tali isolati siano da associare all'agente di batteriosi del nocciolo.

1.3 COMPARAZIONE DEI PROFILI NUTRIZIONALI

I profili metabolici ottenuti per ogni isolato replicati per tre volte sono stati confrontati per verificare il grado di diversità intraspecifico.

Per quanto riguarda *Pseudomonas avellanae* l'analisi di tipo UPGMA eseguita ha evidenziato notevoli differenze, tali da separare i profili nutrizionali degli isolati saggiati in sei differenti cluster (Fig. 6). Il profilo metabolico dei ceppi analizzati si differenzia notevolmente da quello di *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* specie filogeneticamente affine utilizzata nella prova come riferimento esterno.

Differenze sono state riscontrate anche nel confronto dei profili ottenuti dai diversi ceppi batterici appartenenti alla famiglia delle enterobatteriacee ed isolati frequentemente da materiale sintomatico.

Questi però sono risultati molto simili ai profili di *Brenneria rubrifabians*, *Brenneria nigrifluens* ed *Erwinia amylovora* (Fig. 7), specie batteriche associate dalla denominazione “gruppo *amylovora*” fino a qualche anno addietro.

A questo gruppo è stato associato un batterio che, inoculato aveva riprodotto il quadro sintomatologico tipico della moria (Varvaro, 1994).

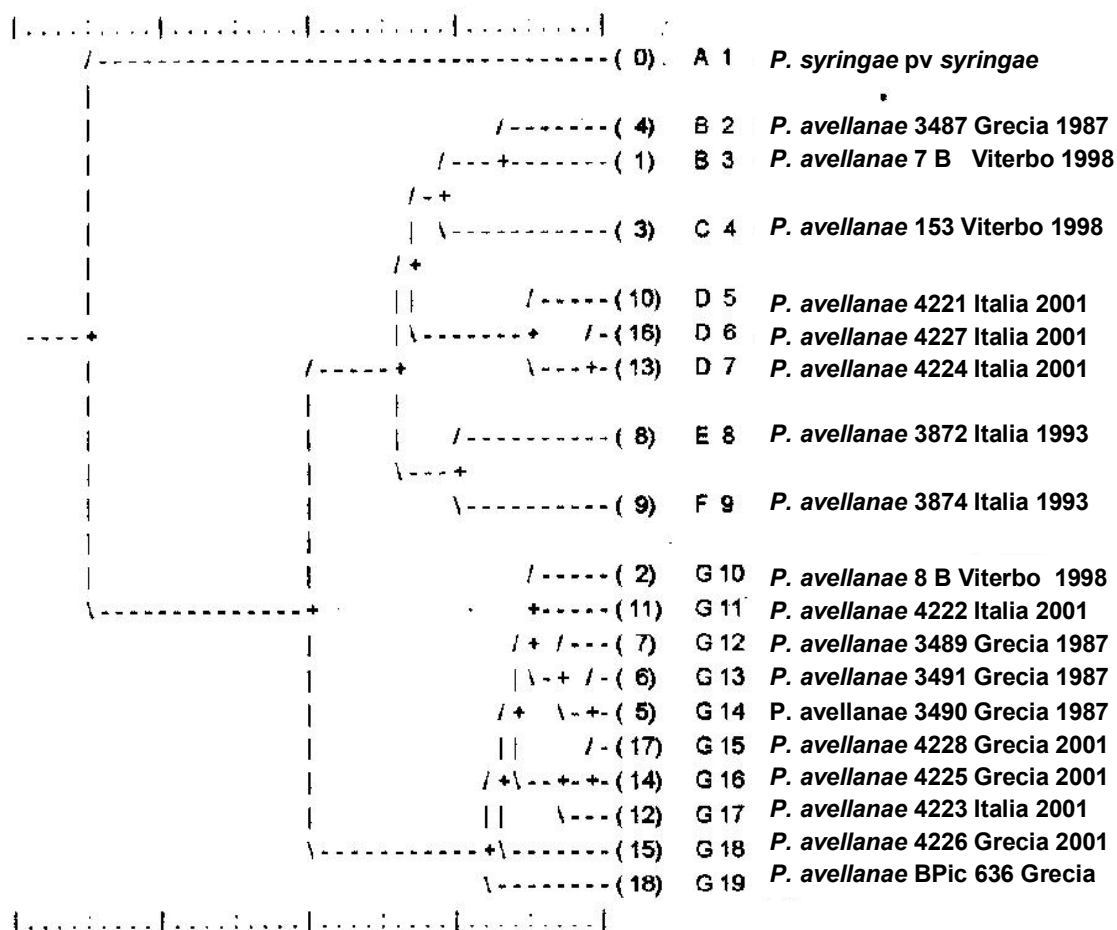


Figura 6: Dendrogramma basato sulla capacità di ossidazione di 95 differenti fonti di carbonio di ceppi di *Pseudomonas avellanae*. L'elaborazione è stata condotta analizzando, replicati tre volte, i profili ottenuti da 18 ceppi noti isolati localmente o provenienti da collezioni internazionali (NCPPB). I profili sono stati comparati con quello di un ceppo locale di *P. syringae* pv *syringae*.

L'analisi, di tipo UPGMA, è stata eseguita con il programma Microlog™ 4.2. Distanza di riferimento = 10

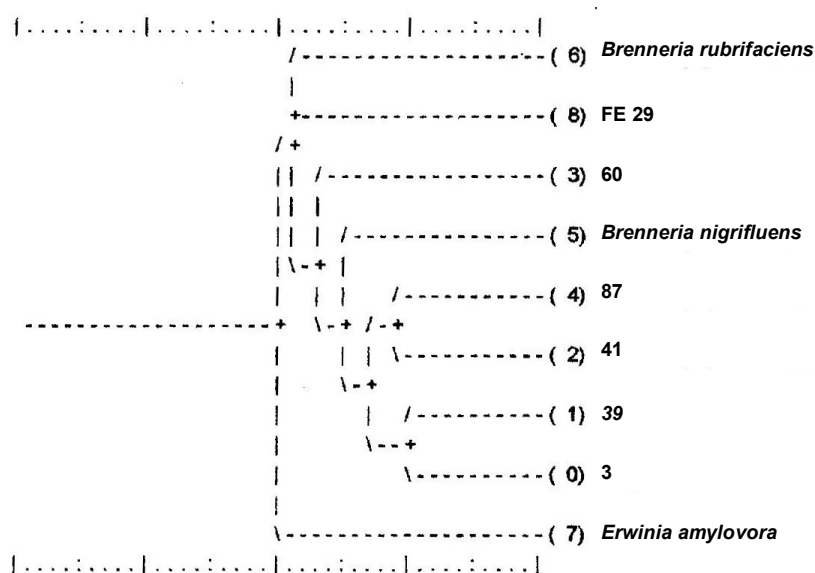


Figura 7: Dendrogramma basato sulla capacità di ossidazione di 95 differenti fonti di carbonio di ceppi di enterobattariacee frequentemente isolati da materiale sintomatico di nocciolo. L'elaborazione è stata condotta analizzando, replicati tre volte, i profili ottenuti da 6 ceppi noti isolati localmente o provenienti da collezioni internazionali (NCPBPB). I profili sono stati comparati con quello di un ceppo locale di *P. syringae* pv *syringae*. L'analisi, di tipo UPGMA, è stata eseguita con il programma Microlog™ 4.2. Distanza di riferimento = 10

1.4 PROVE DI PATOGENICITÀ

Nella serie di inoculi effettuata nel 2003 non vi è stata alcuna manifestazione di sintomi, per nessuna delle due tecniche di inoculazione adottata, sia nei ceppi provenienti da isolamenti recenti, sia in quelli provenienti da isolamenti precedenti (par. II.2.). Nessuna manifestazione di sintomi è stata rilevata sulle piantine inoculate con il ceppo di controllo.

Stesso risultato è stato ottenuto l'anno successivo nelle inoculazioni effettuate questa volta in primavera, indipendentemente dal tipo di batteri inoculato e dalle condizioni esterne.

Negli ultimi giorni del mese di luglio, nonostante la mancanza di sintomi, sono stati effettuati dei reisolamenti sulle piantine inoculate con i ceppi NCPBPB 3487, NCPBPB 3872 e BPiC 636. Gli isolamenti sono stati effettuati, dopo sterilizzazione della parte esterna, nella zona cambiale nei pressi dei punti di

inoculazione. In tutti i casi sono state isolate colonie batteriche con caratteristiche analoghe a quelle dei batteri inoculati.

Le piantine inoculate con gli stessi batteri, collocate in serra, sono state mantenute fino alla primavera successiva senza che manifestassero nessun sintomo.

L'ultima serie di inoculazioni è stata effettuata nel dicembre 2004.

Anche in questo caso le piantine non hanno manifestato sintomi durante tutto l'arco dell'anno successivo. Negli ultimi giorni del mese di marzo alcune piantine hanno presentato estesi disseccamenti della chioma (Fig. 8), tuttavia dai reisolamenti effettuati non è stata isolata alcuna specie batterica. Non è stato quindi possibile associare i sintomi osservati, con i ceppi batterici inoculati.



Figura 8: Sintomi rilevati una delle piante inoculate nel 2005 (*P. avellanae* 8B).

2. VERIFICA DELLA PRODUZIONE DI LATTONI DELL'OMOSERINA

2.1 PROVE PRELIMINARI

La prima prova consisteva nella verifica della crescita di *P. avellanae* su terreni minimi o che erano già stati utilizzati con successo in prove analoghe su altre specie batteriche.

Tuttavia in tutti i terreni di coltura utilizzati, fatta eccezione per l'LB, è stata rilevata, per tutti gli isolati saggiati, una crescita molto stentata o addirittura assente. Essendo ampiamente riportato in bibliografia che la fase di crescita idonea alla rilevazione *in vitro* della produzione di autoinduttori del "Quorum sensing", è il periodo che intercorre tra la fine della fase di crescita esponenziale ed il primo periodo di quella stazionaria, si è ritenuto opportuno proseguire le prove, utilizzando l'LB come substrato nutritivo.

È stata quindi determinata la curva di crescita media degli isolati saggiati (Fig. 9). Al momento dell'inoculazione il brodo conteneva mediamente $3,1 \times 10^4$ unità formanti colonie (u.f.c.)/millilitro di brodo, a 12 ore è stata rilevata una concentrazione di $6,1 \times 10^6$ u.f.c./ml, il picco massimo è stato raggiunto intorno alla 48^a ora di incubazione ($9,4 \times 10^8$) dopodiché il valore è rimasto costante.

2.2 SAGGIO PER LA VERIFICA DELLA PRODUZIONE DI LATTONI DELL'OMOSERINA

Il saggio che prevedeva l'utilizzo di *Chromobacterium violaceum* CV026 per la verifica della produzione di BHL o HHL da parte di *Pseudomonas avellanae* ha fornito i seguenti risultati:

In tutte le prove in cui erano stati utilizzati ceppi di *Pseudomonas avellanae* e nel controllo negativo non è stata rilevata alcuna variazione di colore nei diversi tempi di incubazione. Nel controllo positivo si è invece verificata in ogni caso la colorazione porpora in seguito alla produzione di violaceina da parte dell'indicatore biologico utilizzato fig 10.

Il saggio che prevedeva l'utilizzo di *Agrobacterium tumefaciens* WCF 47 ha invece fornito i seguenti risultati:

Il risultato positivo prevedeva la colorazione di blu del terreno di coltura dovuta all'idrolisi del X-Gal, causata dall'attività β -galattosidasica innescata dalla presenza di N-AHL idonee.

Nella prova che prevedeva il periodo di incubazione più breve è stata registrata una variazione di colore molto blanda nella maggior parte degli isolati, più accentuata nel controllo positivo, assente in quello negativo.

Nelle prove in cui sono stati impiegati tempi di incubazione superiori, vi è stata reazione positiva da parte di tutti gli isolati saggiati, paragonabile a quella del controllo positivo. Non si è verificata invece alcuna variazione di colore nel controllo negativo Fig 11.

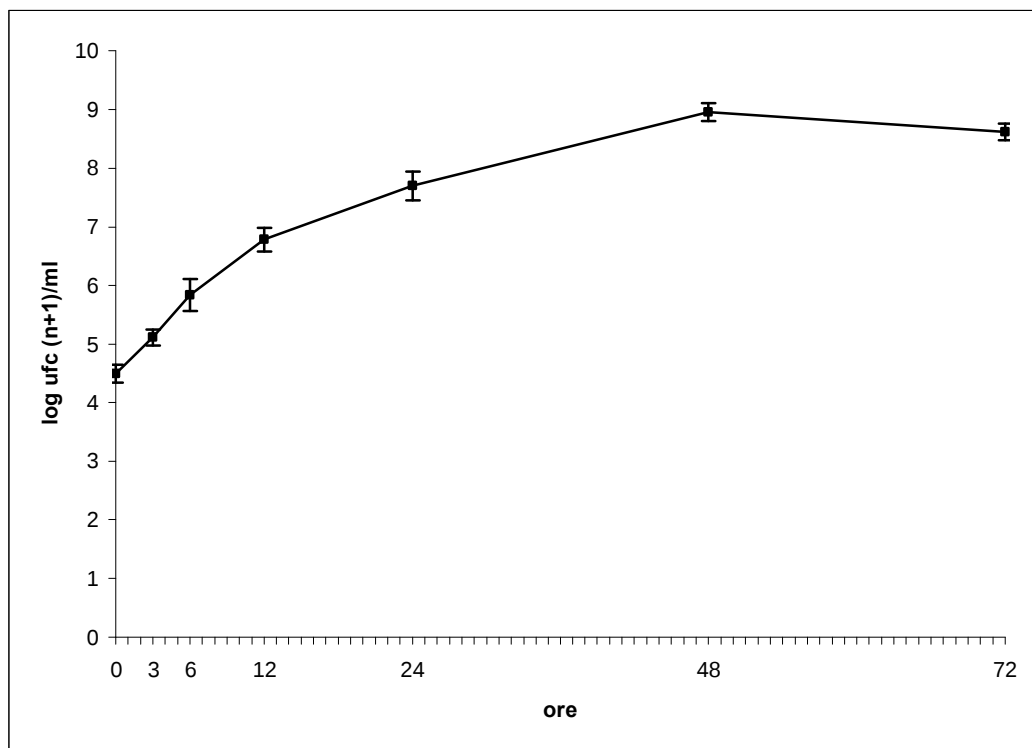


Figura 9: Crescita media degli isolati di *P. avellanae* utilizzati per la prova, le barre indicano l'errore standard.

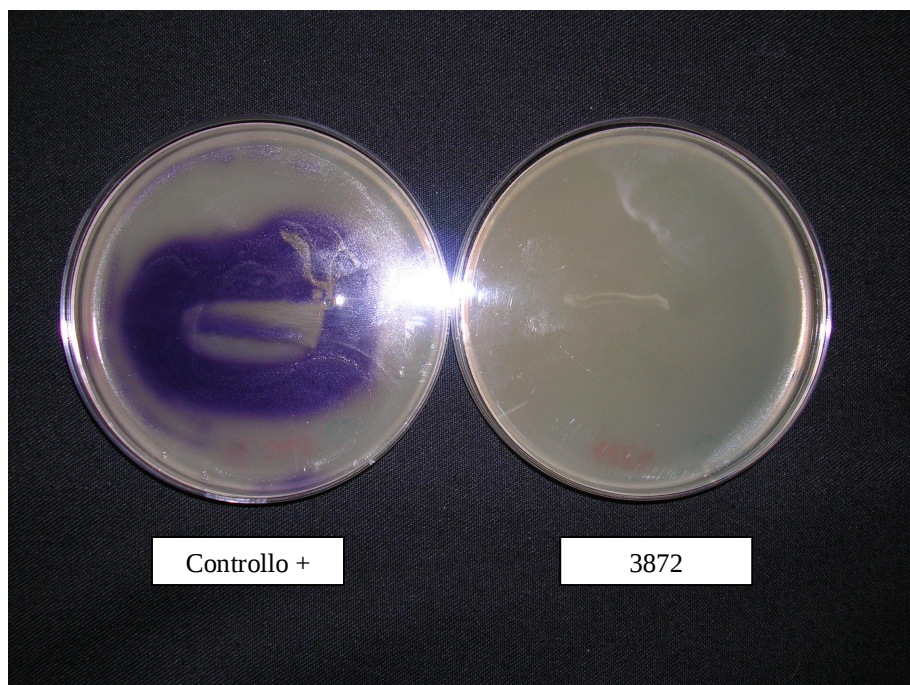


Figura 10: Risultati della prova di verifica della produzione di lattoni dell'omoserina mediante l'utilizzo di *Chromobacterium violaceum* CV026.

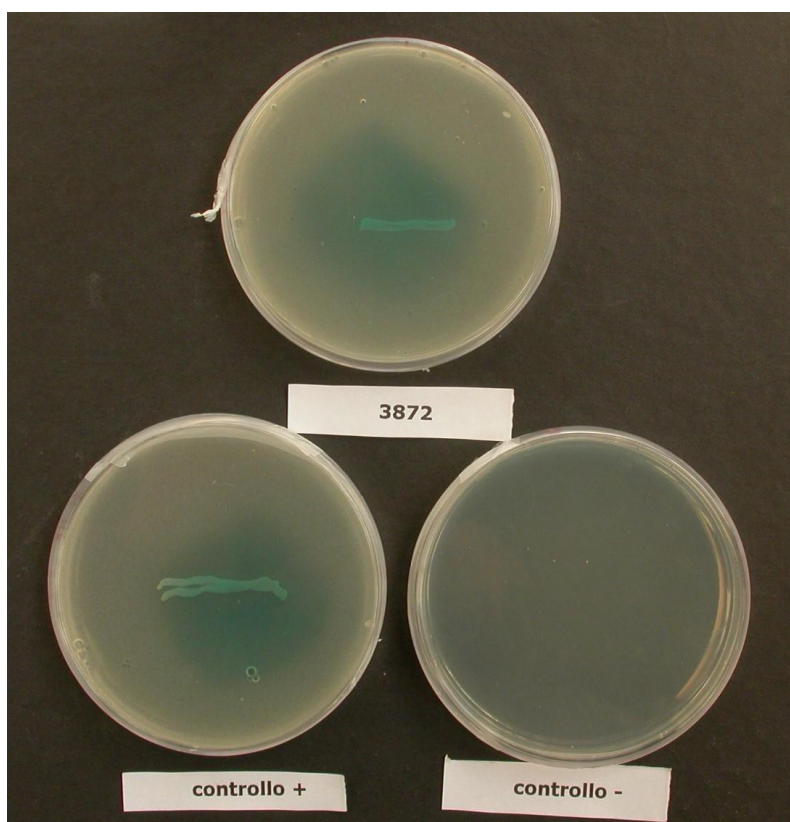


Figura 11: Risultati della prova di verifica della produzione di lattoni dell'omoserina mediante l'utilizzo di *Agrobacterium tumefaciens* WCF 47.

3. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI DIVERSI FORMULATI RAMEICI NEL CONTENIMENTO DELLA MORIA DEL NOCCIOLO

3.1 VERIFICA DELL'INCIDENZA DELLA MALATTIA E TRATTAMENTO STATISTICO DEI DATI

Il quadro della condizione chimico-fisica del terreno all'inizio delle prove è riportato in tabella X.

Tab. X: Risultati delle analisi chimico-fisiche del terreno.

Siti sp. Parametri	Caprarola	Vico M. non irriguo	Vico M. irriguo
Tessitura	SF	F	FS
Sabbia (%)	76	55	60
Limo (%)	9	24	21
Argilla (%)	15	21	19
EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	296,5	261,7	354,5
pH	4,17	3,95	4,12
Calcare tot. (%)	assente	assente	assente
Carb.org. (%)	1,36	0,84	0,59
Sost.org. (%)	2,34	1,44	1,01
N totale (‰)	0,94	0,43	0,32
P ₂ O ₅ ass. (mg/Kg)	19,34	26,1	21,2
K ₂ O sc. (mg/Kg)	277,74	239,04	400,31
CaO ass. (mg/Kg)	869,75	563,86	883,35
MgO ass. (mg/Kg)	81,78	72,08	68,04
Fe ass. (mg/Kg)	7,01	6,68	7,11
B ass. (mg/Kg)	1,08	0,99	0,98
C.S.C. (meq/100g)	17,29	19,51	20,73

Nel corso dei sopralluoghi effettuati per il reperimento dei dati, nei nocciuoli non sono state rilevate altre patologie ad eziologia batterica o fungina, fatta eccezione per un numero molto limitato di piante, nel sito di Vico Matrino non irrigato, che hanno manifestato sintomi di mal dello stacco (agente eziologico il fungo *Cytospora corylicola*).

Il quadro riguardante i problemi di natura entomologica è analogo. Non è stata rilevata in alcun sito una presenza significativa dei principali parassiti della coltura (balanino e cimici). Nel sito del lago di Vico è stata osservata la presenza della falena brumale (*Operophthera brumata* L.) e dell'afide crema (*Myzocallis coryli*) ma mai in misura tale da giustificare dei trattamenti fitosanitari.

Alla data dell'inizio delle prove le piante che avevano manifestato sintomi di moria negli anni precedenti erano state potate o estirpate, nessuna pianta manifestava quindi sintomi di malattia.

Nel corso del primo anno (2003) la situazione rilevata nel noccioleto situato nella caldera del Lago di Vico è stata la seguente:

Nella parcella di controllo si è registrato un incremento delle piante malate nel mese di giugno. Il numero di piante malate è invece rimasto contenuto nelle due parcelle trattate con i due tipi di solfato tribasico di rame (tra cui quella con il piano di fertilizzazione modificato) ed in quella trattata con il peptidato di rame da idrossido. Risultati diversi sono stati registrati nella parcella trattata con il peptidato di rame da solfato dove il numero delle piante colpite dalla malattia è stato superiore a quello riscontrato nella parcella di controllo. Il quadro completo è riportato nella tabella XI.

La situazione rilevata nel noccioleto situato in località Vico Matrino non irrigato è stata la seguente:

Nella parcella di controllo sono stati rilevati sintomi di moria su una sola pianta nel mese di maggio. Il numero di piante colpite nelle altre parcelle è stato in ogni caso superiore. Il quadro completo è riportato nella tabella XII.

La situazione rilevata nel noccioleto situato in località Vico Matrino provvisto di impianto di irrigazione è stata la seguente:

Il numero di piante malate è stato simile nella parcella di controllo, in quella trattata con il solfato tribasico a minor concentrazione di rame metallo (e con piano di fertilizzazione differente) ed in quella trattata con il peptidato di rame da solfato, più alto nella tesi trattata con il solfato tribasico a maggior concentrazione di rame, molto alta nella parcella trattata con il peptidato di rame da idrossido. Il quadro completo è riportato nella tabella XIII.

Nel corso della stagione vegetativa 2004, nei diversi siti sono stati rilevati i seguenti dati.

La situazione rilevata nel noccioleto situato nella caldera del Lago di Vico è stata la seguente:

La parcella trattata con il peptidato di rame da solfato è stata quella dove si è rilevato il maggior numero di piante ammalate, seguita da quella di controllo e quella trattata con il solfato tribasico a maggior concentrazione rameica. L'incidenza è stata minore nella parcella trattata con il peptidato di rame da idrossido, quasi nulla nella parcella con il piano di fertilizzazione modificato. Il quadro completo è riportato nella tabella XIV.

La situazione rilevata nel noccioleto situato in località Vico Matrino non irrigato è stata la seguente:

Il maggior numero di piante ammalate è stato registrato nella parcella trattata con solfato tribasico di rame con piano di fertilizzazione modificato, seguita da quella trattata con il peptidato di rame da idrossido e nella parcella trattata con peptidato di rame da solfato, nelle rimanenti tesi non è stata individuata alcuna pianta con sintomi evidenti. Il quadro completo è riportato nella tabella XV.

La situazione rilevata nel noccioleto situato in località Vico Matrino provvisto di impianto di irrigazione è stata la seguente:

Il maggior numero di piante malate è stato riscontrato nella parcella trattata con il peptidato di rame da solfato, una situazione intermedia si è verificata nelle parcelle trattate con peptidato di rame da idrossido, solfato tribasico di rame a concentrazione inferiore e protocollo nutrizionale differente e nella parcella di controllo. Nella parcella trattata con il solfato tribasico di rame più concentrato l'incidenza è stata quasi nulla. Il quadro completo è riportato nella tabella XVI.

Nel corso dell'ultima stagione di trattamenti le prove sono state effettuate nei due siti di Vico Matrino. In entrambi i casi il maggior numero di piante ammalate è stato rilevato nelle parcelle non trattate. Il numero delle piante malate nelle altre parcelle è invece rimasto, in ogni caso, contenuto. Il quadro completo è riportato nelle tabelle XVII e XVIII.

Analizzando la situazione nel complesso si nota che nel corso delle prime due stagioni (Fig. 12 e Fig. 13) di trattamenti l'incidenza percentuale della malattia

non è stata in tutti i casi differente, tra le parcelle non trattate e quelle trattate con i diversi formulati rameici. L'effetto di contenimento esercitato dal rame, sul potenziale inoculo batterico, si è espresso pienamente al terzo anno (Fig. 14) dove in entrambi i siti trattati si è avuto un significativo incremento delle piante morte nelle parcelle di controllo, mentre nelle parcelle trattate l'incremento è stato in ogni caso non significativo.

Tab. XI: Pianta affette da moria nel nocciuolo di Caprarola (Lago di Vico) nel 2003

	20-4	20-5	04-6	20-6	14-7	05-8	20-8	significatività
Controllo	0	1	2	4	4	4	4	P> 0,05 ns
Solf. Tribasico 15%	0	0	1	1	1	1	1	P> 0,05 ns
Peptidato di rame da idrossido	0	0	0	0	0	0	0	nv
Peptidato di rame da solfato	0	0	1	5	6	6	6	* 0,0226
Solf. Tribasico 24 %	0	1	1	1	1	1	2	P> 0,05 ns

Tab. XII: Pianta affette da moria nel nocciuolo di Vico Matrino non irriguo nel 2003

	20-4	20-5	04-6	20-6	14-7	05-8	20-8	significatività
Controllo	0	1	1	1	1	1	1	P> 0,05 ns
Solf. Tribasico 15%	0	3	3	5	6	6	6	* 0,226
Peptidato di rame da idrossido	0	1	2	3	3	3	3	P> 0,05 ns
Peptidato di rame da solfato	0	1	2	5	5	5	5	P> 0,05 ns
Solf. Tribasico 24 %	0	2	5	5	5	5	5	P> 0,05 ns

Tab. XIII: Pianta affette da moria nel nocciuolo di Vico Matrino irriguo nel 2003

	20-4	5-5	20-5	04-6	20-6	14-7	20-8	significatività
Controllo	0	0	0	1	2	3	3	P> 0,05 ns
Solf. Tribasico 15%	0	0	2	2	3	3	4	P> 0,05 ns
Peptidato di rame da idrossido	0	2	6	7	11	11	13	*** 0,004
Peptidato di rame da solfato	0	0	0	2	3	3	3	P> 0,05 ns
Solf. Tribasico 24 %	0	1	1	2	4	6	6	P> 0,05 ns

Tab. XIV: Piante affette da moria nel nocciolo di Caprarola (Lago di Vico) nel 2004

	18-4	20-5	11-6	25-6	21-7	06-8	30-8	significatività
Controllo	0	1	1	1	2	3	3	P> 0,05 ns
Solf. Tribasico 15%	0	0	0	0	1	1	1	P> 0,05 ns
Peptidato di rame da idrossido	0	0	0	0	0	1	2	P> 0,05 ns
Peptidato di rame da solfato	0	1	3	3	4	4	4	P> 0,05 ns
Solf. Tribasico 24 %	0	2	2	2	2	2	3	P> 0,05 ns

Tab. XV: Piante affette da moria nel nocciolo di Vico Matrino non irriguo nel 2004

	18-4	20-5	11-6	8-7	21-7	06-8	30-8	significatività
Controllo	0	0	0	0	0	0	0	nv
Solf. Tribasico 15%	0	3	3	4	4	5	5	* 0,471
Peptidato di rame da idrossido	0	3	3	3	3	4	4	P> 0,05 ns
Peptidato di rame da solfato	0	2	2	2	2	2	2	P> 0,05 ns
Solf. Tribasico 24 %	0	0	0	0	0	0	0	nv

Tab. XVI: Piante affette da moria nel nocciolo di Vico Matrino irriguo nel 2004

	18-4	20-5	11-6	8-7	21-7	06-8	30-8	significatività
Controllo	0	2	3	3	3	3	4	P> 0,05 ns
Solf. Tribasico 15%	0	1	1	1	2	3	4	P> 0,05 ns
Peptidato di rame da idrossido	0	1	3	3	4	4	4	P> 0,05 ns
Peptidato di rame da solfato	0	3	5	8	8	8	8	** 0,0051
Solf. Tribasico 24 %	0	0	1	1	1	1	1	P> 0,05 ns

Tab. XVII: Pianta affette da moria nel nocchioleto di Vico Matrino non irriguo nel 2005

	15-4	12-5	16-6	30-6	8-7	05-8	8-9	significatività
Controllo	0	1	1	3	5	5	5	* 0,048
Solf. Tribasico 15%	0	0	0	1	2	2	2	P> 0,05 ns
Peptidato di rame da idrossido	0	0	0	1	2	2	2	P> 0,05 ns
Peptidato di rame da solfato	0	0	0	0	2	2	3	P> 0,05 ns
Solf. Tribasico 24 %	0	0	0	0	1	1	1	P> 0,05 ns

Tab. XVIII: Pianta affette da moria nel nocchioleto di Vico Matrino irriguo nel 2005

	15-4	12-5	16-6	30-6	8-7	05-8	8-9	significatività
Controllo	0	2	0	3	4	0	6	* 0,021
Solf. Tribasico 15%	0	0	0	2	2	2	2	P> 0,05 ns
Peptidato di rame da idrossido	0	0	0	1	1	1	1	P> 0,05 ns
Peptidato di rame da solfato	0	0	2	3	4	4	4	P> 0,05 ns
Solf. Tribasico 24 %	0	0	0	2	2	2	3	P> 0,05 ns

Nelle tabelle, per brevità non sono stati riportati alcuni dei controlli in cui in nessuna parcella erano state rilevate piante ammalate. nv = nessuna pianta ammalata; ns = non significativo * = significativo; ** = molto significativo; *** = estremamente significativo.

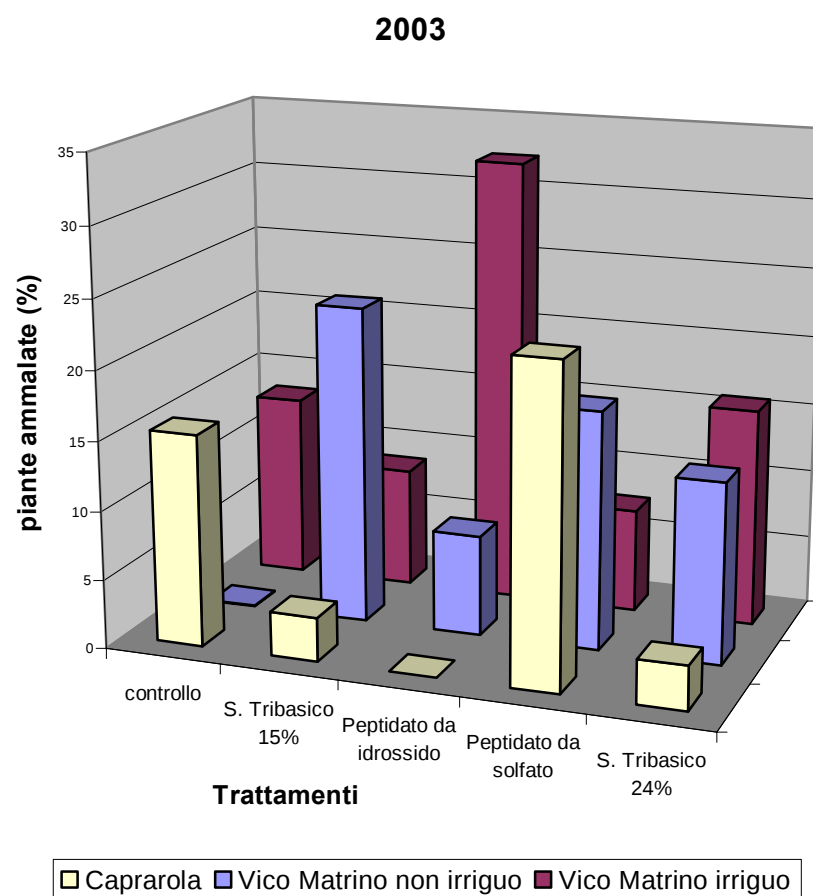


Figura 12: Percentuale di piante colpite da moria nei diversi siti sperimentali, nel corso della stagione 2003.

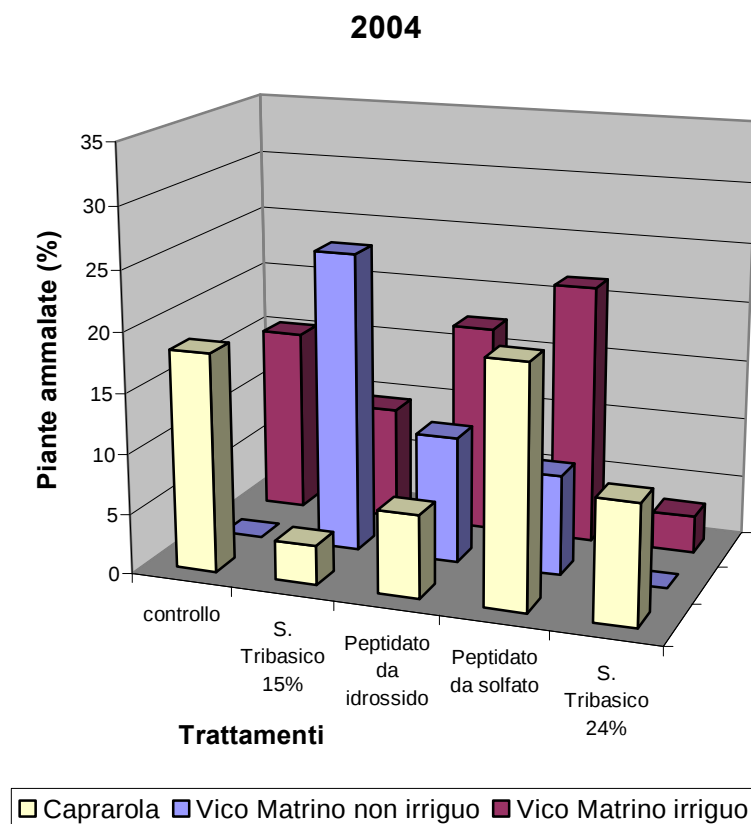


Figura 13: Percentuale di piante colpite da moria nei diversi siti sperimentali, nel corso della stagione 2004.

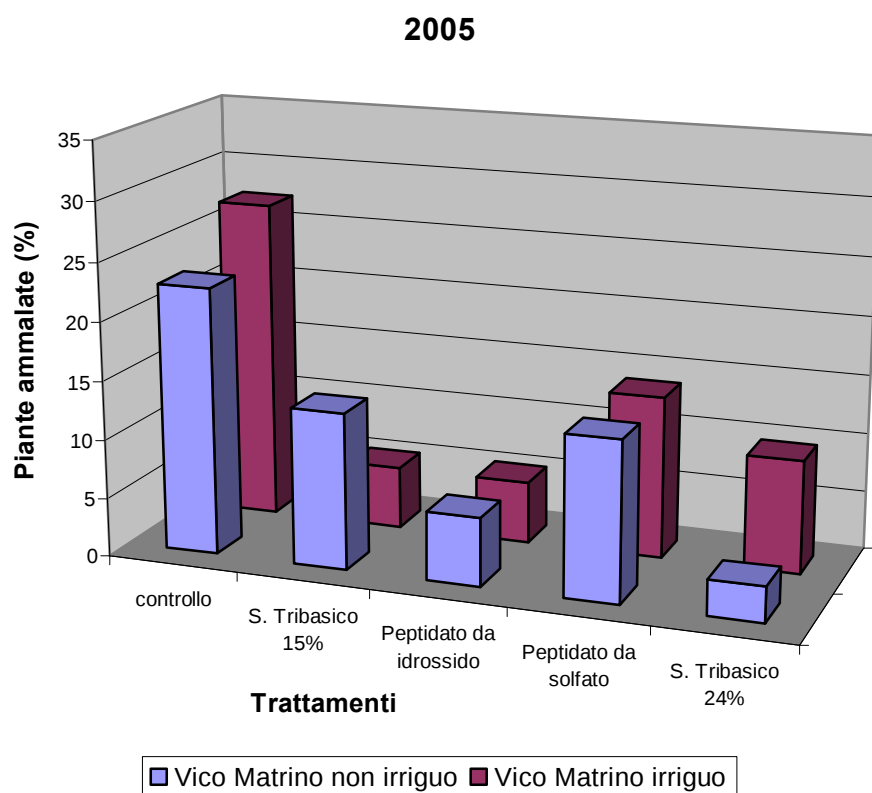


Figura 14: Percentuale di piante colpite da moria nei diversi siti sperimentali, nel corso della stagione 2005.

IV) DISCUSSIONE

La presenza costante, negli ultimi venti anni, della malattia conosciuta come moria del nocciolo nell'area dei colli Cimini e dei colli Sabatini costituisce un problema non indifferente per l'economia della zona, essendo questa imperniata sulla produzione di nocciole.

Il presente lavoro si è proposto di approfondire le conoscenze sia sulle specie batteriche a cui è stata attribuita l'eziologia della malattia ma anche su altre che vengono frequentemente isolate da materiale sintomatico.

A questo fine è stato molto utile nel lavoro l'utilizzo del sistema Biolog™ che ha permesso di confrontare, in tempi brevi, il numeroso materiale biologico ricavato dagli isolamenti.

Bisogna, comunque, tener presente che anche nella versione 4.2, il sistema ha evidenziato delle limitazioni, già riportate in diversi studi sulle precedenti versioni (Bouzar *et al.*, 1994; Black e Sweetmore, 1994; Jones 1993; Verniere *et al.*, 1993), consistenti nell'identificazione puntuale delle specie, ma non delle numerose varietà patologiche di diverse specie batteriche.

Il sistema Biolog™ si è inoltre rivelato efficiente anche nell'identificazione di *Pseudomonas avellanae* in seguito all'implementazione con il profilo biochimico della specie del database fornito dalla ditta.

Pseudomonas avellanae segnalato per la prima volta in Grecia alla fine degli anni 70 (Psallidas, 1987; Psallidas e Panagopoulos, 1979) è stato indicato negli anni 90 come principale responsabile della moria nel Viterbese (Scortichini e Tropiano, 1994). I batteri di provenienza greca tuttavia, oltre ad alcune differenze di carattere sintomatologico già citate nell'introduzione al presente lavoro, presentavano anche delle differenze di carattere morfologico e biochimico come: tempi di crescita differenti di alcuni isolati, la mancanza di produzione di pigmenti fluorescenti su substrato B di King dei ceppi italiani, o la perdita di questa capacità dopo i primi trasferimenti in coltura (Scortichini e Angelucci, 1999).

Nel presente lavoro è stato attuato un ulteriore confronto riguardante le differenze tra i profili nutrizionali di numerosi ceppi di *P. avellanae* di diversa

provenienza. Tuttavia, nonostante siano state rilevate notevoli differenze di utilizzazione delle fonti di carbonio esaminate, non è stato possibile associare in alcun modo queste differenze alla provenienza geografica dei ceppi.

Per quanto riguarda le prove di inoculazione effettuate con ceppi di *P. avellanae*, applicando diverse tecniche di inoculazione, in differenti periodi dell'anno sia in serra che in cella climatica, i risultati ottenuti sembrano indicare nella specie un microrganismo capace di esprimere le proprie caratteristiche di patogenicità solo in particolari condizioni di stress dell'ospite.

Questa ipotesi è rafforzata dal fatto che nel momento in cui sono stati effettuati degli isolamenti da materiale vegetale inoculato ma non sintomatico, la specie è stata reisolata facilmente senza che avesse provocato alcuna manifestazione sintomatologica visibile sulle piante. L'ipotesi che *P. avellanae* abbia capacità endofitiche necessita comunque di ulteriori verifiche.

Va inoltre detto che in precedenti prove di patogenicità effettuate negli anni tra il 1999 e il 2000, alcuni isolati di *P. avellanae* utilizzati anche nel presente lavoro (7 B e NCPPB 3487) avevano causato la manifestazione di sintomi tipici, ma in seguito a forti stress idrici e climatici.

In un recente studio (Fabi *et al.*, 2005), mettendo in relazione l'incidenza della malattia con i dati climatici registrati in diversi anni, è emersa una chiara relazione tra la presenza della malattia e le minime termiche registrate, significativamente minori rispetto a quelle registrate in aree in cui la patologia non è stata mai segnalata.

Stesso discorso potrebbe essere fatto con il secondo microrganismo, associato alla malattia, appartenente alla famiglia delle enterobatteriacee. Gli isolati batterici inoculati rientrano tutti, sia per caratteristiche morfologiche che per caratteristiche biochimiche, nel gruppo a cui apparteneva *Erwinia* sp. patogeno del nocciolo (Varvaro *et al.*, 1990), appartenenza confermata anche dal confronto dei profili nutrizionali. Ciò nonostante non hanno dato alcun sintomo di malattia quando inoculati in condizioni controllate.

Infine, va ricordato che dagli isolamenti effettuati da materiale sintomatico di piante affette da moria sono stati spesso isolati batteri appartenenti a specie fitopatogene diverse da *P. avellanae* e *Erwinia* sp. su cui è stato incentrato questo

lavoro sperimentale. Specie che però inoculate in condizioni controllate non hanno riprodotto la malattia.

Isolamenti di batteri appartenenti ai generi *Pseudomonas* e *Xanthomonas* sono stati molto frequenti e costanti, più di quanto sia stato l'isolamento di *Pseudomonas avellanae* (la tecnica di isolamento è stata analoga a quella descritta in bibliografia per quest'ultimo). Gli isolati batterici ottenuti nel corso del presente lavoro non sono stati utilizzati proprio perché tutti riconducibili ad una delle specie utilizzate nella prima serie di inoculazioni (2003).

All'inizio degli anni '90 Manion (1991) rielaborò delle teorie formulate a partire dagli anni 60 per spiegare il deperimento di alcune piante forestali, introducendo il concetto di "malattia ad eziologia complessa" secondo cui alcune sindromi sono determinate dal concatenarsi di diversi fattori. I fattori che comprendono sia agenti biotici che abiotici sono divisi in tre tipologie: a) predisponenti (predisposing factors, comprendente esclusivamente fattori pedoclimatici); b) scatenanti (inducing factors, comprendente fattori sia biotici che abiotici); c) concomitanti (contributing factors, comprendente fattori sia biotici che abiotici), per il verificarsi della malattia è necessaria la presenza contemporanea di almeno un fattore di ciascun tipo.

Applicando questo concetto al caso della moria del nocciolo, la presenza di diverse specie batteriche associabili ai disseccamenti, l'assenza di patogenicità degli isolati da materiale sintomatico se inoculati in condizioni controllate, le minime invernali molto basse, l'ampiezza delle escursioni termiche diurne, la frequenza di gelate tardive nell'area di diffusione della malattia (Fabi *et al.*, 2005), fanno pensare che, anche nel caso della moria non sia esatto pensare ad un agente causale unico responsabile della malattia, ma ad una serie di cause concatenanti.

È auspicabile quindi, proseguire gli studi in questa direzione in modo da verificare l'ipotesi e, nel caso questa si riveli corretta, definire il ruolo dei singoli fattori nel processo patogenetico.

L'esigenza di intraprendere uno studio preliminare, sulla capacità di *P. avellanae* di produrre autoinduttori di meccanismi di "quorum sensing", è nata invece dalla scarsità di informazioni a disposizione sulla biologia di questo patogeno. Come è ampiamente riportato in bibliografia i batteri utilizzano il

“quorum sensing” per la modulazione di una moltitudine di funzioni biologiche tra cui la produzione di fattori di patogenicità e il passaggio tra fase quiescente e fase attiva (Tab II). Lo studio intrapreso sul “quorum sensing” non ha avuto la pretesa di arrivare all’ identificazione del segnale attivato dagli autoinduttori, perché questo avrebbe richiesto un lavoro dedicato interamente a questo aspetto, ma ha fornito risultati preliminari indispensabili per lavori che nel futuro potranno fornire informazioni utilissime alla comprensione del ruolo di *P. avellanae* nell’agroecosistema del nocciolo.

La capacità di *P. avellanae* di produrre lattoni dell’omoserina era stata saggiata ma non era stata dimostrata da Elasri *et al.* (2001). Questo probabilmente perché nel lavoro citato era stato eseguito uno screening su un grande numero di isolati, e quindi l’applicazione di un protocollo standard che non riproduceva, per tutte le specie batteriche saggiate, le condizioni ottimali per la produzione di lattoni dell’omoserina.

Le indagini condotte nel corso del presente studio indicano che *P. avellanae* è capace di produrre uno o più autoinduttori del processo di “quorum sensing”.

Il lavoro sperimentale non si è limitato alla parte descritta nella tesi ma è proseguito con l’estrazione, mediante solventi idonei dei metaboliti prodotti e con la purificazione dei lattoni dell’omoserina. Questo è stato fatto attraverso cicli di purificazione successivi, eseguiti con varie tecniche cromatografiche e utilizzando la risposta del bioindicatore attivo come elemento discriminante. Le varie frazioni sono state, di volta in volta, analizzate con tecniche di Risonanza Magnetica Nucleare, e ora si attende la caratterizzazione del lattone (o dei lattoni) dell’omoserina attraverso spettrometria di massa.

L’ultimo aspetto trattato ha riguardato un confronto di vari formulati rameici da utilizzare per il contenimento della malattia in campo.

Le speranze riposte dagli operatori del settore sull’utilizzo del Bion[®], induttore di resistenza a base di Acibenzolar-S-metile, sembrano essere naufragate tanto che il suo utilizzo non viene più consigliato da parte delle locali associazioni di corilicoltori.

Gli unici prodotti da utilizzare rimangono quindi i formulati a base di rame. In particolare, in questo lavoro è stata valutata l'efficacia di alcuni formulati a basso contenuto rameico, rispetto ad altri tradizionali.

Fin dalle operazioni preliminari all'attuazione della prova sperimentale sono emerse delle conferme sulla peculiarità della zona su cui incide la moria. Dalle analisi del suolo è infatti risultato che l'acidità dei terreni, nonostante i siti di prova fossero stati scelti in due differenti aree della zona colpita dalla moria, andava ben oltre il normale pH di coltivazione del nocciolo. Questo aspetto, (Scortichini *et al.*, 2001) potrebbe rivestire un'importanza rilevante se sommato agli altri. Infatti, la forte acidità oltre a non essere adatta per la coltivazione del nocciolo potrebbe immobilizzare nel terreno alcuni microelementi ed il potassio con possibile aumento della suscettibilità della pianta ai patogeni.

Nel contesto appena descritto, il ruolo dell'applicazione di prodotti fitosanitari, a maggior ragione se ad azione contatticida qual è il rame, viene alquanto ridimensionato. Nonostante questo, dai risultati ottenuti dalle prove in campo, si possono trarre diverse indicazioni.

Innanzitutto c'è da rilevare il fatto che entrambi i prodotti a basso contenuto rameico impiegati, salvo poche eccezioni, abbiano avuto un'efficacia del tutto comparabile a quella rilevata per i prodotti a più alto contenuto di principio attivo.

Per quanto riguarda la parcella non trattata, nei primi due anni di trattamenti, i dati ottenuti indicavano un andamento in molti casi analogo a quello delle parcelle trattate. Nel terzo anno l'assenza dell'effetto di contenimento esercitata dai trattamenti rameici si è manifestata, e la differenza tra le piante colpite dalla malattia nella parcella di controllo, rispetto alle parcelle trattate, è aumentata in modo significativo.

L'efficacia di formulati a base di peptidati di rame era già stata verificata nel controllo di varie patologie ad eziologia fungina (Pertot *et al.*, 2002; Zechini-D'Aulerio *et al.* 2002). I risultati ottenuti nel presente studio, confermano le potenzialità dei nuovi formulati anche nel contenimento di malattie ad eziologia batterica.

L'utilizzo di nuovi prodotti a basso contenuto di rame costituisce un notevole vantaggio. Infatti da un punto di vista ecologico, la riduzione delle dosi di rame

distribuite ridurrebbe i problemi determinati dall'accumulo di questo metallo nel terreno e dall'inquinamento delle falde acquifere e dei corsi d'acqua.

Inoltre, tenuto conto delle limitazioni apportate dal Reg. CE 473/2002 all'utilizzo del rame in agricoltura biologica, l'utilizzo di queste formulazioni permette un maggior numero di trattamenti, quindi una maggiore copertura della coltura nei confronti di diverse avversità biotiche.

Va ricordato però che l'utilizzo di forme di rame più efficienti è spesso accompagnato da un aumento della fitotossicità dei prodotti, quando distribuiti su colture più sensibili ed in determinate fasi fenologiche (Maini *et al.*, 2002).

Questa possibilità non è stata trascurata nel corso delle osservazioni in campo. Nel corso dei tre anni di trattamenti, infatti sulle piante di nocciolo non è stato osservato alcun sintomo che poteva ricondurre a manifestazioni di fitotossicità dovute ai trattamenti effettuati.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la Regione Lazio – Assessorato all'Agricoltura, Sviluppo Agricolo e Mondo Rurale quale ente erogatore della borsa di Dottorato.

Desidero inoltre ringraziare la Dott.ssa Roberta Bernini del Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica dell'Università della Tuscia, per la disponibilità e per i preziosi consigli durante le fasi di estrazione e purificazione dei metaboliti.

V) BIBLIOGRAFIA

- Adua M. (2002). Rapporto statistico sulla corilicoltura Italiana. Atti del secondo Convegno Nazionale sul Nocciolo, Giffoni V. P., 93-103.
- Aguilar C., Bertani I. Venturi V. (2003). Quorum sensing system and stationary-phase sigma factor (*rpoS*) on the onion pathogen *Burkholderia cepacea* genomovar 1 type strain, ATCC 25416. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 1739-1747.
- Alberghina O. (2002). La coltura del nocciolo in Sicilia. Atti del secondo Convegno Nazionale sul Nocciolo, Giffoni V. P., 141-145.
- Aloj B., Bartoletti F., Caporossi U., D'Errico F. P., Di Dato F., Grande C., Olmi M., Paparatti B., Tombesi A., Varvaro L. (1987). "Una moria" del nocciolo di natura ignota nel Viterbese. *L'informatore Agrario* **26**, 55-57.
- Bainton N.J., Bycroft B.W., Chhabra S.R., Stead P., Gledhill L., Hill P.J., Rees C.E.D., Winson M.K., Salmond G.P.C., Stewart G.S.A.B., Williams P. (1992). A general role for the *lux* autoinducers in bacterial cell signalling control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. *Gene*. **116**, 87-91.
- Barber C.E., Tang J.L., Fend Y.X., Pan M.Q., Wilson T.J.G., Slater H. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology*. **24**, 555-566.
- Beck von Bodman S., Farrand S.K., (1995). Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity of *Erwinia Stewartii* require induction by an N-acyl homoserine lactone autoinducer. *Journal of Bacteriology*. **177**, 5000-5008.

- Beck von Bodman S., Majerczac D.R., Coplin D.L. (1998). A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**, 7687 – 7692.
- Beck von Bodman S., Bauer W.D., Coplin D.L. (2003). Quorum Sensing in Plant Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. **41**, 455-482.
- Bianco M., Danise B. (2002). La difesa fitosanitaria del nocciolo. Atti del secondo Convegno Nazionale sul Nocciolo, Giffoni V. P., 52-61.
- Bignami C. (2002) Attualità e problematiche della nocciolicoltura nel Lazio. Atti del secondo Convegno Nazionale sul Nocciolo, Giffoni V. P., 123-132.
- Black R., Sweetmore A. (1994). Appropriate bacterial identification system for small plant-pathology laboratories overseas incorporating the Biolog method. *Plant Pathology* **43**, 438-441.
- Bouzar H., Jones H.B., Stall R.E., Hodge N.C., Minsavage G.V., Benedict A.A., Alvarez A.M. (1993). Physiological, chemical, serological and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. *Phytopathology* **84**, 663-671.
- Brelles-mariño G., Bedmar E. (2001). Detection, purification and characterization of quorum-sensing signal molecules in plant associated bacteria. *Journal of Biotechnology*. **91**, 197-209.
- Càmara M., Daykin M., Chhabra S.R. (1998). Detection, purification and synthesis of N-acylhomoserine lactone quorum sensing signal molecules. *Methods in Microbiology* **27**, 319-330.

- Cha C., Gao P., Chen Y.C., Shaw P.H., Farrand S.K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum sensing signal by Gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant Microbe interaction*. **11**, 1119-1129.
- Chilton M.D., Currier T.C., Farrand S.K., Bendich A.J., Gordon M.P., Nester E.W. (1974). *Agrobacterium tumefaciens* and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **71**, 3672-3676.
- Chun W., Cui J., Poplawsky A.R. (1997). Purification characterization and biological role of a pheromone produced by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **51**, 1-14.
- De Salvador R. (2001). La situazione varietale della corilicoltura italiana. *Frutticoltura*. **10**, 23-28.
- Donnarumma L. e La Torre A. (2000). I Sali di rame in agricoltura biologica e possibili alternative. *Informatore Fitopatologico*. **4**, 27-31.
- Eberhard A. (1972). Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *Journal of Bacteriology*. **109**, 1101 -1105.
- Eberhard A., Burlingame A.L., Eberhard C., Kenyon G.L., Nealson K.H., Oppenheimer N.J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**, 2444-2449.
- Elasri M., Delorme S., Lemanceau P., Steward G. Laue B., Glickman E., Oger P.M., Dessaux I. (2001). Acyl-homoserine lactone is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**, 1198-1209.

- Fabi A., Varvaro L. (2004). Applicazione della tecnologia G.I.S./G.P.S. e della spettroscopia aerea (A.SP.I.S.) nello studio dell'epidemiologia della moria del nocciolo. Atti della terza Giornata di Studio Metodi numerici, statistici e informatici nella difesa delle colture agrarie e delle foreste: Ricerca e applicazioni. 49-53.
- Fabi A., Belli C., Vuono G., Balestra G.M., Varvaro L. (2005). Innovative strategies in epidemiological studies of Hazelnut dieback by using G.P.S./G.I.S. and A.Sp.I.S. Technology. Proc. of VI International Congress on Hazelnut. *Acta Hort.* **686**, 427-433.
- F.A.O. Food and Agriculture Organization. Statistical databases-Agricultural data. <http://faostat.fao.org/faostat/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&servlet=1&hasbulk=0&version=ext&language=EN>.
- Fuqua W.C., Winans S.C. (1994). A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journal of Bacteriology*. **176**, 2796-2806.
- Fuqua W.C., Winans S.C. (1996). Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *Journal of Bacteriology*. **178**, 435-440.
- Fuqua W.C., Greenberg E.P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **3**, 685-695.
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria; the LuxR-LuxI Family of cell density responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*. **176**, 269-275.

- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology*. **50**, 727-751.
- Gray K.M., Pearson J.P., Downie J.A., Boboye B.B., Greenberg E.P. (1996). Cell to cell signaling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: autoinduction of stationary phase and rhizo-sphere-expressed genes. *Journal of Bacteriology* **178**, 372-376.
- I.S.T.A.T. Istituto Nazionale di Statistica. Dati congiunturali sulle coltivazioni.
<http://www.istat.it/agricoltura/datiagri/coltivazioni/>
- Janse J.D., Rossi M.P., Angelucci L., Scortichini M., Derks J.H.J., Akkermans A.D.L., De Vrijer R., Psallidas P.G. (1996). Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. Nov.), the bacterium causing canker of hazelnut (*Corilus avellana* L.). *Systematic and Applied Microbiology*. **19**, 589-595.
- Jones J.B. (1993). Evaluation of the Biolog GN MicroPlate system for identification of some plant pathogenic bacteria. *Plant Disease* **77**, 553-558.
- Kaplan H.B., Greenberg E.P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescent system. *Journal of Bacteriology*. **163**, 1210-1214.
- de Kiewit T.R., Iglewski B.H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Journal of Bacteriology*. **68**, 4839-4849.
- Lazdunski A.M., Ventre I., Sturgis J.N. (2004). Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*. Vol. 2, **7**, 581-592.

- Lichstein H.C., e van de Sand V.F. (1945). Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Infectious Diseases*. **76**, 47-51.
- Lops R. (2000). Ricerche sulla produzione e attività dei metaboliti secondari di Pseudomonadi fitopatogene. Tesi di Dottorato, XIII ciclo. Università degli Studi di Bari. pp. **105**.
- Maini P., Odelli O., Candido M. (2002). Peptiram 5 e Peptiram 7: nuovi prodotti fungicidi e battericidi a basso dosaggio di rame chelato ad amino acidi e peptidi. Atti, Giornate fitopatologiche, Baselga di Piné, Trento, Italy, 7-11 aprile 2002, Vol. **2** 137-144.
- Manion P.D. (1991). Tree disease concepts. 2nd ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Martelli R. (1984). Meccanismo di azione degli antiparassitari a base di rame. *Vignevini* **5**, 51-53.
- McClellan K.H., Winson M.K., Fish L., Taylor A., Chhabra S.R., Cámara M., Daykin M., Lamb J.H., Swift S., Bycroft W., Stewart G.S.A.B., Williams P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **143**, 3703-3771.
- McLean R.J.C., Pierson III L.S., Fuqua C. (2004). A Simple screening protocol for the identification of quorum sensing signal antagonists. *Journal of Microbiological Methods*. **58**, 351-360.
- Muccinelli M. (1997). Prontuario dei fitofarmaci. Edagricole, Bologna. 141-146.

- Nasser W., Bouillant M.L., Salmond G., Reverchon S. (1998). Characterization of the *Erwinia chrysantemi* expI-expR locus directing the synthesis of two N-acyl homoserine lactone signal molecules. *Molecular Microbiology*. **29**, 1391-1405.
- Nealson K.H., Platt T., Hastings J.W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*. **104**, 313-322.
- Pearson J.P., Gray K.M., Passador L., Tucker K.D., Eberhard A., Iglewsky B.H., Greenberg E.P. (1994). The structure of the autoinducer molecule required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulent genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**, 197-201.
- Pertot I., Delaiti M., Mescalchin E., Zini A., Forti D. (2002). Attività antiperonosporica di nuove formulazioni di composti rameici utilizzati a dosi ridotte e prodotti alternativi al rame impiegabili in viticoltura biologica. Atti, Giornate fitopatologiche, Baselga di Piné, Trento, Italy, 7-11 aprile 2002, Vol. **2** 297-302.
- Piccirillo P. (2003). Nuove prospettive per la coltivazione del nocciolo in Italia. *Frutticoltura* **10**, 32-37.
- Piper K.R., Beck von Bodman S., Farrand S.K. (1993). Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**, 448-450.
- Pirhonen M., Flego D., Heikinheimo R., Palva E.T. (1993). A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO Journal*. **12**: 2467-2476.

- Poplasky A.R., Chun W., Slater H., Daniels M.J., Dow M. (1998). Synthesis of extracellular polysaccharide, extracellular enzymes and xanthomonadin in *Xanthomonads campestris*: evidence for the involvement of two intercellular regulatory signals. *Mol. Plant-Microbe interact.* **11**, 68-70.
- Proietti Zolla C. (2005) Analisi genetica e molecolare dei batteri implicati nella “moria” del nocciolo. Tesi di Dottorato, XVIII ciclo.
- Psallidas P.G. (1987). The problem of bacterial canker of hazelnut in Greece caused by *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* **17**, 257-261.
- Psallidas P.G. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae*. Pathovar nov., the bacterium causing canker of *corylus avellana*. *Plant Pathology.* **42**, 358-363.
- Psallidas P.G., Panagopoulos C.G. (1979). A Bacterial canker of *corylus avellana* in Greece. *Phytopathologische Zeitschrift.* **94**, 103-111.
- Puskas A., Greenberg E.P., Kaplan S., Shaefer A.L. (1997). A quorum sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology.* **179**, 7530-7537.
- Regolamento (CE) n. 473/2002 della Commissione, del 15 marzo 2002, che modifica gli allegati I, II e VI del regolamento (CEE) n. 2092/91 del Consiglio relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e all'indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari e che stabilisce norme dettagliate per quanto concerne la trasmissione di informazioni sull'impiego di composti di rame. *Gazzetta ufficiale n. L 075 del 16/03/2002.* 2 -24.

- Reverchon S.L., Bouillant M.L., Salmond G., Nasser W. (1998). Integration of quorum sensing system in the regulatory networks controlling virulence factor synthesis in *Erwinia chrysantemi*. *Molecular Microbiology*. **29**, 1407-1418.
- Schaefer A.L., Hanzelka B.L., Parsek M.R. and Greenberg E.P. (2000). Detection purification and structural elucidation of acylhomoserine lactone inducer of *Vibrio fischeri* luminescence and other related molecules. *Methods in Enzymology*. **305**, 288-301.
- Schaefer A.L., Val D.L., Hanzelka B.L., Cronan J.E. and Greenberg E.P. (1996). Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acylhomoserine lactone synthase activity of a purified *V. fischeri* LuxI protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**, 9505-9509.
- Scortichini M., Tropiano F.G. (1994). Severe outbreak of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* on Hazelnut in Italy. *Journal of Phytopathology*. **140**, 65-70.
- Scortichini M., Angelucci L. (1999). Phenotypic characterization of *Pseudomonas avellanae* (Psallidas) Janse *et al.* and occurrence of colony variants. *Journal of Plant Pathology*. **81** (1), 55-61.
- Scortichini M., Rossi M. P., Lazzari M., Valentini B., Testa F., Micheli R. (1994). Moria del nocciolo nel viterbese: indagine sulla presenza di *Pseudomonas syringae* pv *avellanae*. *Informatore Fitopatologico* **1**, 58-60.
- Scortichini M., Sbaraglia M., Di Prospero P., Angelucci L., Petricca P. Tromboni R., Mazzuca T., Lucci E., Moretti D., Cirica B., Trucca L. (2001). Moria del nocciolo nel Viterbase e terreni acidi. *L'Informatore Agrario*. **21**, 85-88.

- Shaw P.D., Ping G., Daly S., Cronan J.E., Rinehart K., Farrand S.K. (1997). Detecting and characterizing acyl-homoserine lactone signal molecules by thin layer chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**, 6036-6041.
- Shripsema J., De rudder K.E.E., Van Vliet T.B., Lankhorst P.P., de Vroom E.K., Ijse J.W., Van Brussel A.A. (1996). Bacteriocin small of *Rhizobium leguminosarum* belong to a class of N-acylhomoserine lactone molecules know as autoinducers and as quorum sensing co-transcriptional factors. *Journal of Bacteriology*. **178**, 366-371.
- Tombesi A. (1991) Il Nocciolo. *Frutticoltura Speciale*. Ed. Reda-Roma 614-630.
- Tombesi A. (2005). World hazelnut Situation and perspectives: Italy. *Acta Horticulturae*. **686**, 649-653.
- Toth I.K., Newton J.A., Hyman L.J., Lees A.K., Daykin M., Ortori C., Williams P. Fray R.G. (2004). Potato plants genetically modified to produce N-acylhomoserine lactones increase susceptibility to soft rot erwiniae. *Molecular Plant Microbe interaction* **8**, 880-887.
- Valentini N., Me G. (2002). Attualità e problematiche della coltura del nocciolo in Italia: La situazione piemontese. Secondo Convegno Nazionale sul Nocciolo, Giffoni V. P. 133-140
- Varvaro L. (1993). Le fitopatie del nocciolo nell' Alto Lazio: un triennio di osservazioni e di strategie di lotta. *Informatore Fitopatologico* **2**, 54-58.
- Varvaro L. (1994). A dieback of hazelnut (*Corylus avellana* L.) in the north of Latium: etiology and control. *Acta Horticulturae* **351**, 559-565.

- Varvaro L., Costa A., Balestra G. M. (1990). A new bacterial disease of *Corylus avellana*. 8th Int. Congr. Mediterranean Phytop. Union. Agadir Marocco 28 oct – 3 nov. 1990. 469 – 471.
- Verniere C., Pruvost O., Civerolo E.L., Gambin O., Jacquemoud-Collet J.P., Luisetti J. (1993). Evaluation of the Biolog substrate utilization system to identify and asses metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *Citri*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 243-249.
- Viggiani G., Ragozzino A., Grande C. (1979). La difesa fitosanitaria del nocciolo. Regione Lazio, assessorato Agricoltura e foreste. Pp. 47
- Voelkert E., Grant D.R. (1970). Determination of homoserine as the lactone. *Analytical Biochemistry*. **34**, 131-137.
- Whitehead N.A., Barnard A.M.L., Slater H., Simpson N.J.L., Salmond G.P.C. (2001). Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **25**, 365-404.
- Zechini D'Aulerio A., Dallavalle E., Maini, P. (2002). Applicazione di peptidati di rame nella prevenzione di malattie fungine su stella di Natale e altre colture ornamentali e officinali. Atti, Giornate fitopatologiche, Baselga di Piné, Trento, Italy, 7-11 aprile 2002, Vol. **2** 523-528.
- Zhang L., Kerr A. (1991). A diffusible compound can enhance conjugal transfer of Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. **173**, 1867-1872.
- Zhang L., Murphy P.J., Kerr A., Tate M.E. (1993). *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* **362**, 446-448.

- Zhu J., Chai Y., Zhong Z., Li S., Winans S.C. (2003). *Agrobacterium* bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 6949-6953.
- Zhu J., Beaber J.W., Morè M.I., Fuqua C., Eberhard A., Winans S.C. (1998). Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. **180**, 5398-5405.