



FACOLTÀ DI AGRARIA

DIPARTIMENTO DI PROTEZIONE DELLE PIANTE

DOTTORATO DI RICERCA IN PROTEZIONE DELLE PIANTE
- XXI CICLO -

***Curriculum:* Malattie ad eziologia complessa**
SETTORE SCIENTIFICO – DISCIPLINARE AGR/12

Tesi di Dottorato

“Indagini sugli endofiti patogeni in materiale vivaistico di piante forestali ornamentali e sulle misure per ridurre l’azione sulle crisi da trapianto”.

Dottoranda
Dott.ssa Eleonora Rocco

Tutore
Prof. Naldo Anselmi

Co-Tutore
Dott. Achille Giorcelli

Coordinatore del Dottorato
Prof. Leonardo Varvaro

1. INTRODUZIONE	6
1.1. PROBLEMATICHE FITOPATOLOGICHE NELLA GESTIONE DELLE ALBERATE ORNAMENTALI.....	7
1.1.1. ALBERATE IN ESSERE	8
1.1.1.1. Le malattie di origine fungina	9
1.1.2. FASE VIVAISTICA.....	11
1.1.2.1. Moria dei semenzali.....	11
1.1.2.2. Malattie del vivaio	13
1.1.3. LE CRISI DI TRAPIANTO	16
1.2. CENNI SULL'ENDOFITISMO DEI FITOPATOGENI.....	19
1.2.1. CONCETTO DI ENDOFITISMO	19
1.2.2. GLI “ENDOFITI PATOGENI”	20
1.2.3. POSSIBILE RUOLO DEGLI ENDOFITI FUNGINI NELLE CRISI DI TRAPIANTO	24
1.3. DUE CASI DI STUDIO: PIOPPO E LECCIO	24
1.3.1. PIOPPO: <i>POPULUS</i> SPP.....	24
1.3.1.1. Generalità.....	24
1.3.1.2. Cenni sulle specie più utilizzate.....	27
1.3.1.3. Le malattie del pioppo	28
1.3.1.4. Gli endofiti patogeni su pioppo.....	29
1.3.1.5. Crisi di trapianto del pioppo	30
1.3.2. LECCIO. <i>QUERCUS ILEX</i>	33
1.3.2.1. Generalità.....	33
1.3.2.2. Le malattie del leccio	34
1.3.2.3. Gli endofiti su leccio.....	36
1.3.2.4. Crisi di trapianto del leccio.....	36

2. SCOPI DELLA TESI	37
3. MATERIALI E METODI.....	39
3.1. INQUADRAMENTO GENERALE.....	39
3.2. INDAGINI CONDOTTE SU PIOPPO	42
3.2.1. MATERIALE GENETICO UTILIZZATO.....	42
3.2.2. ARTICOLAZIONE DELLE RICERCHE	43
3.2.2.1. Presenza di endofiti fungini nelle talee e relativa diffusione organotropica nei germogli.	44
3.2.2.2. Insediamento degli endofiti fungini in vivaio.....	44
3.2.2.3. Distribuzione degli endofiti nelle varie parti del fusto.....	45
3.2.2.4. Influenza della stazione sull'incidenza degli endofiti.....	45
3.2.2.5. Variabilità degli endofiti in funzione della specie e/o del clone ospite.	45
3.2.2.6. Influenza dei regimi idrici in vivaio sull'incidenza degli endofiti nelle pioppelle.....	46
3.2.2.7. Influenza dei trattamenti alle pioppelle in vivaio e al trapianto sull'isolabilità degli endofiti dopo la messa a dimora.....	47
3.2.2.8. Influenza dello stato di idratazione degli astoni al trapianto sull'isolabilità degli endofiti patogeni alla germogliazione delle piante, sullo sviluppo sintomatico degli agenti di cancro e sulla crisi di trapianto.....	47
3.3. INDAGINI CONDOTTE SU LECCIO	50
3.3.1. MATERIALE UTILIZZATO.....	50
3.3.2. ARTICOLAZIONE DELLE RICERCHE	50
3.3.2.1. Presenza di endofiti fungini nelle ghiande	50
3.3.2.2. Trasmissione organotropica	51
3.3.2.3. Insediamento degli endofiti nei semenzali.....	51
3.3.2.4. Effetti dell'irrigazione e/o della concimazione sull'incidenza degli endofiti patogeni nelle piante in vivaio.....	51
3.3.2.5. Influenza dello stato di idratazione e/o disidratazione delle piantine alla messa a dimora sulla crisi di trapianto e sul relativo ruolo svolto dagli endofiti patogeni.....	51

3.4. CAMPIONAMENTI	52
3.4.1. SCELTA DELLE PIANTE	52
3.4.2. PRELIEVO DEI CAMPIONI DI PIOPPA	52
3.4.3. PRELIEVO DEI CAMPIONI DI LECCIO	53
3.5. ANALISI DEGLI ENDOFITI.....	53
3.5.1. ISOLAMENTO DEGLI ENDOFITI.....	53
3.5.2. IDENTIFICAZIONE DEGLI ENDOFITI	55
3.5.2.1. Riconoscimento attraverso analisi morfologica	55
3.5.2.2. Riconoscimento attraverso analisi molecolare.....	56
3.5.3. QUANTIFICAZIONE DELLE TIPOLOGIE FUNGINE	56
3.6. RILIEVO DEGLI ATTACCHI DI NECROSI CORTICALI	57
3.7. RILIEVO DELL'INCIDENZA DELLE CRISI DI TRAPIANTO.....	59
3.8. DATI CLIMATICI.....	59
4. RISULTATI.....	60
4.1. ANDAMENTO CLIMATICO	60
4.1.1. STAZIONE DI VITERBO.....	60
4.1.2. STAZIONE DI CASALE MONFERRATO	60
4.2. RISULTATI RELATIVI AL PIOPPA	65
4.2.1. PRESENZA DEGLI ENDOFITI FUNGINI NELLE TALEE	65
4.2.2. DIFFUSIONE ORGANOTROPICA DEGLI ENDOFITI FUNGINI	65
4.2.3. INSEDIAMENTO DEGLI ENDOFITI FUNGINI NELLE PIOPPELLE	68
4.2.4. DISTRIBUZIONE DEGLI ENDOFITI NELLE VARIE PARTI DELLA PIANTA.	68
4.2.5. INFLUENZA DELLA STAZIONE SULL'INCIDENZA DEGLI ENDOFITI	71
4.2.6. VARIABILITÀ DEGLI ENDOFITI IN FUNZIONE DELLA SPECIE E/O DEL CLONE OSPITE.....	72
4.2.7. INFLUENZA DEI REGIMI IDRICI IN VIVAIO SULL'INCIDENZA DEGLI ENDOFITI NELLE PIOPPELLE	74
4.2.7.1. Indagini condotte a Viterbo.....	74
4.2.7.2. Indagini condotte a Casale Monferrato	75

4.2.8. INFLUENZA DELLO STATO DI IDRATAZIONE DELLE PIOPPELLE AL TRAPIANTO SULL'ISOLABILITÀ DEGLI ENDOFITI.....	77
4.2.9. INFLUENZA DELLO STATO DI IDRATAZIONE DELLE PIOPPELLE AL TRAPIANTO SULL'INCIDENZA DELLE NECROSI CORTICALI E SULLE CRISI DI TRAPIANTO	80
4.2.9.1. Ricerche condotte nel 2007	80
4.2.9.2. Ricerche condotte nel 2008	87
4.3. RISULTATI RELATIVI AL LECCIO	98
4.3.1. PRESENZA DI ENDOFITI FUNGINI NELLE GHIANDE	98
4.3.2. TRASMISSIONE ORGANOTROPICA	99
4.3.3. INSEDIAMENTO DEGLI ENDOFITI NEI SEMENZALI	99
4.3.4. EFFETTI DELL'IRRIGAZIONE E/O DELLA CONCIMAZIONE SULL'INCIDENZA DEGLI ENDOFITI PATOGENI NELLE PIANTE IN VIVAIO	103
4.3.5. INFLUENZA DELLO STATO DI IDRATAZIONE E/O DISIDRATAZIONE DELLE PIANTINE AL TRAPIANTO SULL'ISOLABILITÀ DEGLI ENDOFITI E SULLA CRISI DI TRAPIANTO	105
5. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	108
6. BIBLIOGRAFIA CITATA	114
RINGRAZIAMENTI	123

1. INTRODUZIONE

Il progressivo e costante ampliamento dei centri abitati che da alcuni decenni caratterizza il nostro Paese ha fatto sì che il verde pubblico e le alberature ornamentali abbiano assunto un'importanza culturale, economica e sociale determinante nel contesto degli assetti urbani. Le attenzioni sempre maggiori rivolte alla tutela e alla gestione del verde (Odone, 1993) impongono una salvaguardia fitosanitaria particolarmente accorta, che incontra tuttavia notevoli difficoltà per la complessità dei fattori che in tali ambienti possono interferire con le condizioni sanitarie e fisiologiche delle piante.

Dal punto di vista biologico gli *habitat* dei vegetali in ecosistemi antropizzati si discostano notevolmente da quelli naturali. Questo determina una più o meno marcata diversificazione del patosistema in essi insediato. Le malattie che maggiormente coinvolgono il patrimonio arboreo in ambiente urbano, sebbene non differiscano sostanzialmente sotto l'aspetto eziologico da quelle delle formazioni propriamente forestali, da queste si discostano soprattutto per quanto riguarda l'importanza relativa degli effetti dannosi e la peculiarità delle misure di difesa adottabili (Cellerino e Gullino, 1993; Autori vari, 1996; Anselmi e Mazzaglia 2003; Anselmi, 2007 a.).

Negli impianti boschivi a scopo produttivo sono da temere avversità in grado di compromettere gli incrementi e/o gli standard qualitativi della massa legnosa, mentre in quelli aventi scopi idrogeologici assumono rilevanza prioritaria quelle che possono indurre deperimenti progressivi ed irreversibili.

Per le piante utilizzate negli spazi verdi, specie quelli urbanizzati, l'attenzione viene invece posta sugli agenti biotici o abiotici capaci di determinare il mancato attecchimento all'impianto o post-trapianto, deturparne le caratteristiche ornamentali e soprattutto di minarne la stabilità meccanica, con conseguente rischio per l'incolumità delle persone; a questo si aggiunga che gli operatori e i gestori del verde urbano si trovano spesso a dover fronteggiare problemi anche di ordine economico, vista la ristrettezza dei bilanci, e di ordine giuridico per la mancanza di indicazioni sufficientemente chiare, elementi che rendono il quadro ancor più complesso.

In ogni caso un momento che riveste sempre particolare criticità nel verde urbano è quello del trapianto, sia per le eventuali fallanze sia per le sofferenze che possono rallentare l'affrancamento delle piante.

In questa prospettiva è particolarmente utile porre attenzione al legame che intercorre tra le condizioni delle fasi vivaistiche (Anselmi, 1992) che precedono l'impianto e la

riuscita di quest'ultimo. La gestione colturale nel settore vivaistico è infatti condizionata dalle problematiche fitopatologiche, sia per le perdite di produzione che queste possono determinare, sia per le ripercussioni che taluni patogeni, presenti già nelle giovani piantine, potrebbero provocare sul bosco o sugli impianti di destinazione, dopo il trapianto.

La fase di trapianto rappresenta peraltro un momento molto delicato della “filiera del verde urbano”, momento spesso reso particolarmente critico dal problema noto come “crisi di trapianto”, in cui gli aspetti patologici presentano un peso rilevante, fortemente intrecciato con le caratteristiche del materiale vivaistico e con le tecniche colturali seguite.

Tra i patogeni più ricorrenti durante le crisi di trapianto sono da ricordare gli agenti di necrosi corticali, per alcuni dei quali è ipotizzabile la capacità di insediarsi nelle piante sane e rimanere per lunghi tempi allo stato asintomatico (endofiti patogeni).

In questa introduzione, dopo alcuni cenni sulle problematiche fitopatologiche delle alberate in generale, e in particolare della fase vivaistica, ci si soffermerà sulle crisi di trapianto, sui patogeni di debolezza ad esse connessi e sul relativo eventuale endofitismo.

Proprio su questi ultimi elementi porremo la nostra attenzione nella presente ricerca, cercando di offrire un contributo alle conoscenze sugli endofiti patogeni eventualmente presenti nei diversi organi delle piante nelle varie fasi del vivaio, al ruolo che essi possono svolgere nelle crisi di trapianto ed alle misure utili ad un loro controllo. Tralascieremo in ogni caso, sia nell'introduzione, sia nelle ricerche, le malattie da batteri, poco frequenti in ambito urbano, le virosi (quasi mai particolarmente dannose), nonché le fisiopatie, che sebbene estremamente rilevanti (basti pensare al problema degli inquinanti), esulano dal contesto generale della tesi.

Pertanto, sia la trattazione degli elementi introduttivi, sia le indagini affrontate con questo lavoro, riguarderanno essenzialmente patogeni fungini, particolarmente importanti sulle piante arboree ornamentali, compresa la fase di trapianto.

1.1. PROBLEMATICHE FITOPATOLOGICHE NELLA GESTIONE DELLE ALBERATE ORNAMENTALI

Come accennato in premessa, le problematiche che si incontrano nella gestione delle alberate ornamentali possono riguardare gli impianti già in essere oppure quelli in via di

costituzione, spesso strettamente collegati con il materiale vivaistico ed i trattamenti ad esso rivolti durante la messa a dimora.

1.1.1. ALBERATE IN ESSERE

Uno dei più importanti problemi nella gestione del verde urbano è oggi rappresentato dal mantenimento delle alberate ornamentali già esistenti, soprattutto quando si ha a che fare con centri storici, dove le distanze fra gli alberi e i fabbricati sono spesso troppo ristrette e comunque tali da richiedere pesanti interventi cesori (Cellerino e Anselmi, 1979; Anselmi *et al.* 1996 a; Anselmi 2003, 2007 a e b).

Fra l'altro giova ricordare che in molti casi si ha a che fare con alberi di dimensioni rilevanti che, se lasciati crescere liberamente, potrebbero arrecare danni alle strutture adiacenti a causa dell'eccessivo sviluppo della chioma. Quando poi ci si trova a dover scegliere fra l'integrità delle strutture edilizie e dei fili dell'alta tensione, minacciati dalla presenza di un ramo cresciuto nella direzione "sbagliata", la scelta non può che penalizzare la pianta.

I moderni piani urbanistici, soprattutto nelle aree di nuova edificazione, oggi prevedono sin dalle prime fasi di progettazione zone da adibire a "verde", siano esse parchi, giardini o viali alberati, per le quali bisogna però avere la cura di scegliere le specie più adatte, da collocare ad adeguate distanze dai fabbricati in modo da garantire sia il pieno sviluppo della pianta, sia la sicurezza delle costruzioni.

Le piante inoltre non sempre si trovano in una situazione completamente favorevole al loro sviluppo. Oltre alle potature drastiche alla chioma - interventi che però sono più spesso praticati nei viali alberati mentre sono molto più rari all'interno di parchi e giardini pubblici - il parco arboreo che compone le aree verdi all'interno dei nostri centri abitati deve anche far continuamente fronte a condizioni climatiche ed edafiche difficili. Le piante devono infatti fare i conti con un ambiente ricco di inquinanti (PAN, Ozono, NO_x, composti dello Zolfo *etc.*) (Anselmi e Vannini 1996; Paoletti 1998, 2006), con l'impermeabilizzazione del suolo attorno ai tronchi a causa del manto stradale, con il taglio ripetuto delle radici durante le operazioni di installazione o di riparazione delle tubazioni idrauliche e delle reti elettriche interrato, che spesso delimitano fisicamente lo spazio esplorabile dalle radici stesse. A ciò si aggiungano inoltre i danni che talvolta sono causati all'apparato radicale dalla fuoriuscita di gas dalle falle presenti nelle tubazioni per la fornitura di metano. Tutto ciò si traduce in un continuo stato di stress

per le piante che non di rado porta a fenomeni di deperimento, fino anche alla morte degli individui più deboli, e che comunque favorisce lo sviluppo delle malattie cosiddette di “debolezza”, di cui parleremo diffusamente più avanti. Ai danni causati da queste malattie sulle piante che fanno parte del verde ornamentale si devono poi aggiungere quelli prodotti da patogeni obbligati, da insetti e da acari che spesso risultano letali come nel caso di alcuni agenti di malattie vascolari, come la grafiosi dell’olmo e il cancro colorato del platano.

Molte delle suddette malattie, in particolare quelle di debolezza, possono ovviamente essere contenute o addirittura ovviate con una razionale messa a dimora, prevedendo scelta idonea degli spazi e razionali tecniche di trapianto.

Di seguito approfondiremo l’argomento “endofitismo” in associazione con i patogeni di debolezza, su cui verrà incentrata la parte sperimentale del lavoro ed infine concluderemo la parte introduttiva affrontando le problematiche fitopatologiche relative a due specie prese in considerazione con questa Tesi di Dottorato, il pioppo e il leccio.

1.1.1.1. **Le malattie di origine fungina**

Nelle alberate ornamentali i gruppi di malattie fungine più dannose sono rappresentati dalle carie del legno e dai marciumi radicali, causa di deperimenti e di instabilità delle piante, con stroncature e crolli, le tracheomicosi ed i cancri, causa di funeste morie, le malattie fogliari e dei germogli, che oltre all’indebolimento della pianta, ne riducono spesso l’aspetto ornamentale (Cellerino e Anselmi, 1979; Autori vari, 1996; Minervini, 1996, Anselmi, 2007 b.).

Marciumi radicali. Malattie provocate da alcuni *Basidiomycota* (*Armillaria* spp., *Heterbasidion* spp., *Ganoderma* spp., etc.), ma spesso anche da altri patogeni appartenenti sia agli *Ascomycota* (*Rosellinia* spp., *Ustilina* spp. etc.), sia ai *Chromista* (es. *Phytophthora* spp.), che causano alterazioni necrotiche delle radici, del colletto e della parte basale del tronco. Si tratta in genere di patogeni edafici che oltre a poter causare direttamente la morte della pianta, possono favorire sradicamenti delle piante con rischi di danni a cose e persone.

Carie. Malattie causate da funghi appartenenti alla classe dei *Basidiomycota*, prevalentemente *Hymenomycetes* comprendenti innumerevoli specie, alcune polifaghe , altre tipiche di particolari generi e specie forestali (*Daedalea*, *Fomes*, *Fomitopsis*, *Inonotus*, *Laetiparus*, *Phellinus*, *Stereum*, etc.). Questi funghi hanno la capacità di

degradare, attraverso appositi enzimi, le pareti cellulari lignificate che costituiscono i tessuti xilematici. Dette pareti presentano una ossatura di fibrille di cellulose disposte in più strati (S1, S2, S3), fra cui si inseriscono molecole di lignina che conferiscono resistenza alla struttura. La degradazione di cellulosa e lignina ad opera di questi funghi oltre a determinare vistose cavità nei tronchi e nelle branche, determinano anche una diminuzione della resistenza meccanica del legno. Questo, se sottoposto a sforzi eccessivi tipo quelli che si possono avere in giornate con raffiche di vento particolarmente violente, può cedere repentinamente causando schianti di rami e rotture del tronco (Anselmi *et al.*, 1996; Anselmi, 1998; Mulas, 2003).

Tracheomicosi e cancri. Di particolare gravità sono anche le malattie vascolari e quelle cancerose (necrotrofiche) delle strutture legnose, cioè le tracheomicosi ed i cancri, che portano inesorabilmente a morte le piante. Tra le tracheomicosi, sono particolarmente funeste la grafiosi dell'olmo causata da *Ophiostoma ulmi* (Schwarz) Nannf., che ha avuto come conseguenza la pressoché totale scomparsa dei nostri olmi adulti; il cancro colorato del platano causato da *Ceratocystis fimbriata f.s. platani* (Ellis & Halsted) Walter., malattia talmente grave da rendere necessario un decreto di lotta obbligatoria (D.M. n°412 del 3 settembre 1987); la tracheofusariosi da *Fusarium oxisporum* Schlecht delle palme; la tracheoverticillosi da *Vertillium dahliae* Kleb e *V. alboatrum* Reinke et Berth degli aceri e di altre latifoglie. Tra le più gravi malattie da cancro invece, si ricordano il cancro corticale del cipresso da *Seiridium cardinale* Wag., il cancro del castagno da *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M. Barr, oggi in regressione per la diffusione del noto ceppo ipovirulento, le necrosi corticali del pioppo da *Discosporium populeum*, (Sacc.) Sutton, *Cytospora* spp., *Phomopsis* spp., *etc.*

Fitopatie della chioma. Forse meno pericolose dal punto di vista della stabilità, ma esteriormente molto più visibili, sono invece le malattie che colpiscono la chioma delle piante. Fra gli agenti di malattie fogliari di tipo necrotrofico possiamo ad esempio citare: *Gnomonia platani* Kleb., *Apiognomonina errabunda* (Roberge) von Höhnel. e *Guignardia aesculi* L., agenti di antracnosi rispettivamente su platano, querce ed ippocastano; *Marssonina* spp., agenti di bronzatura dei pioppi e dei salici; *Venturia populina* (Vuill.) Fabr., agente della defogliazione primaverile dei pioppi; *Phyllosticta* spp., *Cercospora* spp., *etc.*, agenti di necrosi fogliare su svariate specie ornamentali. Ad esse poi dovremmo sommare anche le malattie di tipo biotrofico, come i mal bianchi o le ruggini. Per i primi basti ricordare l'importanza che può rivestire *Microsphaera platani* nell'indebolire ancora di più esemplari di platano già sottoposti a violenti

attacchi di antracnosi, nonché i danni, spesso tuttavia solo di carattere estetico, causati da *Microsphaera alphitoides* Griff.&Maubl. su alcuni esemplari di querce di particolare pregio all'interno di parchi e quelli arrecati da *Phyllactinia suffulta* (Reb.) Sacc. e *Sphaeroteca pannosa* (Wallr.) Lév. in svariate specie vegetali secondarie (es. aceri, sorbi *etc.*). Per quanto riguarda le ruggini, invece, in città raramente si riscontrano attacchi di entità rilevante, sia perché spesso mancano gli ospiti secondari (es. ruggini eteroiche dei pini, fatta eccezione forse per *Melampsora pinitorqua* Rostr., che ha come ospite alternante i pioppi della sezione *leuce*) sia perché la distanza spesso elevata dai focolai d'inoculo naturali rende difficile l'insorgere di queste malattie.

Scarsissima importanza in ambito urbano hanno infine le fumaggini, sebbene in qualche caso siano causa di fastidiose colature di materiale nerastro.

1.1.2. FASE VIVAISTICA

Nella prospettiva di una buona riuscita e una corretta gestione del verde urbano, un ruolo importante è giocato dal materiale vivaistico impiegato nella costituzione di nuovi impianti, dalle condizioni fisiologiche e sanitarie dello stesso e dal buon attecchimento alla messa a dimora (Cellerino e Gullino, 1993) . Per le giovani piante queste fasi sono particolarmente delicate ed importanti, infatti è proprio in questi momenti, dalla germinazione del seme fino al trapianto, che esse possono andare incontro alle prime severe avversità.

Le piantine nate da seme vengono innanzitutto colpite dalla cosiddetta moria dei semenzali; successivamente le piante in vivaio vanno incontro a buona parte delle malattie che affliggono le piante adulte, fatta eccezione per le carie che in genere risparmiano le piante giovanissime. Molte di queste avversità possono poi incidere, più o meno direttamente su le crisi di trapianto.

1.1.2.1. Moria dei semenzali

La moria dei semenzali (Troiani e Anselmi, 1997) è causata da una trentina di specie patogene, di cui le più importanti in Italia appartengono ai generi *Pythium*, *Phytophthora* tra i *Chromista*, *Fusarium* e *Rhizoctonia*, tra i funghi Mitosporici. Ad essi si associano specie secondarie, quali *Pestalotia*, *Cilindrocladium*, *Cilindrocarpon*, *Botrytis*, *etc.*, che in genere colpiscono piantine già deperienti. Sebbene si tratti di

patogeni a carattere non strettamente specifico, piuttosto ubiquitari, *Pythium* e *Phytophthora* risultano più frequenti nelle zone umide, temperato-fredde, *Rhizoctonia* è ricorrente nelle zone più tendenzialmente aride e calde, mentre *Fusarium* può essere presente in entrambi i contesti. Gli altri patogeni si associano ai precedenti in base alle condizioni pedo-climatiche.

Sia pur con variabilità tra specie e specie, sono particolarmente sensibili alla moria i generi *Pinus*, *Picea*, *Larix*, *Pseudotsuga* e *Fagus*, mentre sono in genere più tolleranti buona parte delle latifoglie e, tra le conifere, la famiglia delle *Cupressaceae*.

In generale si può affermare che le specie vegetali più sensibili agli agenti della moria sono quelle a germinazione e crescita lenta, mentre tra le più resistenti vanno inserite quelle a rapido accrescimento giovanile.

La malattia può colpire i semi in fase di pre-germinazione, ostacolandone la normale germinazione (moria di pre-emergenza), ad opera dei patogeni presenti nella spermo flora, oppure può verificarsi nella fase immediatamente successiva alla germinazione (moria di post-emergenza), colpendo le giovani plantule ad opera dei patogeni che vivono nel terreno di semina.

Nelle piante forestali molte volte la moria di pre-emergenza è legata ad una irrazionale raccolta dei semi (già caduti a terra, bagnati, *etc.*) o ad una loro cattiva conservazione (in ambiente umido e caldo, senza prosciugamento dei semi eventualmente bagnati, *etc.*), che facilita lo sviluppo di muffe e marciumi, che devitalizzano i semi o ne riducono la germinabilità.

L'attacco fungino è in ogni caso molto virulento nelle prime due-tre settimane che seguono la germinazione, essendo particolarmente favorito dai teneri tessuti delle plantule, non ancora lignificati. Una volta superato questo periodo critico, le piantine reagiscono alla malattia, i cui effetti vanno via via scomparendo con la lignificazione.

L'umidità e la natura del suolo svolgono un ruolo molto importante per la moria dei semenzali. Abbondanti piogge od irrigazioni, in suoli argillosi o mal drenati, possono causare ristagni d'acqua, favorendo *Pythium* e *Phytophthora*, dotati di propaguli natanti (zooconidi). *Rhizoctonia solani*, per contro, sviluppa meglio in suoli con un basso contenuto di umidità, compreso tra il 30 e il 50% (es. terreni sabbiosi).

Quanto ad altri fattori, in generale la moria è favorita da temperature relativamente elevate, pH alcalino o neutro; substrati ricchi di azoto (con basso rapporto carbonio/azoto, C/N); coltivazione dei semenzali ripetuta sullo stesso terreno.

Quantunque le morie dei semenzali non abbiano chiare ripercussioni sulle crisi di trapianto, non è escluso che le piantine colpite che riescono a sopravvivere permangano in uno stato di sofferenza (piantine dominate) con ripercussioni sul comportamento al trapianto.

1.1.2.2. Malattie del vivaio

Le malattie che colpiscono i vivai sono in generale le stesse che colpiscono i boschi, anche se spesso con incidenza molto più elevata.

Limitandoci ai patogeni fungini, quantunque sporadici, particolarmente pericolosi risultano i patogeni ad *habitus* edafico, generalmente endemici e a carattere non strettamente specifico. Altrettanto dannosi ma più ricorrenti sono gli agenti di malattie fogliari e/o dei germogli e di talune necrosi corticali o tracheomicosi, generalmente specifici, spesso a carattere epidemico, contro cui talora si è costretti a ricorrere anche a lotta chimica (Anselmi, 1992).

Su piantine sofferenti o maltrattate in fase di trapianto si hanno spesso attacchi di cancri rameali causati da patogeni corticali da debolezza.

In ogni caso una corretta pianificazione dei vivai forestali ed una loro razionalizzazione rappresentano una indubbia premessa per ottenere materiale sano e per minimizzare le crisi di trapianto (Gradi, 1984)

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

Tra le malattie biotiche ad *habitus* edafico, una ricorrente frequenza in vivaio mostrano i classici marciumi radicali da *Rosellinia* (soprattutto *R. necatrix* Prill.) e *Armillaria* (prevalentemente *A. mellea* (Vahl ex Fr.) P. Kumm.), in particolare nei vivai costituiti in terreni con precedenti focolai di inoculo.

Il mal del pedale o mal dell'inchiostro, da *Phytophthora*, è una malattia radicale che sta presentando una inquietante diffusione, soprattutto su castagno, noce, ciliegio e numerosi arbusti. Le specie più pericolose sembrerebbero *P. cambivora* (Petri) Buis e (rara in Italia) *P. cinnamomi* Rands su *Castanea*, *P. megasperma* Drechsler e *P. cactorum* (Lebert e Cohn) Scröter su *Prunus*, *P. cinnamomi*, *P. cactorum* e *P. cambivora*. su *Juglans* (Belisario, 2004; Belisario *et al.*, 1997), *Phytophthora* spp. su vari arbusti.

È noto come le *Phytophthorae* si diffondano spesso a macchia d'olio, in genere lungo le linee di pendenza, trasportate dall'acqua. È tuttavia probabile che esse possano essere trasportate tramite fango o terreno, anche da mezzi agricoli, animali o dallo stesso uomo, come dimostrato per il mal dell'inchiostro del castagno.

Le tracheomicosi da *Verticillium* (*V. albo-atrum* Reinke & Berthold e *V. dahliae* Kleb.) sono state segnalate essenzialmente su acero e ciliegio (Anselmi N. e Mazzaglia A., 2003), ma possono colpire numerose latifoglie.

Marciumi radicali, mal del pedale e tracheomicosi, dopo una fase di ingiallimento, microfillia e rarefazione della chioma, portano inesorabilmente a morte le piante, talora con vero e proprio colpo apoplettico. E' evidente pertanto come anche attacchi non molto diffusi possano indurre danni ingenti.

Il problema più rilevante per questi patogeni risiede nel rischio di un loro trasporto con le piantine nelle nuove piantagioni.

In questo caso, infatti, anche con attacchi limitati, la loro pericolosità diverrebbe rilevante e destinata ad aumentare fortemente con gli anni, in quanto: 1) molti dei suddetti patogeni sono ubiquitari e pertanto possono adattarsi ai più vari terreni di impianto; 2) ogni nuovo focolaio che si viene ad infeudare rappresenterà una pericolosa fonte di inoculo per altre nuove infezioni e tenderà ad estendersi, sia ad opera dell'acqua che di altri agenti di diffusione, nonché per il contatto radicale tra soggetti malati e soggetti sani, sempre più stretto con l'età.

Malattie della chioma da patogeni specifici.

Le malattie specifiche che infieriscono in vivaio sono assai numerose, alcune caratterizzate da una spinta specificità come le virosi (di raro rilievo), buona parte delle malattie batteriche, per la verità anch'esse poco numerose, e molte malattie fungine fogliari, agenti di necrosi corticali e di tracheomicosi. Qui, ci limiteremo a citare le più pericolose.

Sulle conifere, tra i patogeni potenzialmente più gravi si ricordano: *Seiridium cardinale* (Wag.) Sutton et Gibson su *Cupressus*; *Cronartium ribicola* A. Dietr. su *Pinus strobus*, ora meno importante per il ridimensionamento della specie ospite; *Phaeocryptopus gaumanni* e *Rhabdocline pseudotsugae* Syd. su *Pseudotsuga menziesii*, i cui attacchi sono tuttavia limitati per la diffusione di varietà di douglasia più reattivi al patogeno; *Dothistroma pini* Hulbary su *Pinus radiata*, ricorrenti nel Centro Sud in seguito a stress da siccità; *Lophodermium seditiosum* Minter, Staley & Millar, su pressoché tutte le specie di pino soprattutto in vivaio.

Verso le latifoglie si sottolineano: su noce, la bronzatura da *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & De Not. e la batteriosi da *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (Pierce) Dye; su ciliegio, la cilindrosporiosi da *Cylindrosporium padi* Karsten. ed il corineo da *Sporocadus carpophilus* (Lév.) Arx ; su pioppo, la bronzatura da *Marssonina* spp., le defogliazioni primaverili da *Venturia* spp., le ruggini da *Melampsora* spp.; su salice, l'antracnosi da *Marssonina* e la gloeosporiosi da *Gloeosporium salicis* Sacc., Syll.; su castagno, il cancro corticale da *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.; i mal bianchi da *Microsphaera alphytoides* (Walt. Ex Fr.) Lév. su quercia, da *Uncinula aceris* (DC.) Sacc. e *Phyllactinia guttata* (Wallr.) Lév. su acero e frassino.

Cancri rameali da patogeni di debolezza.

Buona parte di questi patogeni colpiscono piante (o branche) indebolite o sotto stress e per questo rientrano tra quei parassiti denominati opportunistici o di debolezza, questi patogeni inducono necrosi corticali e cancri sul tronco e sui rami, con disseccamenti e seccumi alla chioma.

I principali agenti di questo gruppo di malattie appartiene ai generi *Botryosphaeria*, *Cytospora*, *Fusarium*, *Melanconium*, *Nectria*, *Phomopsis*, etc., su latifoglie, *Diplodia*, *Lachnellula* ed ancora *Nectria* e *Phomopsis* su conifere.

A livello specifico si ricordano *Discosporium populneum* (Sacc.) Sutton su pioppo, *Discella carbonacea* (Fr.) Berk. & Br. su salice, *Botryosphaeria ribis* Gross et Duggar [an. *Dothiorella ribis* (Fuckel) Sacc.], *Phomopsis juglandina* Sacc. Hohm. (tel. *Diaporthe medusae* Nits.), *Cytospora obliceps* Ell. et Kell. e *Melanconis juglandis* (El. et Ev.) Grave su *Juglans*; *Fusicoccum amygdali* Delacr. e *Cytospora leucostoma* (Pers.) Sacc. su *Prunus*.

Sebbene qualche specie sia in grado di colpire anche piante in buono stato, tali fungilli, come già detto, colpiscono in genere impianti poco vigorosi, con difficoltoso "affrancamento", o comunque sofferenti per qualche causa, in particolare per stress da carenza idrica, competizione, danni da freddo, etc.

Il dover attendere che l'ospite si trovi in condizioni di sofferenza per poter sferrare l'attacco, ha determinato per questi patogeni la necessità di sviluppare delle strategie adattative tali da permetterne la sopravvivenza per periodi a volte anche lunghi. In queste fasi, che possono durare anche diversi anni, la conservazione della specie avviene tramite forme di vita saprofitaria a carico dei tessuti morti, sia dell'ospite stesso che di altre specie vegetali (trattasi infatti molto spesso di patogeni polifagi), oppure attraverso fasi endofitiche nei tessuti ospiti come è stato dimostrato per molti funghi

agenti di malattie di debolezza, quali ad esempio *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze. e *Diplodia mutila* (Fr.) Mont., etc. su quercia (Vannini *et al.*, 1996; Kowalsky e Kerh, 1997; Anselmi *et al.*, 2000; Mazzaglia *et al.*, 2002 a e b), *Discosporium populeum* su pioppo (Giorcelli e Vietto, 1994).

Questi microrganismi sono infatti in grado di vivere, anche per lungo tempo, all'interno dei tessuti delle piante sane senza determinare alcuna manifestazione visibile della malattia (endofitismo). Nel momento in cui la pianta viene indebolita da fattori di stress quali inquinamento, carenza idrica, danni all'apparato radicale, attacchi di malattie fungine e/o insetti, questi patogeni riescono ad aggredire, anche con veemenza, a vincere le difese dell'ospite e procedono a colonizzazioni patologiche. Questa caratteristica, ha fatto sì che, nella loro fase di latenza (asintomatica), essi siano stati denominati appunto come "endofiti patogeni". Una tale fase di latenza di indeterminata lunghezza (endofitismo) potrebbe rappresentare, per essi, una vera e propria strategia di sopravvivenza; questo tipo di patogeni, infatti, ricorrendo all'endofitismo avrebbero la possibilità di superare condizioni non favorevoli al loro sviluppo patogenetico quando gli ospiti si trovano in buono stato fisiologico. Inoltre, la presenza endofitica nei tessuti sani renderebbe tali patogeni pronti alla colonizzazione qualora si presentassero condizioni tali da rendere la pianta suscettibile al loro attacco.

Sono a tuttora scarse le conoscenze sulle specie fungine che possono vantare un siffatto comportamento e sui meccanismi che fanno virare il loro *habitus* da endofita innocuo ad endofita patogeno.

1.1.3. LE CRISI DI TRAPIANTO

Il successo di un impianto, oltre che dalla buona scelta della specie, dipende spesso dall'uso di postime di elevata qualità colturale, che consente di utilizzare in pieno le potenzialità produttive della stazione e di limitare al massimo le fallanze (Mercurio e Minotta, 2000).

Nelle piante da poco messe a dimora si verificano, con una certa frequenza, crisi di trapianto, cioè morte delle piante per mancato attecchimento, con sintomatologia diversa a seconda che si tratti di specie caducifoglie o sempreverdi.

Nelle prime i giovani germogli o non si formano oppure, dopo la loro emissione, in varia misura, si afflosciano, imbruniscono e finiscono per morire, disarticolandosi con facilità dal fusto e cadendo a terra al primo vento (figura 1).

Nelle specie sempreverdi, invece, le piante non attecchite o non emettono nuovi germogli o li emettono stentati, appaiono aridi e presto assumono un colore verde pallido, indi color cuoio, color tabacco ed infine brunastro, fino a morire (figura 1).

Come risultato si ha che, in ogni caso, percentuali più o meno elevate di piante muore nella stessa annata dell'impianto, rendendo necessari costosi risarcimenti.

Le crisi di trapianto dipendono in genere da:

- la specie: alcune sono più sensibili di altre alle perdite idriche per traspirazione oppure per difficoltà nella radicazione;
- le condizioni ambientali: per lo squilibrio che si può creare tra le perdite per traspirazione e le disponibilità idriche;
- le modalità operative adottate in vivaio ed al momento della messa a dimora: cure colturali in vivaio, periodo di estirpo, modalità di conservazione tra l'estirpo e la messa a dimora, tipo di trasporto, tecniche di impianto, ecc.

Le crisi si verificano più frequentemente in suoli molto incoerenti, ghiaiosi, a falda acquifera profonda o, al contrario, in terreni asfittici e freddi ed in ogni caso quando non è stato fatto un adeguato riempimento delle buche. Sono noti, ad esempio, i grandi fallimenti di nuovi impianti in annate con primavera siccitose, connesse a mal conservazione delle pioppelle, ritardato trapianto, irrazionale messa a dimora.

Anche le piantine a radice nuda, rispetto a quelle in contenitori, sono più esposte a crisi di trapianto (Mercurio e Minotta, 2000; Minotta, 2003).

Ovviamente le crisi di trapianto più gravi colpiscono le piante senza radici che, quando disidratate, stentano ad emettere un sufficiente apparato radicale, venendo così invasi da parassiti di debolezza e necrosi corticali.

Molto spesso le crisi di trapianto sono dovute a moduli colturali sbagliati per la stazione considerata (Mercurio, 1997); si ricordi, ad esempio, il fallimento di certi impianti di salice e pioppo nelle bonifiche di Arborea in Sardegna, dove si vollero copiare i moduli colturali della Pianura Padana (Pavari, 1956).

In ogni caso, assai frequentemente, sugli organi legnosi delle piantine in crisi si sviluppano patogeni di debolezza, sia insetti (es. *Agrilus*), sia funghi (es. *Phomopsis* spp., *Cytospora* spp., *Fusarium* spp., ecc.), che in genere infliggono il colpo finale alle piante.

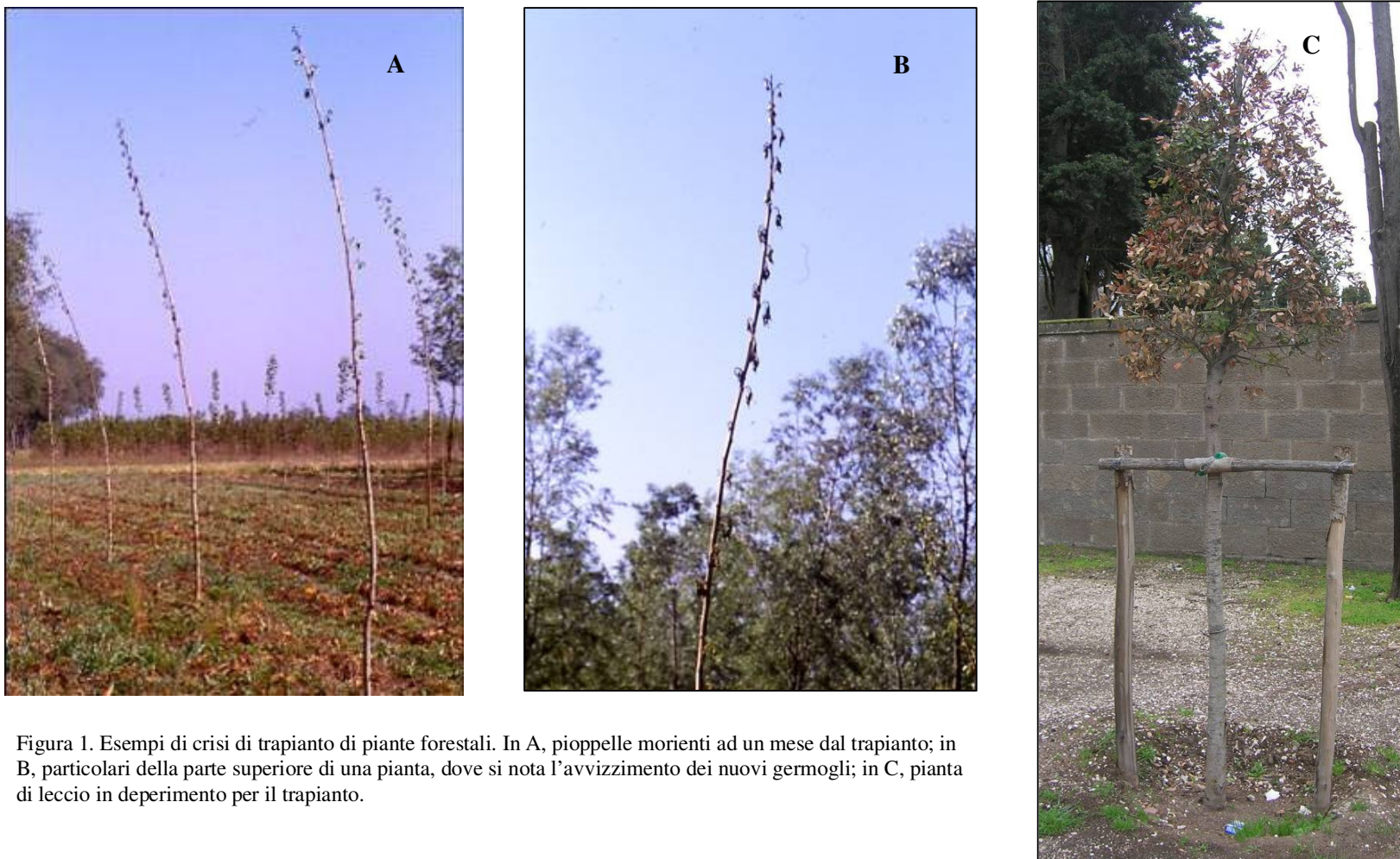


Figura 1. Esempi di crisi di trapianto di piante forestali. In A, pioppelle morienti ad un mese dal trapianto; in B, particolari della parte superiore di una pianta, dove si nota l'avvizzimento dei nuovi germogli; in C, pianta di leccio in deperimento per il trapianto.

Buona parte di tali parassiti di debolezza sono fungilli che attaccano il fusto ed i rami, come agenti di necrosi corticali (vedi il capitolo cancri rameali).

Poiché per vari di tali agenti è stata rilevata la capacità di insediarsi asintomaticamente in piante sane (endofitismo) e rimanere in fase di latenza per lunghi periodi, anche anni, non è escluso che i fungilli corticali che intervengono nelle crisi di trapianto siano già presenti endofiticamente nelle piante prima della messa a dimora e “virino a patogeni” in conseguenza degli stress a cui le piante vanno incontro durante il trapianto.

Far luce su questo fenomeno e sui fattori che lo condizionano, potrebbe essere di grande aiuto per ridurre la presenza dei suddetti endofiti patogeni nelle piante e la loro eventuale negativa influenza sugli attecchimenti delle stesse durante il trapianto.

Per scongiurare il rischio di crisi di trapianto è consigliabile, pertanto, nella messa a dimora del postime, di scegliere cloni o specie a facile radicazione; di impiegare piante sane e ben lignificate; di praticare il trapianto nel periodo di riposo vegetativo, riducendo al minimo il tempo compreso tra l'estirpo e la messa a dimora delle piante evitando che, durante lo stesso, esse siano esposte al sole, al vento o al gelo (fattori esaltanti la disidratazione).

1.2. CENNI SULL'ENDOFITISMO DEI FITOPATOGENI

1.2.1. CONCETTO DI ENDOFITISMO

La parola “endofita” è utilizzata in generale per descrivere un organismo localizzato all'interno dei tessuti di una pianta, in contrapposizione al termine “epifita”, che invece indica un organismo che vive all'esterno dei tessuti (De Bary, 1866).

Rimanendo fedeli a questo concetto, nel passato, buona parte degli studi sugli endofiti ha riguardato prevalentemente microrganismi che vivevano nei tessuti delle piante senza provocare alterazioni patologiche evidenti.

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

Anche la pianta può tuttavia trarre benefici dagli endofiti, almeno indiretti.

La presenza di questi funghi può infatti offrire alla pianta una maggior tolleranza al morso degli animali (effetto *antifeeding*), una maggiore resistenza agli insetti (Cheplick e Clay, 1988; Prestidge e Gallagher, 1988), o a funghi patogeni (White e Cole, 1985;

Christensen e Latch, 1991) e, nel complesso, talvolta, un miglior accrescimento (Clay, 1987). Non si esclude tuttavia che le ife del fungo possano perdere vitalità nel tempo (Wilson e Carrol, 1994).

Diverse sono le piante dalle quali sono stati isolati funghi endofiti, sia erbacee, quali graminacee e altre specie agrarie (Clay, 1987, 1988), ma anche monocotiledoni e dicotiledoni spontanee (Rodolfi *et al.*, 2004), nonché felci e muschi (Petrini, 1986), sia arboree, prevalentemente forestali, vuoi conifere (Carrol G.C., 1978 e Carrol F. E., 1977; Sieber, 1988), vuoi latifoglie (Petrini e Fisher, 1988, 1990; Sieber *et al.*, 1991; Franceschini e Marras, 2002; Ragazzi *et al.*, 2004).

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

Gli endofiti rappresentano una grande riserva di biodiversità e una sorgente di specie non ancora conosciute, così come costituiscono una potenziale e inesauribile riserva di sostanze metaboliche biologicamente attive, contribuendo in tal modo ad assicurare una futura disponibilità di nuovi composti chimici utili all'agricoltura, all'industria, alla medicina, in genere alle attività umane.

1.2.2. GLI “ENDOFITI PATOGENI”

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

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

Sembrerebbe che gli endofiti presentino un ciclo biologico comune, suscettibile però di notevoli variazioni quando si considerano le singole specie fungine nei rispettivi ospiti in ambienti diversi. Detto ciclo può essere così schematizzato: gli endofiti, dopo aver raggiunto l'ospite per mezzo di vettori (vento, acqua, insetti, ecc.), penetrano nei tessuti

attraverso aperture naturali (stomi, lenticelle, ecc.), ferite o micro ferite, nonché (sugli organi verdi) anche direttamente (Paoletti, 2006), rimanendo al loro interno per un periodo indeterminato, più o meno lungo, che viene definito “periodo di latenza”, che in alcuni casi potrebbe essere illimitato. Durante questo periodo il fungo instaura con l’ospite un rapporto trofico, in genere minimo ma talora anche cospicuo, che comunque non danneggia significativamente la pianta. Solo con il viraggio a colonizzazioni patogenetiche, esso finisce per risultare dannoso, se non addirittura letale (Petrini, 1991).

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

Esistono infatti funghi che passano l’intera esistenza all’interno della pianta ospite senza mai crearle danni o manifestare all’esterno sintomi particolari ed altri che, al verificarsi di determinate condizioni fisiologiche della pianta ospite, come l’insorgere di stress o il raggiungimento della senescenza, ne colonizzano i tessuti comportandosi come patogeni (Petrini, 1991; Franceschini e Marras, 2002; Ragazzi *et al.*, 2004).

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

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

Lo studio degli endofiti patogeni ha avuto un forte impulso negli ultimi anni, grazie all’applicazione delle tecniche molecolari, le quali peraltro stanno divenendo sempre più efficaci (Mazzaglia, 1998; Mazzaglia *et al.*, 2001; Luchi *et al.*, 2004).

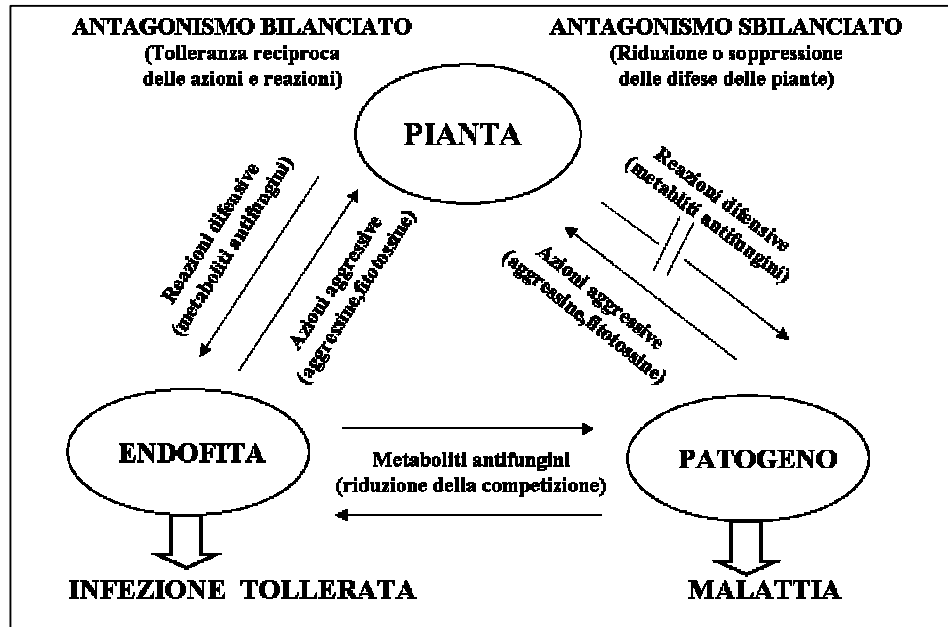
Lo sviluppo delle colonie di endofiti è influenzato da diversi fattori, come le condizioni climatiche e microclimatiche (Fisher *et al.*, 1994; Collado *et al.*, 1999), l’età dei tessuti colonizzati (Petrini 1991) e l’intervento antropico (Sieber, 1988; Helander *et al.*, 1993).

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

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

- l'ospite e le sue caratteristiche ecologiche nonché genetiche. È intuitivo come la capacità di adattamento fenotipico della specie ospite ai cambiamenti climatici e agli
- eventuali stress ambientali (Vannini e Valentini, 1994; Anselmi *et al.*, 2000) è di grande importanza nel determinare il passaggio da un rapporto simbiotico indifferente o mutualistico ad uno chiaramente parassitario. In tali condizioni, sono importanti anche le caratteristiche morfologiche ed ultrastrutturali della pianta ospite, perché le dimensioni delle cellule, lo spessore della parete cellulare, o ancora lo spessore della corteccia possono essere degli elementi discriminatori nei confronti degli endofiti fungini che tentano la colonizzazione;
- il tempo, inteso come spazio temporale in cui si colloca la vita dell'intero ospite o parte di esso, è fondamentale nel determinare l'andamento della simbiosi. In alcune fasi della vita dell'ospite il rapporto simbiotico si trova nello stadio mutualistico, mentre in altre nello stadio antagonistico, come accade spesso nella fase di senescenza della pianta. Il tempo influenza la simbiosi mutualistica o indifferente anche sotto l'aspetto quantitativo; infatti da alcune ricerche effettuate, ad esempio, su foglie di conifere e latifoglie (Suske e Acker, 1990; Magan e McLeod, 1991; Wilson e Carroll, 1994; Fagioli, 1998) si è osservato un aumento del tasso di infezione all'aumentare dell'età della foglia;
- l'ambiente, inteso sia come luogo in cui i simbionti si trovano che come condizioni ambientali sotto le quali gli organismi vivono. Vari fattori ambientali, influenzando direttamente le condizioni fisiologiche della pianta, incidono inevitabilmente sull'andamento del rapporto mutualistico, nonché sul tipo e sulla frequenza dei funghi isolati. Tali influenze risultano maggiori passando da un sito di studio ad un altro. Osservando le frequenze dei funghi isolati, si è notata una variazione delle stesse all'aumentare della quota di campionamento, al diminuire dell'umidità ambientale e/o al diminuire della densità della chioma, che favorisce maggiori escursioni termiche ed una più veloce eliminazione dell'umidità che si forma intorno alla chioma (Sieber, 1988; Fagioli, 1998; Anselmi *et al.*, 2001, 2002, 2004; Petrini e Carroll, 1981; Legault *et al.*, 1989; Rollinger e Langenheim, 1993; Rodrigues, 1994).

Si ritiene opportuno riportare il sottostante schema di Schulz *et al.* (1999), in cui si tenta di spiegare le modalità con le quali un fungo penetrato nella pianta può comportarsi come endofita (non patogeno) o come patogeno.



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

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

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

1.2.3. POSSIBILE RUOLO DEGLI ENDOFITI FUNGINI NELLE CRISI DI TRAPIANTO

Come già accennato, è indubbio che molti patogeni che colpiscono le piante durante la crisi di trapianto possono essere considerati patogeni di debolezza. Tra questi, numerosi sono agenti (fungini) di necrosi corticali dei quali è stata dimostrata la capacità di insediarsi e rimanere lungamente nelle piante sane, come endofiti.

Non è pertanto escluso che tali patogeni si insedino nelle piante in vivaio ed attacchino le stesse durante gli stress che frequentemente si verificano durante le varie fasi del trapianto.

Sono ipotesi plausibili ma ad oggi non riconosciute. Una loro eventuale dimostrazione aprirebbe scenari interessanti soprattutto per quel che riguarda l'influenza delle tecniche colturali e di trapianto sull'incidenza di tali endofiti e delle crisi di trapianto.

È proprio su questo argomento che sono state incentrate le ricerche di questa tesi, prendendo come casi di studio il pioppo ed il leccio (*Populus* spp. e *Quercus ilex*), due generi forestali molto utilizzati e diffusi nelle alberature ornamentali del nostro Paese e con caratteristiche biologiche ed ecologiche molto diverse tra loro.

1.3. DUE CASI DI STUDIO: PIOPPO E LECCIO

Di seguito forniremo alcune informazioni generali sulle suddette due specie forestali, cominciando con il genere *Populus* e seguendo con la specie *Quercus ilex*.

1.3.1. PIOPPO: *Populus* spp.

1.3.1.1. Generalità

Il pioppo, con le sue molto diversificate specie, assume in Italia un'importanza rilevante sia nelle piantagioni industriali da legno che come pianta ornamentale.

Pioppi per la produzione di legno. La pioppicoltura riveste senza ombra di dubbio il ruolo di *leader* nel settore dell'arboricoltura da legno. I pioppi, grazie ai rapidi ritmi di accrescimento ed alla versatilità del loro legname, sono infatti, almeno in Italia, la maggior espressione della coltivazione a scopi produttivi di specie forestali indigene o importate.

Un tempo coltivati in filari ai bordi delle colture agrarie, soprattutto in prossimità delle sponde fluviali (pioppicoltura di ripa), grazie alla ricerca genetica che continuamente produce cloni di sempre maggior produttività, da circa un secolo ha avuto sviluppo la pioppicoltura attuata su ampi appezzamenti di terreno.

Quantunque nell'ultimo ventennio sia andata riducendosi nel tempo, ancora oggi essa vanta nel nostro Paese oltre 100.000 ettari.

La pianura Padana e le zone limitrofe sono in Italia i comprensori più adatti alla coltivazione del pioppo per la presenza di vasti terreni golenali, fertili e con buon rifornimento idrico, ideali per le esigenze edafiche di queste specie.

Qui i turni di produzione sono in genere brevi (10-12 anni) soprattutto per i cloni di *P.nigra* L. e *P. x euramericana* Dode, essendo il *P. alba* L. più lento nella crescita e necessitando quindi di turni più lunghi. Il legname viene in parte avviato all'industria di sfogliati (il 50% del prodotto a fine turno) ed in parte alla produzione di tronchi da sega e di tronchetti da cartiera. In condizioni ottimali, quali quelle della pianura Padana, il pioppo presenta un incremento medio annuo di 20,4 m³ ad ettaro.

Non tutte le specie appartenenti al genere *Populus* si prestano però alla coltivazione: i pioppi che hanno dato e danno i migliori risultati sono senza dubbio il *P. nigra* L. (specie indigena, appartenente alla sezione Aigeiros), il *P. deltoides* Marshall (di origine americana, sezione Aigeiros), l'ibrido *P. x euramericana* Dode (*P. deltoides* x *P.nigra*), e soltanto più di recente il *P. alba* L. (indigeno, sezione Leuce). In pioppicoltura però più che di specie è necessario parlare di cloni (entità subspecifica con identico patrimonio genetico, moltiplicati agamicamente) con i quali vengono generalmente costituiti gli impianti di pioppeti specializzati. Le differenze in fatto di esigenze, ritmi di accrescimento, resistenza agli stress ed alle malattie, capacità di autoradicamento *etc.*, sono spesso molto nette anche fra cloni appartenenti alla stessa specie; ecco dunque spiegata l'importanza, al momento dell'impianto, della scelta del clone più idoneo ad un determinato ambiente. Fra i cloni che attualmente sono coltivati in Italia ricordiamo: I-214, Luisa Avanzo, San Martino (*P. x euramericana*), Lux, Harvard e Onda (*P. deltoides*), Jean Pourtet (*P. nigra* L.). Il pioppo bianco (*P. alba* L.) diffuso per lo più come pianta ornamentale, risulta coltivato in pieno campo quasi esclusivamente in Toscana.

I pioppeti vengono costituiti utilizzando materiale moltiplicato agamicamente, prevalentemente astoni (pioppelle a cui viene asportato l'apparato radicale) di uno o, più spesso, di due anni. Le densità di impianto variano fra 250 e 300 piante ad ettaro. Le

pioppelle di cui sopra vengono allevate in vivaio (a sua volta costituito da talee), circa 10.000 per ettaro, con spaziature di circa 50 cm x 2,0 m. Soltanto negli impianti ad elevata densità, (circa 8.000 ad ettaro) destinati a biomassa per energia, vengono utilizzate talee.

Oggi d'altra parte è di grande attualità ed interesse l'impiego del pioppo nelle SRF (*Short Rotation Forestry*), ossia nelle colture a turno breve finalizzate alla produzione di biomassa per energia.

Le cure colturali riservate ai pioppeti comprendono le concimazioni (in precedenza viene fatta una concimazione di fondo), le irrigazioni, alcune sarchiature, che servono anche per eliminare le malerbe, e le potature (tali da ottenere al 5°-7° anno piante con buona parte del fusto esente da rami). In alcuni casi è indispensabile ricorrere a trattamenti antiparassitari. Per ridurre il numero di questi ultimi, riveste ancora una volta molta importanza la scelta del clone prima dell'impianto, potendo così mirare ad una resistenza genetica ai parassiti più pericolosi nella zona. A tutt'oggi, nessun clone è resistente a tutte le avversità che colpiscono il pioppo siano esse fungine (bronzatura, ruggini, necrosi corticali, defogliazione primaverile) che di altra natura (insetti, danni da vento, virus, malattia delle macchie brune). In relazione a questo aspetto giova ricordare come alcuni cloni altamente produttivi (es. Luisa Avanzo e il gruppo dei "pittori") siano usciti ridimensionati dall'enorme suscettibilità verso alcune malattie, quali le macchie brune del tronco e le necrosi corticali in genere. Anche l'I-214, ancora oggi il clone più diffuso per la grande produttività mostrata, ha presentato un'alta sensibilità nei confronti della bronzatura da *Marssonina brunnea* (El. et Ev.) P. Magn., ma proprio le grandi produzioni raggiungibili rendono economicamente vantaggiosi gli interventi chimici in caso di forti attacchi. Tutto questo suggerisce l'impiego di più cloni all'interno di uno stesso impianto (pioppicoltura a mosaico), così da ricorrere a trattamenti in caso di attacchi massicci di un patogeno, solo sugli appezzamenti caratterizzati da cloni più sensibili.

Pioppi ornamentali. Il genere *Populus* costituisce anche uno degli elementi caratterizzanti il patrimonio del verde pubblico in molte aree e città del nostro Paese. Anche nel Lazio esso è molto presente, soprattutto in quei centri abitati situati sulle rive di laghi (es. lungolago di Bolsena e di Vico in provincia di Viterbo) o attraversati da fiumi o torrenti, o che sono caratterizzati da vallecole in cui permane maggiore umidità del suolo (es. Rieti).

Per il suo rapido accrescimento esso viene spesso impiegato per creare rapidamente zone d'ombra e, soprattutto, barriere di cui sono esempi frequenti taluni filari finalizzati ad isolare luoghi particolari (industrie, fabbricati agricoli, *etc.*) dal resto del contesto.

Le specie più utilizzate in ambiente urbano sono senza dubbio *Populus alba* L. e *Populus nigra* L. (specialmente la varietà *italica*, ed il clone Jean Pourtet, quest'ultimo molto interessante perché maschile e quindi privo di "cotone", sempre fastidioso) nonché taluni ibridi di quest'ultimo con *P. deltoides* Bartr. ex Marsh., i noti *P. x euramericana* (Dode) Guinier, oggi ridenominati *P. x canadensis* Moench. (es. i cloni I-214, Luisa Avanzo, oppure i cosiddetti "Canadesi", ecc.). Sorvoliamo in questa sede sui Pioppi tremuli (*Populus tremula* L.), che tuttavia si riscontrano spesso in parchi ed alberate urbane di varie zone montane.

1.3.1.2. Cenni sulle specie più utilizzate

Diamo di seguito alcune brevi notizie sulle principali specie di pioppo utilizzate in Italia sia in arboricoltura da legno sia come piante ornamentali, rimandando la descrizione dei cloni presenti nell'impianto considerato al capitolo sui materiali e metodi:

- a) *Populus nigra* (Pioppo nero europeo), di origine eurasiatica, è diffuso in tutta la regione temperata dell'Europa e dell'Asia centro occidentale, fino all'Africa settentrionale. Si dimostra essere specie eliofila e mediamente termofila, in grado di colonizzare anche ghiaioni e terreni alluvionali, anche se predilige comunque suoli freschi profondi e sciolti. Specie a rapido accrescimento, sopporta poco i ristagni d'acqua (Gellini e Grossoni, 1997).
- b) *Populus deltoides* (Pioppo nero americano), è originario del Nord America dove è presente con numerose forme varietali in tutto il territorio ad Est delle Montagne Rocciose, ha caratteristiche ecologiche simili al precedente con il quale si ibrida (appartengono entrambi alla sezione Aigeiros).
- c) *Populus x canadensis*, è la grande specie polimorfa nata dall'incrocio delle precedenti, ogni individuo presenta caratteristiche ecologiche diverse in funzione delle provenienze dei genitori.
- d) *Populus alba* (Pioppo bianco), originario dello stesso territorio del *P. nigra* L., si dimostra essere ugualmente eliofilo e forse più termofilo di questo, presenta minore rusticità in fatto di suolo ma sopporta meglio periodi di asfissia radicale dovuta alla sommersione del terreno.

1.3.1.3. Le malattie del pioppo

Su pioppo, anche ornamentale (Castellani e Anselmi, 1980), oltre a una virosi da PMV (*Poplar Mosaic Virus*), si possono annoverare malattie di origine fungina tra le più diffuse e gravi in campo forestale, quali i marciumi radicali, alcune micosi della chioma e a vari agenti di necrosi corticali (FAO, 1980; Autori vari, 1981; Cellerino, 1986; Anselmi 1991;).

Sui pioppi coltivati per legno, di notevole importanza riveste la malattia delle cosiddette “macchie brune”, fenomeno ad eziologia complessa ed incerta, sui cui tuttavia soprassediamo in questa sede, in quanto tipica dei pioppi adulti (Anselmi, 1979).

Marciumi radicali da *Rosellinia* spp. e *Armillaria* spp.

Gli attacchi di *Rosellinia* (soprattutto *R. necatrix* Prill.) sono molto frequenti nelle piantagioni dell'Italia settentrionale, specialmente in terreni sciolti e sabbiosi sottoposti a sbalzi della falda acquifera. Su piante ornamentali e soprattutto al centro-sud invece prevalgono le aggressioni di *Armillaria* spp., prevalentemente *A. mellea* (Vahl. Fr.) Kummer, soprattutto in terreni compatti e asfittici, caratterizzati da ristagni idrici o su piante annose o sofferenti per altre problematiche. *Armillaria* infatti, in presenza di buone condizioni delle piante, non è in genere pericolosa, mentre può diventarlo su individui senescenti e/o indeboliti, portandoli spesso a morte. Tuttavia, in presenza di alta pressione d'inoculo, unita ad elevata umidità del suolo e all'indebolimento delle piante, si può assistere ad una espansione a macchia d'olio della malattia a partire dai focolai d'infezione, con aree danneggiate spesso estese.

Malattie della chioma. Fra le malattie fungine che colpiscono la chioma si possono ricordare (Autori vari; 1981):

- la defogliazione primaverile, causata da *V. populina* (Vuill.) Fabr. (Cellerino *et al.*, 1977) su *P. nigra* e *P. x euramericana* e da *V. macularis* (Fr.) E. Müller & Arx su *P. alba*, colpisce le piante in primavera, specialmente nel Nord Italia o nei centri situati ad una certa altitudine, in annate piovose e con recrudescenze in freddo. Essa provoca disseccamenti di foglie e germogli, che si ripiegano ad uncino, nonché piccoli cancri ai rametti, producendo vaste defogliazioni delle chiome. Ne consegue una riduzione dello sviluppo ed un aspetto generale sofferente della pianta. Sebbene con l'avvento dell'estate le piante si rivestano di nuova vegetazione, in caso di attacchi ripetuti per più anni si possono manifestare seccumi della chioma anche intensi.

- la bronzatura è causata da *Marssonina brunnea* sui pioppi euramericani, *M. popul-nigrae* (Lib.) Kleb. sul pioppo nero e da *M. castagnei* (Desm.) Magnus sul pioppo bianco (Cellerino, 1984);

- le ruggini, causate dal genere *Melampsora*, ed in particolare *M. allii-populina* Kleb. e *M. larici-populina* Kleb. (Gennaro, 1993) su *P. x euramericana* e *P. nigra*, *M. pulcherrima* Maire, *M. rostrupii* Wagn. e *M. pinitorqua* (Braun) Rostr. sui pioppi bianchi e tremuli.

Queste malattie sono estremamente rilevanti sui pioppi coltivati a scopo produttivo, specialmente *P. x euramericana*, tanto che si è cercato più volte di ottenere cloni che potessero resistere a questi patogeni. Il successo in questo campo però è stato sempre parziale, per la comparsa di sempre nuove razze fisiologiche, soprattutto per quanto riguarda i pioppi della sezione *Aigeiros*, che sono quelli economicamente più importanti (Giorcelli *et al.*, 1996).

Necrosi corticali di rami e fusto. Sono malattie provocate per lo più da “patogeni di debolezza”, quali ad esempio tra i più frequenti *Phomopsis* ssp. (*P. pallida* (Fck.) Sacc., *P. tirrenica* Moriondo, *P. populina* Vogl., *etc.*) *Cytospora* spp. (*C. crhyosperma* (Pers.: Fr.) Fr., *C. ambiens* Sacc., *C. nivea* (Hoffm.) Sacc., *etc.*), *Discosporium populeum* (Sacc.) Sutton (= *Dothichiza populea* Sacc. & Briard), *Fusarium lateritium* Nees e *F. solani* (Mart.) Sacc. Essi colpiscono prevalentemente piantine in fase di trapianto o di affrancamento, nonché rami senescenti o deperienti e in disidratazione (Cellerino, 1986; Anselmi, 1990). Anche in questo caso non è insolito osservare seccumi, anche generalizzati. *Discosporium populeum*, di cui è stata dimostrata una lunga fase endofitica nelle piante (Giorcelli e Vietto, 1994), colpisce soprattutto nel Nord del Paese, gli altri risultano invece più ubiquitari.

1.3.1.4. Gli endofiti patogeni su pioppo

Le indagini relative agli endofiti fungini del pioppo sono ancora piuttosto limitate. Nasini, nel 2003, con una parte delle ricerche relative alla sua tesi di Dottorato, condotte su pioppi adulti, per lo più spontanei e situati in aree ripariali di due zone dell’alto Lazio (Viterbo e Bagnoregio), dimostrò come fossero presenti numerosi endofiti, patogeni e non, nei tessuti corticali di rami di uno e tre anni e nelle gemme. La percentuale degli isolamenti muti si è aggirava infatti sul 15-20%. (Nasini, 2003).

Le tipologie fungine riscontrate con tali indagini rimasero pressoché invariate nei campionamenti effettuati nei mesi invernali e primaverili mentre risultarono variare in funzione dell'organo campionato.

Fra i *taxa*, i più frequenti risultarono *Alternaria*, *Cladosporium* e *Aureobasidium pullulans*, tra i non patogeni, e *Fusarium lateritium* (>10%), *Phomopsis* (quasi certamente *P. tirrenica*) ed *Entoleuca mammata* Rogers et Ju. tra gli agenti di necrosi corticali. L'incidenza delle diverse specie, come accennato, era variabile in funzione degli organi campionati; in particolare, nei tessuti legnosi aumentavano quelle degli agenti di necrosi corticali, mentre le frequenze di isolamento delle specie non patogene erano più elevate nelle gemme.

Merita di essere sottolineato come non siano mai stati riscontrati allo stato asintomatico i due importanti agenti di necrosi corticali del pioppo, *Cytospora* spp. e soprattutto *Discosporium populeum* (Nasini *et al.* 2006), sebbene per quest'ultimo fosse già nota la presenza di una lunga fase endofitica nei tessuti (Giorcelli e Vietto, 1994).

Altro interessante elemento rilevato da Nasini fu l'assenza, in tutti i monitoraggi effettuati, di *Venturia populina* allo stato endofitico in tessuti asintomatici, anche in presenza di cancreti porzioni limitrofe della pianta; questo ha permesso di escludere l'*habitus* endofitico di questo patogeno.

Pressoché nulle sono invece le indagini nei vivai o sulle piante in fase di trapianto.

1.3.1.5. Crisi di trapianto del pioppo

Come sopra accennato, i pioppeti o gli impianti di pioppo ornamentali vengono costituiti con astoni, di uno o due anni, raramente con pioppelle radicate. Allevate in vivaio, le pioppelle vengono trapiantate durante la stagione di riposo, soprattutto in tardo autunno o nel mese di marzo. La messa a dimora viene in genere effettuata in buche aperte con la trivella, profonde 60-70 cm nel caso di pioppelle di un anno, 80-100 cm per quelle di due anni. Il diametro delle buche si aggira su i 40-50 cm, nel caso di pioppelle con radici, su i 15-20 cm nel caso di astoni.

Quantunque in genere il pioppo presenti una facile radicazione, non sono infrequenti crisi di trapianto per mancato attecchimento sia nell'arboricoltura da legno sia negli impianti ornamentali.

La crisi di trapianto è in genere legata alla specie o clone considerato, in particolare alla relativa capacità di radicare, alla rusticità verso ambienti ostili, alla resistenza verso

taluni patogeni corticali, alle caratteristiche del materiale vivaistico, all'età delle pioppelle, allo stato di idratazione delle stesse, all'accuratezza della messa a dimora.

Le incidenze più gravi di crisi di trapianto interessano in genere le pioppelle di due anni, soprattutto quando eccessivamente sviluppate o mal lignificate e/o appartenenti a cloni a scarsa attività rizogena, o particolarmente suscettibili ad agenti di necrosi corticali. Tra le specie di *Populus* a difficoltosa radicazione si annoverano *P. alba*, *P. tremula* e, tra i cloni coltivati negli impianti industriali da legno, *P. deltoides*, con i suoi cloni commerciali Harward, Onda, Lux, S. Martino.

Proprio per questo motivo, ad esempio, molti impianti dei suddetti cloni di *P. deltoides*, quantunque resistenti a *Discosporium populeum*, spesso andavano incontro a completi fallimenti con attacchi generalizzati di suddetto patogeno (Cellerino e Anselmi, 1978, 1980). La germogliazione delle pioppelle, non accompagnata da una sufficiente radicazione, causando una auto-disidratazione delle pioppelle, scatena lo sviluppo del patogeno, con morie più o meno generalizzate.

Viceversa, alcuni cloni di *P. x euramericana*, notoriamente facili ad attecchire, vanno spesso incontro a crisi di trapianto per elevata suscettibilità a *D. populeum*. Ad esempio, buona parte dei cloni del gruppo cosiddetto dei Pittori, a cominciare dal L. Avanzo, andavano incontro a forti fallimenti all'impianto per l'infierire delle necrosi corticali, soprattutto da *D. populeum* (Anselmi, 1986, 1990, 1991; Anselmi e Giorcelli, 1989; Cellerino, 1986).

In ogni caso, nelle crisi di trapianto, agli attacchi di *D. populeum*, in particolare sulle piante più disidratate, si accompagnavano spesso infezioni di *Cytospora* (*C. chrysosperma*) di *Phomopsis* (*P. pallida*) e sporadicamente di *Fusarium* spp.

Geograficamente, in passato, mentre *Discosporium* era soprattutto diffuso nel Nord Italia (Anselmi, 1986), *Cytospora* e *Phomopsis* risultavano infierire soprattutto nel Centro-Sud, dove *Discosporium* interveniva assai sporadicamente (Autori vari, 1981; Anselmi, 1986).

Gli attacchi di *Discosporium populeum* classicamente si sviluppavano a livello del cercine di separazione tra la parte di pioppella di uno e quella di due anni, nonché nei punti di inserzione dei rami.

Gli attacchi degli altri funghi, pur prediligendo le cicatrici dei rami, possono svilupparsi in qualsivoglia parte della pioppella.

Nei riguardi di *D. populeum* è stato dimostrato che le infezioni possono verificarsi molto prima della comparsa di necrosi, mantenendosi allo stato asintomatico nei tessuti sani per lungo tempo (Giorcelli e Vietto, 1994).

È stato addirittura rilevato che le infezioni endofitiche si verificano in genere durante le piogge primaverili (mesi di maggio e giugno), per poi comparire con gli attacchi nella primavera degli anni successivi.

In genere le pioppelle di un anno attecchiscono maggiormente di quelle di due anni; queste ultime falliscono soprattutto in caso di impianti superficiali o di disidratazione delle piante. In questi casi la mortalità in fase di trapianto può essere molto elevata, fino a raggiungere anche il 40-60%.

In qualche caso detta disidratazione è conseguente alla scarsa o mancata radicazione (terreno asfittico, mancato riempimento delle buche, *etc.*) che impedisce il rifornimento d'acqua ai nuovi germogli, i quali pertanto sono costretti ad utilizzare l'acqua presente nel fusto, disidratandolo. In ogni caso le pioppelle non attecchite o morenti vanno incontro ad attacchi di patogeni corticali, che si giovano di tale disidratazione.

Sui pioppi ornamentali, nel nord Italia, almeno in passato, il patogeno corticale più ricorrente nelle crisi di trapianto era *D. populeum*, con vistose e tipiche fruttificazioni. Nell'Italia centro meridionale le fruttificazioni più ricorrenti erano invece di *Cytospora* spp. e *Phomopsis* spp. Rari gli attacchi di *Fusarium* spp..

Come già accennato in precedenza, per limitare l'incidenza delle crisi di trapianto è consigliabile, nella messa a dimora delle pioppelle, scegliere cloni o specie a facile radicazione ed impiegare piante sane e ben lignificate; praticare il trapianto nel periodo di riposo vegetativo, riducendo al minimo il tempo compreso tra l'estirpo e la messa a dimora degli astoni evitando peraltro che in questo lasso di tempo esse siano esposte al sole, al vento o al gelo, fattori che accentuano la disidratazione. Sono necessari, inoltre, una buona preparazione del suolo, un impianto a dovuta profondità (anche fino a 2-3 m nei suoli sabbiosi o ghiaiosi a falda profonda e non più di 1 m in quelli compatti e asfittici) ed un accurato accostamento del terreno lungo tutta la porzione di fusto interrata. Quando si teme che il materiale d'impianto abbia subito una pericolosa disidratazione, è buona prassi immergerlo in acqua per almeno 4-5 giorni e, quando molto ricco di gemme, di spuntarlo per 50-150 cm.

1.3.2. LECCIO. *Quercus ilex*

1.3.2.1. Generalità

Il genere *Quercus* è rappresentato, nelle regioni temperate dell'emisfero settentrionale, da circa 300 specie, molte delle quali diffuse in Europa, prevalentemente caducifoglie. In Italia questo genere annovera alcune tra le latifoglie forestali più diffuse in formazioni boschive, sia caducifoglie (*Q. cerris* L., *Q. pubescens* Willd., *Q. robur* L., ecc.) sia specie sempreverdi (*Q. ilex* L., *Q. suber* L.). Le querce sono tuttavia molto utilizzate anche come ornamentali.

Tra le querce sempreverdi, *Quercus ilex* gode di un posto preminente, sia in bosco (basti pensare alla macchia mediterranea), sia nei parchi e nelle alberate ornamentali. Esso è specie estremamente longeva (500-1000 anni), che raggiunge i 25 m d'altezza e supera il metro di circonferenza. E' specie frugale, moderatamente igrofila ma allo stesso tempo molto xerotollerante e relativamente termofila. Il suo areale è circummediterraneo.

Il leccio, per la sua frequenza, per la sua statura e per il potere di dominanza, è la specie più qualificante della vegetazione del Mediterraneo (Bernetti, 1995). In Italia è diffusa in particolare nelle isole e nelle regioni costiere tirreniche e ioniche, essendo specie tipica dei querceti sempreverdi mediterranei (vegetazione della fascia mediterranea temperata). Come formazioni boschive, l'inventario forestale nazionale del 1985 riporta una superficie intorno ai 300.000 ettari.

Nel Lazio il leccio va dal livello del mare fino ad oltre 1000 m sul livello del mare.

Nei boschi esso è diffuso soprattutto come cedui o arbusteti, andando a costituire le note "macchie a leccio".

Il leccio è tuttavia diffuso anche sottoforma di fustaia, generalmente in parchi ricreativi e alberate ornamentali.

Come pianta ornamentale il leccio domina in molti dei parchi e delle città centro meridionali. A Roma e nella provincia, ad esempio, sono numerosissime le alberate a leccio, sia in filari sia in raggruppamenti (es. Villa Borghese, Castel Fusano, Castel Porziano, ecc.).

1.3.2.2. Le malattie del leccio

Malattie fogliari e delle chioma. La malattia più diffusa e grave tra le specie del genere *Quercus* è il mal bianco da *Microsphaera alphitoides* Griff. et Maubl. (an. *Oidium quercinum* Thum.). Prediligendo, come tutti gli oidi, foglie giovani, temperature elevate e ambienti secchi, gli attacchi risultano particolarmente gravi in vivaio e nelle giovani piantagioni, dove massicce emissioni di foglie continuano anche nel periodo estivo. Cionondimeno *Q. ilex* solo raramente subisce danni rilevanti.

Frequenti, ma quasi mai particolarmente dannosi, sono anche gli attacchi di antracnosi da *Apiognomonium quercina* (Kleb.) Höhn e di maculature fogliari da *Mycosphaerella maculiformis* (Pers.) J. Schröt. L'antracnosi si manifesta soprattutto nei periodi freschi e piovosi e colpisce le foglie e i giovani rametti; sulle foglie compaiono inizialmente piccole macchie, soprattutto a carico delle nervature principali, successivamente queste si estendono e confluiscono; le zone colpite necrotizzano e disseccano. Le maculature fogliari da *Mycosphaerella maculiformis* sono caratterizzate invece da aree brunastre, talora confluenti, che in seguito necrotizzano; in caso di forti infezioni le foglie possono cadere precocemente.

Le due malattie più gravi, anche in vivaio, sono invece le necrosi fogliari da *Elsinoe quercus-ilex* (Arn.) Jenk & Goid e *Phyllosticta ilicina* Sacc.

Elsinoe quercus-ilex è una malattia che interessa la pagina superiore delle foglie con macchie di diametro di 2-5 mm, di colore nocciola con margine brunastro; intorno alle macchie può essere presente un bordo depigmentato. Questo patogeno viene controllato in modo diretto solamente in vivaio, in condizione di coltivazione intensiva, dove i danni possono essere più rilevanti, con trattamenti alla vegetazione.

Phyllosticta ilicina si manifesta con la deformazione della pagina fogliare, la quale, con il tempo, assume una colorazione grigio cenere, necrotizza e finisce per cadere prematuramente. Gli attacchi colpiscono anche i germogli, che arrestano il loro sviluppo e si alterano vistosamente, incurvandosi e necrotizzando.

Marciumi radicali da *Rosellinia* spp. e *Armillaria* spp. Questi agenti patogeni fungini, estremamente diffusi, in presenza di buone condizioni delle piante non sono in genere pericolosi, mentre possono diventarlo su individui senescenti e/o indeboliti, portandoli spesso a morte. Tuttavia, in presenza di alta pressione d'inoculo, unita ad elevata umidità del suolo e all'indebolimento delle piante, si può assistere ad una espansione a

macchia d'olio della malattia a partire dai focolai d'infezione, con aree danneggiate spesso estese.

Carie del legno. Diverse sono le specie fungine agenti di carie riscontrate su *Quercus ilex*, in particolare su piante ornamentali annose. Tra queste ricordiamo in particolare *Fomes* spp., *Polyporus* spp., *Ganoderma* spp., *Phellinus* spp. Molto spesso il legno disgregato dalle carie viene invaso da insetti xilofagi, tra cui il più diffuso è il cerambicide *Cerambyx cerdo* L., in grado di devastare sia l'alburno che il legno delle piante.

Cancri e necrosi corticali. Numerosi sono gli agenti di cancri e necrosi corticali del leccio, causa di necrosi e lesioni cancerose a carico di germogli, rami e altri organi legnosi, con conseguenti seccumi alla chioma o disseccamenti anche di grosse branche. Tra tali agenti si annoverano *Epidochium ilicinum* Goid. & Camici, *Diplodia mutila* (Fr.) Mont., *Botriosphaeria* spp., *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze, *Phomopsis* spp., *Cytospora* spp., *Phoma* spp., ecc.

Buona parte di tali fungilli sono patogeni di debolezza che colpiscono organi o piante sofferenti, sotto stress.

Come per le querce caducifoglie, anche su leccio detti patogeni opportunistici sono saliti alla ribalta nell'ultimo trentennio come fattori determinanti nel noto fenomeno "deperimento del leccio" (vedi poi). Spesso essi si riscontrano anche su piantine che sono andate incontro a crisi di trapianto. Per molti di essi è stata dimostrata la capacità di insediarsi nelle piante sane come endofiti, per poi colpire quando le stesse vanno incontro a perduranti stress (Franceschini e Marras, 2002; Ragazzi *et al.*, 2004).

Il deperimento del leccio. Dagli anni '80 stiamo assistendo alla morte di centinaia di individui, di diversa età, delle diverse specie del genere *Quercus*, lungo tutta la penisola, connessa al noto "fenomeno deperimento delle querce", con il coinvolgimento di numerosi parassiti di debolezza, sia insetti, sia agenti di marciumi radicali o carie, sia agenti di cancri o necrosi corticali (Autori vari, 1990; Luisi *et al.*, 1992; Bussotti *et al.*, 1992; Dreyer e Assenac, 1996; Ragazzi *et al.*, 2000).

Predisposto da vari fattori stagionali (terreni ostili, pascolo, ecc.) e selvicolturali (età avanzata, competizioni, ecc.), il fenomeno in Italia risulta scatenato principalmente dalle frequenti e prolungate siccità degli ultimi anni, che causano stress e squilibri fisiologici alle piante. Esse, così indebolite, vengono aggredite da vari parassiti di debolezza e finiscono per morire.

Tra i suddetti patogeni di debolezza spiccano i numerosi agenti di cancri e necrosi corticali precedentemente citati, molti dei quali, come accennato, sono già presenti nelle piante allo stato asintomatico, endofitico (Anselmi et al., 2000, 2002, 2004; Ragazzi *et al.*, 2003; Franceschini *et al.*, 2002).

1.3.2.3. Gli endofiti su leccio

Le ricerche sugli endofiti del leccio, essenzialmente su piante adulte, sono numerose, sia in bosco (Fischer *et al.* 1994; Collado *et al.*, 1996, 1999; Anselmi e Mazzaglia, 2005; Librandi, 2006; Ravaioli, 2006 b, 2007) sia su piante ornamentali (Nasini, 2003). Buona parte di detti studi avevano lo scopo di correlare la presenza di endofiti patogeni con il fenomeno del “deperimento delle piante”.

Le specie fungine riscontrate su piante sane sono numerose, sia apparentemente innocue (*Botrytis* sp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* sp., ecc.), sia patogene (*Biscogniauxia mediterranea*, *Phomopsis quercina* (Sacc.) Höhn, *Discula* spp., ecc.). Riguardo a questi ultimi, i generi e le specie endofite sono svariati, con associazioni ed incidenze che sono risultate dipendere dall’organo, dalle singole piante e dal relativo stato sanitario, dallo stato di deperimento o meno del bosco, dalla stazione, dalla distanza da fonti di inoculo (Nasini, 2003).

1.3.2.4. Crisi di trapianto del leccio

I nuovi impianti a leccio sono annualmente numerosi, sia come rimboschimenti sia soprattutto come piante ornamentali. Commercializzate generalmente da vivaisti privati e solo in piccola parte da enti pubblici (Regioni, Province, CFS), le piantine che ogni anno sono messe a dimora sono centinaia di migliaia.

Gli impianti vengono in genere costituiti con piantine di 3-4 anni, con pane di terra, in buche profonde 70-80 cm.

Cionondimeno, soprattutto nelle alberate ornamentali, vengono talora utilizzate anche piante di 8-10 anni, con rilevanti dimensioni.

Anche nel caso del leccio non sono infrequenti mancati attecchimenti delle piante dopo la messa a dimora. Essi sono in genere legati a dimensioni eccessive delle piante, ad uno squilibrio tra chioma e radici, ad una irrazionale messa a dimora o a scarse cure colturali post impianto.

Fisiologicamente, nella maggior parte dei casi la moria delle piante è dovuta ad una disidratazione dei tessuti, che può essere dovuta ad una prolungata esposizione delle stesse all'aria, al vento e al sole, oppure ad una eccessiva traspirazione della chioma non bilanciata da adeguato assorbimento dell'acqua, nonché infine a prolungate siccità dopo il trapianto, non compensate da irrigazioni di soccorso.

Molto spesso la morte della pianta sopraggiunge dopo una fase di deperimento della medesima, con rarefazione della chioma e seccumi più o meno diffusi. Su piante sofferenti frequentemente si riscontrano attacchi di necrosi corticali, con disseccamenti dei germogli o rami colpiti e talora con fruttificazioni dei patogeni implicati. Tra questi ricordiamo in particolare *Phomopsis* spp., *Cytospora* spp., *Diplodia* spp., *Phoma* spp., le medesime specie implicate nel fenomeno del "deperimento".

Nelle crisi di trapianto pertanto, come già accennato per il pioppo, si presume che tali patogeni possano insediarsi asintomaticamente nelle piantine in vivaio, come endofiti, per poi scatenare attacchi patogenici in caso di sofferenza delle piante durante il trapianto. Tuttavia, ad oggi, non esistono studi al riguardo.

2. SCOPI DELLA TESI

Come sottolineato in premessa, le crisi di trapianto hanno sempre rappresentato un rilevante problema nella messa a dimora di piante forestali, soprattutto in quelle a scopo ornamentale, con perdite di tempo e di denaro talvolta assai consistenti. Molto spesso dette morie sono connesse ad attacchi di patogeni fungini corticali, che si manifestano in fase di germogliazione e la cui origine viene in genere attribuita ad inoculo sopraggiunto durante il trapianto o direttamente sulle piante già a dimora.

Studi relativamente recenti hanno tuttavia dimostrato come molti di tali patogeni corticali di debolezza possano insediarsi asintomaticamente nei tessuti delle piante sane e siano in grado di rimanere latenti, allo stato endofitico, per lunghi tempi, anche anni, virando a patogeni solo in caso di stress delle piante medesime. È pertanto presumibile che ciò si verifichi anche per i patogeni che contribuiscono alle crisi di trapianto.

Le conoscenze sull'eventuale verificarsi di questo fenomeno sono tuttavia molto scarse. Scopo di questa Tesi era quello di condurre indagini sugli aspetti endofitici degli agenti di cancri corticali sulle giovani piante legnose durante le fasi vivaistiche e d'impianto, cercando di fornire chiarimenti sul loro insediamento asintomatico nei tessuti legnosi

delle piantine sane in vivaio, sui relativi fattori condizionanti e sul loro eventuale coinvolgimento nella crisi di trapianto.

Al fine di cui sopra, sono stati presi in esame due generi forestali, diversi tra loro, frequentemente utilizzati (sia pur in diversa misura) negli impianti ornamentali e spesso soggetti a gravi crisi di trapianto: il pioppo (*Populus* spp.) e il leccio (*Quercus ilex*).

Il genere *Populus* è stato scelto in rappresentanza di latifoglie a foglia caduca, diffuso sia in arboricoltura da legno, sia come pianta ornamentale, caratterizzato da un rapido accrescimento, presente in commercio come materiale clonale, sotto forma di talee od astoni, e pertanto in grado di garantire una elevata omogeneità genetica.

Quercus ilex è stata scelta in rappresentanza delle latifoglie sempreverdi, dal lento accrescimento, diffusa in boschi più o meno estensivi, compresa la macchia mediterranea, ma molto impiegato anche nel verde urbano, soprattutto nelle regioni centro-meridionali, in commercio come piantine da seme, con pane di terra.

La scelta del pioppo, con il suo accrescimento estremamente rapido, ci ha permesso di poter seguire nel breve lasso di tempo (tre anni) di questo Dottorato tutte le varie fasi fenologiche e di sviluppo delle pioppelle, condizione che non sarebbe stata riproducibile con specie a crescita lenta, peraltro, quantunque esso sia uno dei generi forestali più studiati, ancora poco si conosce riguardo ai microrganismi endofiti, patogeni e non, in grado di insediarsi nelle relative piante sane.

L'opzione del leccio, invece, è stata dettata in primo luogo dall'importanza che questa specie riveste nel contesto del verde ornamentale e dal conseguente interesse da parte del Comune di Roma, ente finanziatore di questo Dottorato. Caratterizzata da una crescita estremamente lenta e da un'ecologia molto diversa dal pioppo, a differenza di questa, *Q. ilex*, è già molto studiata per quanto riguarda la flora endofitica delle piante adulte. Anche per questa specie tuttavia poco si conosce relativamente agli endofiti patogeni che possono insediarsi sulle piante durante la fase vivaistica e le conseguenze che essi possono avere nell'attecchimento delle piante al trapianto.

Con queste ricerche in primo luogo si è voluta rilevare l'eventuale presenza, allo stato asintomatico, di endofiti fungini all'interno dei tessuti sani nei vari stadi di sviluppo delle piantine a partire dai semi e dalle talee. Focalizzando indi le ricerche sugli endofiti patogeni, notoriamente implicati nelle crisi di trapianto, in particolare tra gli agenti di necrosi corticali, si sono voluti rilevare l'epoca, le modalità di insediamento e la distribuzione nelle piantine e verificare quali fattori possano condizionare l'incidenza, le associazioni e l'eventuale ruolo nelle crisi di trapianto.

I nostri studi, poiché finanziati da una Amministrazione Comunale, oltre a finalità puramente scientifiche, hanno voluto pertanto perseguire anche aspetti pratici, riguardanti pratiche e accorgimenti utili a ridurre l'incidenza dei suddetti patogeni, ad ottimizzare le condizioni all'impianto e dunque limitare le fallanze e le perdite nei nuovi impianti.

Più in particolare, cercando di integrare le risposte relative ai due generi, gli obiettivi delle ricerche condotte con questa Tesi di Dottorato miravano a far luce su:

- a) presenza di endofiti patogeni nei semi o nelle talee e loro eventuale capacità di passare ai nuovi germogli (diffusione organotropica);
- b) insediamento degli endofiti fungini e loro associazioni nel tempo nelle piantine in vivaio;
- c) distribuzione di tali endofiti nei vari organi delle piantine;
- d) influenza della stazione sull'incidenza e le associazioni dei vari endofiti nei tessuti;
- e) variabilità degli endofiti in funzione della specie e/o del clone delle piante ospiti;
- f) influenza dei regimi idrici e/o della fertilizzazione offerte al vivaio sull'incidenza degli endofiti nelle piante e sulle relative conseguenze dopo il trapianto;
- g) influenza di fenomeni di idratazione o disidratazione delle piante al trapianto sull'incidenza degli endofiti patogeni dopo l'attecchimento, sullo sviluppo sintomatico degli agenti di cancro e sulla sopravvivenza delle piante.

3. MATERIALI E METODI

3.1. INQUADRAMENTO GENERALE

Come precedentemente accennato, per le ricerche di questa Tesi sono stati presi in considerazione due generi forestali, molto utilizzati nelle alberature ornamentali e molto diversi tra loro:

- **il pioppo**, *Populus* spp. in rappresentanza di latifoglie a foglia caduca, in commercio come materiale clonale, sotto forma di talee od astoni, dotato di uno sviluppo assai rapido, in grado di garantire una elevata omogeneità e celerità nelle varie risposte sperimentali;

- **il leccio**, *Quercus ilex*, in rappresentanza di latifoglie sempreverdi, in commercio come piantine da seme, con pane di terra, caratterizzato da uno sviluppo assai lento e da una grande variabilità nelle risposte.

Ai fini delle indagini, nel mese di marzo del 2006, è stato innanzitutto costituito un piccolo vivaio a Viterbo, presso l'Azienda Sperimentale "Nello Lupori" dell'Università della Tuscia, mettendo a dimora 400 talee di *Populus x canadensis* (*P. deltoides* x *P. nigra* = *P. x euramericana*), del clone Luisa Avanzo, e piantine di *Quercus ilex* (da seme) parte (numero 100) di un anno, allevate per un anno in serra e pertanto "isolate" da inoculo naturale e parte (numero 100) di tre anni, cresciute all'aperto e pertanto con endofiti già insediati.

Per ciascuna specie forestale sono state realizzate una serie di tesi sottoponendo parte delle piante ad irrigazione e parte no, effettuando o meno concimazioni. Più in particolare sono state costituite parcelle 1) senza concimazione e senza irrigazione (testimone non trattato) messe a confronto con parcelle sottoposte a: 2) irrigazione senza concimazione; 3) concimazione senza irrigazione; 4) irrigazione e concimazione. Per ogni tesi sono state considerate tre replicazioni.

Riguardo al pioppo sono state messe a dimora talee di *Populus x canadensis* (*P. deltoides* x *P. nigra* = *P. x euramericana*), clone 'Luisa Avanzo', prelevate da pioppelle al secondo anno di vivaio fornite dall'Azienda Umbraflor della Regione Umbria.



Figura 1. Viterbo, primavera 2007. Impianto di pioppi di un anno del clone L. Avanzo presso l'Azienda Sperimentale dell'Università della Tuscia di Viterbo.

Per il leccio sono state utilizzate ghiande certificate fornite dai vivai del MIPAF di S. Piero in Gradi e piantine di tre anni originarie da seme e fornite con pane di terra dai Vivai Michelini di Viterbo.

Sia le talee di pioppo sia le piantine di leccio sono state messe a dimora con un sesto d'impianto di 1 m tra le piante e 2,5 m tra le file, in parcelle sperimentali, dove era stato predisposto (ove previsto) o meno un adeguato sistema di irrigazione a goccia, effettuando (ove previsto) o meno una concimazione bilanciata NPK (5 q/ha) nelle primavere del primo e del secondo anno.

Lo sviluppo delle piante in pieno campo ha garantito una naturale inoculazione degli endofiti.

Limitatamente al pioppo, al fine di avere confronti tra due zone ecologicamente diverse tra loro, è stata condotta una serie di indagini parallela a quella di Viterbo, a Casale Monferrato (Alessandria), appoggiandoci ai vivai ed alle strutture dell'Unità di Ricerca per le Produzioni Legnose Fuori Foresta (ex - Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura), del Centro Ricerca Agricoltura (C.R.A.) del Ministero delle Politiche Agricole e delle Foreste. In questo caso i vivai sono stati costituiti secondo il metodo classico, ponendo le talee a 50 cm sulle fila e a 2,20 m tra le file.

Le ricerche relative agli anni 2006-2007 sono state incentrate in particolare sul rilievo dell'eventuale presenza di endofiti fungini, patogeni e non, nelle ghiande e nelle piantine di leccio e nelle talee di pioppo da utilizzare per la costituzione del vivaio e, successivamente, sull'insediamento degli endofiti nel tempo nelle piante durante il loro sviluppo in vivaio e sull'influenza dei trattamenti culturali e durante il trapianto sulla loro isolabilità e sugli effetti sulle crisi di trapianto.

Nel periodo 2007-2008, sia su leccio (a Viterbo) sia in particolare su pioppo presso (Viterbo e Casale Monferrato), le varie indagini hanno soprattutto mirato a verificare l'influenza di trattamenti di idratazione e/o disidratazione delle piante in fase di trapianto sull'isolabilità degli endofiti, agenti di necrosi corticali, verificando poi il relativo sviluppo patogenetico e l'influenza sulle crisi di trapianto delle piante messe a dimora.

Pressoché tutte le analisi relative all'isolamento, all'identificazione e alla quantificazione dei vari endofiti sono state condotte presso il laboratorio del Dipartimento di Protezione delle Piante e, in piccola parte, per il pioppo, per le prime fasi di isolamento, presso i laboratori dell'Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura di Casale Monferrato.

Di seguito verranno illustrate con dettaglio le metodologie e i materiali utilizzati nelle ricerche distintamente per il pioppo e per il leccio, tenendo presente che le maggiori articolazioni hanno riguardato il pioppo, facilitate da una sua più agevole coltivazione, da una maggiore omogeneità dei risultati e dalla preziosa collaborazione offerta, soprattutto in campo, dall'Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura di Casale Monferrato.

3.2. INDAGINI CONDOTTE SU PIOPPO

3.2.1. MATERIALE GENETICO UTILIZZATO

Per buona parte delle nostre ricerche sono stati utilizzati i cloni L. Avanzo e I-214, entrambi *P. x canadensis*, che erano i più seguiti relativamente alle crisi di trapianto.

Per alcuni studi è stato utilizzato il clone “Jean Pourtet” di *P. nigra*, molto usato come ornamentale.

Nella serie di studi relativa ai confronti clonali o di specie, ai suddetti cloni sono stati aggiunti uno di *P. alba*, molto usato in campo ornamentale, e due ibridi (Trichobel e Beauprè) di *P. trichocarpa* (Torr. & Gray) ed uno di *P. deltoides* (Lux) resistenti alle necrosi corticali da *D. populeum*.

Riteniamo opportuno riportare di seguito, sia pur succintamente, le più salienti caratteristiche dei suddetti cloni.

Populus P. x canadensis, clone ‘Luisa Avanzo’. Di facile radicazione e rapido accrescimento, è caratterizzato da un lungo periodo vegetativo, adattamento ai vari terreni, una buona resistenza al vento, all’afide lanigero, a *Marssonina brunnea* e al virus del Mosaico, modesta alla “defogliazione primaverile” da *Venturia populina* e alle ruggini, grave suscettibilità a *Discosporium populeum* ed alle macchie brune del tronco. In seguito a stress, prevalentemente idrici, è soggetto a gravi deperimenti.

L’elevata suscettibilità a *Discosporium* ne facilita le crisi di trapianto.

Populus P. x canadensis, clone ‘I-214’. Rustico e di facile attecchimento, è ben adattabile anche ai terreni meno favorevoli, caratterizzato da rapido sviluppo e robustezza dell’apparato radicale, è praticamente immune dalla “defogliazione primaverile” da *Venturia populina* e presenta una buona resistenza al virus del Mosaico, alla malattia delle macchie brune e ai marciumi radicali. È alquanto sensibile a

Marssonina brunnea e all'afide lanigero. Sotto stress può andare incontro ad attacchi di *Discosporium populeum* ed a conseguenti crisi di trapianto.

P. nigra, clone 'Jean Pourtet'. Si è dimostrato uno dei cloni a più rapido accrescimento tra quelli di *P. nigra* sperimentati in Italia. Si presta sia alle piantagioni fitte sia alle rade, sia all'impiego in filari. Per la sua frugalità è consigliato in terreni poco fertili, particolarmente nell'Italia centro-meridionale, nelle aree dove i cloni di buone caratteristiche tecnologiche non possono essere coltivati. Resistente alle malattie fogliari, meno a *Discosporium populeum*, ciò lo rende in qualche caso predisposto alle crisi di trapianto.

P. deltoides, clone 'Lux'. Caratterizzato da ampia chioma e foglie grandi, è molto suscettibile al vento e pertanto poco idoneo alla coltura in zone ventose e di ripa. Presenta attecchimento discreto e accrescimento rapido, soprattutto nei terreni più freschi. Resistentissimo all'afide lanigero, a *Marssonina brunnea* e ad altri parassiti fogliari, è invece sensibile al Mosaico. Quantunque resistente a *Discosporium populeum*, per la sua scarsa capacità rizogena va spesso incontro a crisi di trapianto, con relativi attacchi del patogeno.

P. alba, clone 'Villafranca'. L'accrescimento è abbastanza rapido e negli ambienti più adatti, come ad esempio lungo i litorali, dà produzioni comparabili a quelle del clone 'I-214'. Nei riguardi di *Marssonina brunnea*, del Mosaico e dell'afide lanigero è immune. Molto resistente alla malattia delle "macchie brune". L'attecchimento delle pioppelle al trapianto è piuttosto variabile.

P. trichocarpa, clone 'Trichobel' e *P. × generosa* (= *P. deltoides* x *P. trichocarpa*), clone 'Beauprè'. Suscettibili alle ruggini, sono assai resistenti a *Marssonina brunnea*, alla defogliazione primaverile e a *Discosporium populeum*, resistenza, questa ultima, che non sempre garantisce ottimi attecchimenti al trapianto.

3.2.2. ARTICOLAZIONE DELLE RICERCHE

I materiali e le metodologie utilizzati nelle ricerche su pioppo sono stati scelti in base alle finalità perseguite, le quali, in dettaglio, miravano a rilevare:

- la presenza di endofiti nelle talee utilizzate per costituire il vivaio;
- l'insediamento degli endofiti nelle piantine durante il loro sviluppo in vivaio;
- la distribuzione degli endofiti nelle varie parti della pianta;

- l'influenza degli stress idrici e della concimazione rivolte al vivaio sull'incidenza dei vari endofiti;
- l'influenza della specie e/o del clone sull'incidenza degli endofiti;
- l'influenza della stazione sull'incidenza degli endofiti;
- l'influenza degli stress idrici in vivaio sugli attacchi degli endofiti patogeni e sulle crisi di trapianto;
- l'influenza dello stato di idratazione o disidratazione delle piante sugli attacchi degli endofiti patogeni e sulle crisi di trapianto.

3.2.2.1. Presenza di endofiti fungini nelle talee e relativa diffusione organotropica nei germogli.

All'uopo sono state utilizzate talee del clone L. Avanzo, scelte tra quelle destinate alla costituzione del vivaio di Viterbo e Casale Monferrato e provenienti rispettivamente dall'Azienda Umbraflor di Spello (Umbria) e dall'Azienda 'Mezzi' di Casale Monferrato; sono state considerate 20 talee per provenienza prelevando 3 frammenti di tessuti corticali per talea. Si è proceduto ad opportuni isolamenti *in vitro* identificando e quantificando poi gli endofiti isolati, in particolare quelli patogeni. Tali indagini sono state condotte nei mesi di marzo e aprile 2006.

Nel mese di aprile, 20 talee per ciascuna delle due suddette provenienze sono state messe a germogliare in vaso, in ambiente controllato, andando poi a rilevare gli endofiti nei germogli emessi (vedi sotto).

3.2.2.2. Insediamento degli endofiti fungini in vivaio

Al fine di rilevare i periodi di insediamento dei vari endofiti nelle piantine in via di sviluppo e la loro evoluzione nel tempo, considerando il vivaio sperimentale neo impiantato di Viterbo, anche in relazione ai diversi "trattamenti colturali" contemplati ed all'andamento climatico, periodicamente sono state prelevate porzioni di germogli (nelle prime fasi) o di fusto (a lignificazione avvenuta) dalla zona sub-apicale e basale di 5 piantine per tesi (parcelle irrigate e/o concimate o meno) scelte a caso ogni volta. Da tale materiale, in laboratorio, per ogni tesi e per ognuna delle zone della pioppella, sono stati ricavati 30 frammenti di gemme (uno per gemma, parte interna), 30 di legno

(limitatamente al materiale lignificato) e 30 di corteccia (strati di alburno), che sono poi stati utilizzati per gli isolamenti *in vitro*.

Più in particolare, i prelievi sono stati effettuati verso la metà dei mesi di giugno, luglio, settembre e novembre 2006, gennaio, marzo e luglio 2007. Al fine di verificare la carica di endofiti sul materiale di impianto, analisi analoghe sono state effettuate in marzo sulle talee, prima della messa a dimora, avvenuta nell'aprile 2006.

3.2.2.3. Distribuzione degli endofiti nelle varie parti del fusto

In Casale Monferrato, nel mese di marzo 2007, da 10 piante di due anni di *P. × canadensis*, clone 'I-214' (molto simile al clone Luisa Avanzo, ivi indisponibile), sono state prelevate porzioni di fusto, lunghe circa 30 centimetri, in tre diverse zone della pioppella: apicale, confine tra il primo ed il secondo anno, basale. In laboratorio, procedendo come descritto al punto 3.2.2.2., da ciascun campione sono stati ricavati 20 frammenti di gemme, 20 di legno e 20 di corteccia, utilizzati per gli isolamenti *in vitro*. Dati supplementari sugli aspetti contemplati in questo obiettivo sono stati ottenuti anche dagli studi di cui al punto 3.2.2.2., sempre per le pioppelle di due anni, ed al punto 3.2.2.1., per le pioppelle di un anno.

3.2.2.4. Influenza della stazione sull'incidenza degli endofiti.

Per le indagini volte a questo scopo, limitate al vivaio di un anno, sono state messe a confronto pioppelle del clone 'L. Avanzo', allevate a Viterbo, con quelle allevate a Casale Monferrato, in entrambi i casi messe a dimora nel marzo 2006. Sono state considerate 10 piante per ogni stazione e replica. Gli isolamenti sono stati condotti nella primavera del 2007, da pioppelle di un anno, considerando 100 gemme e 100 frammenti corticali della parte mediana delle piante.

3.2.2.5. Variabilità degli endofiti in funzione della specie e/o del clone ospite.

Per tali indagini, condotte nel 2007 considerando i vivai di Casale Monferrato, sono state considerate pioppelle di due anni delle specie e/o cloni di *Populus* sotto indicati (vedi capitolo 3.2.1.):

- *P. alba*, clone 'Villafranca';

- *P. deltoides*, clone 'Lux';
- *P. nigra*, clone 'Jean Pourtet';
- *P. trichocarpa*, clone 'Trichobel';
- *P. deltoides* x *P. nigra* (= *P. x canadensis*), cloni 'I-214' e 'L.Avanzo';
- *P. deltoides* x *trichocarpa*, clone 'Beauprè';

Nel mese di marzo 2007, da 5 piante per ciascun clone, sono state prelevate porzioni di fusto, lunghe circa 30 centimetri, dalla zona basale, da quella di passaggio tra il primo ed il secondo anno e dalla parte apicale delle pioppelle, da cui in laboratorio, si è proceduto agli isolamenti *in vitro*, come descritto nel punto 3.2.2.2.

3.2.2.6. Influenza dei regimi idrici in vivaio sull'incidenza degli endofiti nelle pioppelle.

E' stato all'uopo considerato un vivaio di *Populus nigra*, che risultava idoneo ai nostri fini in quanto costituito nella primavera 2005 (e quindi al 2° anno di età) ed allevato prevedendo per l'intera stagione vegetativa 2006 tre differenti livelli di regime idrico:

- "Ambient": parcelle esposte alle sole precipitazioni naturali;
- "Wet": parcelle irrigate in misura tale che esse avessero a disposizione sempre 1/3 in più delle precipitazioni cui erano esposte le piante della parcella "ambient" (umidità del suolo appena sotto il punto di saturazione del suolo);
- "Dry": parcelle sottoposte a stress idrico (umidità appena al di sopra del punto di appassimento) previa copertura del terreno con teli impermeabili, con sole irrigazioni di soccorso per garantire la sopravvivenza delle stesse (figura 3).

Gli isolamenti *in vitro* son stati effettuati nell'ottobre 2006, considerando 10 piante per tesi, per un totale di 200 frammenti di gemme e 200 di starti corticali per ciascuna tesi.



Figura 2. Casale Monferrato, primavera 2007. Parcella di *P. nigra* al secondo anno di vivaio sottoposta a stress idrico previa copertura del terreno con teli impermeabili.

3.2.2.7. Influenza dei trattamenti alle pioppelle in vivaio e al trapianto sull'isolabilità degli endofiti dopo la messa a dimora.

All'inizio del mese di aprile 2007, da ciascuna delle parcelle sperimentali "wet" e "dry" di cui sopra, si è proceduto all'estirpo di 30 pioppelle, di cui 15 sono state poste a bagno in acqua per 5 giorni e 15 sono state mantenute al coperto, proteggendole con un telo al fine di evitarne la disidratazione. Indi si è proceduto al trapianto di tutte le 30 pioppelle, ponendole a dimora (profondità 80 centimetri) in un campo limitrofo. Dopo 20 giorni, all'avvio della germogliazione, da 10 piante per tesi, in laboratorio, dalla zona basale, da quella di passaggio tra il primo ed il secondo anno e dalla parte sub-apicale delle pioppelle, si è proceduto agli isolamenti *in vitro*, come descritto nel punto 3.2.2.3.

3.2.2.8. Influenza dello stato di idratazione degli astoni al trapianto sull'isolabilità degli endofiti patogeni alla germogliazione delle piante, sullo sviluppo sintomatico degli agenti di cancro e sulla crisi di trapianto.

Le ricerche relative a questo obiettivo, per la loro importanza, sono state condotte nel 2007 e ripetute nel 2008.

Indagini condotte nel 2007. Ad inizio maggio 2007, a Casale M.to, da un vivaio al 2° anno del clone 'I-214' allevato in condizioni ambientali, si è proceduto all'estirpo di 175 pioppelle, sottoponendole, in gruppi di 30, a trattamenti di disidratazione e/o idratazione differenziati appena prima dell'impianto. Più precisamente sono state realizzate le seguenti tesi:

- nessun trattamento;
- astoni lasciati 5 giorni all'aria e messi a dimora senza idratazione;
- astoni lasciati 10 giorni all'aria e messi a dimora senza idratazione;
- astoni lasciati 5 giorni all'aria e idratati 5 giorni in acqua prima della messa a dimora;
- astoni idratati 10 giorni in acqua prima della messa a dimora.

Al momento dell'impianto, considerando 5 piante per tesi, è stato misurato il contenuto idrico delle pioppelle sottoposte ai 5 diversi trattamenti, mediante pesate di uguali porzioni di fusto effettuate al momento del taglio e ripetute dopo 3 giorni di essiccazione in stufa, così da poter stimare il contenuto idrico e dunque il grado di disidratazione delle piante.

Indi, in data 15 maggio 2007, tutte le piante sono state messe a dimora (profondità 0,80 m, spaziatura 1 m sulla fila e 2,5 metri tra le file) in un campo limitrofo, secondo blocchi randomizzati con tre replicazioni (parcelle di 10 piante cadauna).

Per ciascuna delle suddette tesi si è proceduto a fare i sotto riportati monitoraggi:

- 1) 20 giorni dopo a messa a dimora, considerando 5 piante per tesi: prelievo di porzioni medio-apicali del fusto e germogli neo-emessi, da cui si è proceduto ad isolamenti *in vitro* (20 frammenti degli strati corticali per tesi e per pianta), al fine di rilevare l'incidenza dei vari endofiti patogeni;
- 2) a 45 giorni dalla messa a dimora: rilievo dell'incidenza di eventuali manifestazioni sintomatiche di necrosi corticali, tentando di identificare gli agenti causali. All'uopo sono state considerate tutte le 25 piante rimaste in loco per ciascuna tesi;
- 3) dopo 60 giorni dalla messa a dimora, ulteriore rilievo sugli attacchi delle necrosi corticali e delle piante morte.

Indagini condotte nel 2008. Nel mese di aprile 2008, nei vivai sperimentali di Viterbo e Casale Monferrato, il primo costituito da pioppelle al 2° anno del clone L. Avanzo ed il secondo da 'I-214' della medesima età, si è proceduto all'estirpo di 200 pioppelle per ciascun sito ed al successivo trapianto. Queste, nella stazione di Casale M.to, in gruppi di 30 per ciascun clone, sono state sottoposte a trattamenti di disidratazione e/o idratazione differenziati appena prima dell'impianto; nella stazione di Viterbo, invece,

per motivi tecnici sono state messe a dimora esclusivamente le pioppelle poste a disidratare per 7 giorni all'aria prima dell'impianto, al fine di poter condurre confronti tra le due stazioni in esame.

Più precisamente, nel sito di Casale M.to, sono state realizzate le seguenti tesi:

- nessun trattamento (tesimone);
- astoni lasciati 7 giorni in acqua prima della messa a dimora;
- astoni lasciati 7 giorni all'aria e messi a dimora senza idratazione;
- astoni lasciati 7 giorni all'aria e idratati 7 giorni in acqua prima della messa a dimora;
- astoni lasciati 14 giorni all'aria e messi a dimora senza idratazione;
- astoni idratati 14 giorni all'aria e idratati 7 giorni in acqua prima della messa a dimora.

Al momento dell'impianto, considerando 5 piante per tesi, è stato analizzato il contenuto idrico delle pioppelle sottoposte ai diversi trattamenti, come sopra descritto.

Indi, a partire dall'inizio del mese di aprile 2008, gli esemplari dei due diversi cloni sono stati messi a dimora (profondità 80 centimetri, spaziatura 1 metro sulla fila e 2,5 metri tra le file) in ugual numero, secondo blocchi randomizzati con tre replicazioni (parcelle di 10 piante cadauna) in entrambi i vivai sede di indagine e secondo le tesi previste.

Per ciascuna delle suddette tesi si è proceduto ai sotto riportati monitoraggi:

- 1) al momento del taglio, onde ottenere una fotografia della condizione di partenza;
- 2) 20 giorni dopo la messa a dimora, ad avvenuto attecchimento, iniziata la germogliazione, considerando 5 piante per tesi: prelievo della porzione di passaggio tra primo e secondo anno del fusto e germogli neo-emessi, da cui si è proceduto ad isolamenti *in vitro* (20 frammenti degli strati corticali per tesi e per pianta), al fine di rilevare l'incidenza dei vari endofiti patogeni;
- 3) ad un mese dalla messa a dimora, sulle pioppelle ad avviata vegetazione e dopo l'influenza delle prime piogge e dei primi caldi.
- 4) costantemente, con cadenza quindicinale, da aprile a luglio 2008, rilievo su ciascun individuo dell'apezzamento dell'incidenza di eventuali manifestazioni sintomatiche di necrosi corticali, con identificazione degli agenti causali e valutazione delle condizioni fisiologiche della pianta.

3.3. INDAGINI CONDOTTE SU LECCIO

3.3.1. MATERIALE UTILIZZATO

Relativamente alla specie *Quercus ilex*, il materiale oggetto delle prove era costituito da: - ghiande fornite dal Vivaio Forestale di S. Piero a Gradi (del Ministero Agricoltura e Foreste), raccolte nel Casentino nell'autunno 2006, e le piantine da esse derivate; - piantine di tre anni, fornite dall'impresa "Vivai Michelini", allevate in vaso all'aperto, nelle vicinanze di Viterbo, e pertanto da sempre esposte ad inoculazioni naturali di endofiti.

3.3.2. ARTICOLAZIONE DELLE RICERCHE

Le indagini relative al leccio sono state portate avanti esclusivamente a Viterbo, ed in particolare presso l'Azienda Sperimentale dell'Università della Tuscia.

Nel complesso sono stati condotti rilievi su:

- la presenza di endofiti fungini nelle ghiande;
- la trasmissione organotropica degli endofiti patogeni dal seme ai germogli;
- l'insediamento degli endofiti nei semenzali;
- l'influenza dell'irrigazione e della concimazione sull'incidenza degli endofiti fungini;
- l'influenza dello stato di idratazione e disidratazione delle piantine al trapianto sulla isolabilità degli endofiti patogeni sugli eventuali loro attacchi sintomatici dopo la messa a dimora e sulle crisi di trapianto.

3.3.2.1. Presenza di endofiti fungini nelle ghiande

All'uopo, considerando gruppi diversi di ghiande (provenienze del Casentino e del Viterbese), sono stati effettuati isolamenti, previa sterilizzazione esterna, da frammenti dell'epicarpo, dell'endocarpo, da tre diversi strati del cotiledone (a 3, 6 e 9 mm dalla superficie esterna) e dall'embrione, distinguendo l'epicotile dall'ipocotile.

Per ogni gruppo sono state esaminate 20 ghiande, scelte a caso.

3.3.2.2. Trasmissione organotropica

A questo riguardo, nella primavera 2007, ghiande delle medesime partite delle precedenti sono state poste in vaso in ambiente protetto. Man mano che si sviluppavano le nuove piantine, sono stati condotti isolamenti dai germogli da esse derivati in modo da verificare se gli eventuali endofiti in essi presenti potessero passare dal seme alla pianta.

3.3.2.3. Insediamento degli endofiti nei semenzali

Allo scopo di rilevare il periodo di insediamento degli endofiti nei giovani semenzali, nel marzo 2007, sono state seminate 100 ghiande nel vivaio sperimentale di cui sopra, costituito a Viterbo. A partire dall'emergenza, con cadenza quindicinale, sono state prelevate ogni volta 20 piccole porzioni di fusticino, sia dalla parte apicale, sia (quando già formate) dalla mediana e basale. Da tali frammenti si è poi proceduto in laboratorio ad opportuni isolamenti *in vitro* degli endofiti.

3.3.2.4. Effetti dell'irrigazione e/o della concimazione sull'incidenza degli endofiti patogeni nelle piante in vivaio.

A tal fine, nel vivaio sperimentale di Viterbo, semenzali di un anno cresciuti in serra, lontano dunque da fonti di inoculo, e piantine di tre anni provenienti dai vivai Michellini, già ricche di endofiti, sono state messe a dimora nelle parcelle sottoposte o meno a concimazione bilanciata NPK e/o ad irrigazione a goccia.

Da esse sono stati condotti periodici isolamenti dai rametti di uno e tre anni volti a monitorare l'eventuale variazione dell'incidenza e della composizione endofitica nel tempo.

3.3.2.5. Influenza dello stato di idratazione e/o disidratazione delle piantine alla messa a dimora sulla crisi di trapianto e sul relativo ruolo svolto dagli endofiti patogeni.

Nel mese di aprile 2008, le piante di cinque anni appositamente allevate nel vivaio di Viterbo, sono state estirpate con pane di terra, indi sottoposte a trattamenti di

disidratazione e/o di idratazione, per poi trapiantarle, secondo norma, in un terreno limitrofo. Più in particolare si è proceduto alla realizzazione delle seguenti 4 distinte tesi:

- trapianto immediato senza idratazione;
- trapianto previa reidratazione della piantina, immergendo il pane di terra in acqua;
- trapianto dopo 4 giorni di esposizione all'aria e al sole.
- trapianto dopo 4 giorni di esposizione all'aria e al sole con 1 giorno di re-idratazione in acqua.

Per ciascuna di tali tesi sono stati condotti periodici isolamenti ed un costante monitoraggio dello stato delle piante e di eventuali manifestazioni patologiche. Ciò al fine di rilevare l'eventuale comparsa di attacchi di necrosi corticali correlabili agli endofiti patogeni e le crisi di trapianto.

3.4. CAMPIONAMENTI

Poiché fra gli scopi prefissati in questa ricerca vi era anche quello di verificare in quali tessuti si localizzassero preferenzialmente gli endofiti, nel corso dei vari campionamenti, anche in funzione dello stadio di sviluppo delle piante e dell'epoca di campionamento, sono stati saggiati frammenti prelevati da organi diversi delle singole piante.

3.4.1. SCELTA DELLE PIANTE

In ciascuna stazione e per ogni specie considerata e tesi formulata, tenuto conto anche dell'elevata omogeneità individuale all'interno di ogni singola specie, sono state scelte, a *random*, un numero variabile da 5 a 10 piante, di pioppo o leccio, tutte asintomatiche (ove possibile in buono stato vegetativo), contrassegnandole con opportune targhette plastificate.

3.4.2. PRELIEVO DEI CAMPIONI DI PIOPPO

In dettaglio, nel caso del pioppo, sono stati prelevati:

- Da ciascuna talea 20 frammenti dagli strati corticali (5 mm x 3 mm x 2 mm), a distanza di 5 cm l'uno dall'altro;

- Dai germogli neo emessi: 20 frammenti, (piccoli cilindretti di 3 mm di lunghezza), a circa 1 cm l'uno dall'altro;
 - Dalle pioppelle di un anno: 20 frammenti da gemme o germogli e 20 frammenti da strati corticali della porzione basale e apicale del fusto, (circa 1 m da terra, 5 mm x 3 mm x 2 mm), a distanza di 1 cm l'uno dall'altro.
 - Dalle pioppelle di due anni: 20 frammenti da gemme o germogli e 20 frammenti da strati corticali (5 mm x 3 mm x 2 mm), a distanza di 1 cm l'uno dall'altro, della parte basale, intermedia (cercine, zona di passaggio tra la porzione di pioppella di un anno e quella di due anni) e apicale della pioppella.
- Sono state considerate circa 10 talee, 5 pioppelle di un anno e tre di due anni per ogni tesi.

3.4.3. PRELIEVO DEI CAMPIONI DI LECCIO

In dettaglio, nel caso del leccio, da un totale di 100 ghiande, per ciascun seme sono stati prelevati:

- 5 frammenti dall'epicarpo;
- 5 dall'endocarpo;
- 15 da tre diversi strati del cotiledone (a 3, 6 e 9 mm dalla superficie esterna);
- 4 dall'embrione, distinguendo l'epicotile dall'ipocotile.

Dalle piantine di leccio, per ciascuna pianta sono stati prelevati:

- 20 frammenti dai rami del 1° anno d'età (piccoli cilindretti di 3 mm di lunghezza, a circa 1 cm l'uno dall'altro);
- 20 frammenti di corteccia (5 mm x 3 mm x 2 mm, sempre a distanza di circa 1 cm l'uno dall'altro) dai rami di 3 anni, quando presenti;

3.5. ANALISI DEGLI ENDOFITI

3.5.1. ISOLAMENTO DEGLI ENDOFITI

Per le indagini sulle associazioni e l'incidenza delle varie specie fungine endofitiche, utilizzando frammenti degli organi (gemme o porzioni di germogli, rami e fusto) di volta in volta raccolti, si è proceduto all'isolamento in vitro dei vari endofiti, al loro riconoscimento ed alla loro quantificazione.

Raccolta e conservazione dei campioni

La raccolta dei campioni per gli isolamenti è stata in genere distruttiva in quanto si è in genere stati costretti a prelevare porzioni di fusto. Solo nel caso di germogli o piante già ramificate, per alcune indagini è stato sufficiente raccogliere germogli o rami.

La lunghezza delle porzioni di germogli o di fusto utilizzati andavano da 3-4 cm (es. germogli, rami o parti di fusto di giovani piantine) fino a 8-10 cm (es. zona della pioppella tra il primo e il secondo anno).

La conservazione *ex situ* dei campioni raccolti è sempre stata particolarmente curata poiché da questa procedura dipende in genere la buona riuscita delle successive fasi. Ogni campione selezionato è stato immediatamente conservato all'interno di sacchetti trasparenti di polietilene, chiusi con nastro adesivo, contenenti un'etichetta cartacea su cui sono state menzionate: il nome della stazione, la data di raccolta, la specie forestale e il numero della pianta e la tesi di appartenenza. I campioni sono stati trasportati nei laboratori del Dipartimento di Protezione delle Piante, o in alcuni casi dell'Unità di Ricerca per le Produzioni Legnose Fuori Foresta, e posti all'interno di una cella frigo alla temperatura di 4 °C. Gli isolamenti sono in genere avvenuti entro 48 ore dalla raccolta.

Isolamenti.

Dopo aver eliminato le eventuali foglie ed aver ben lavato il materiale con acqua distillata, ogni campione è stato sterilizzato (Cohen S. D., 1999; Fröhlich *et al.*, 2000;), sotto cappa a flusso verticale, con immersione successiva in tre soluzioni: un minuto in etanolo (C₂H₅OH) al 75%, tre minuti in ipoclorito di sodio (NAClO₂, 7% di Cloro attivo) al 50% e trenta secondi in etanolo (C₂H₅OH) al 75%. Successivamente i campioni sono stati due volte risciacquati in vaschette con acqua deionizzata, preventivamente sterilizzata in autoclave (121 °C per venti minuti). Con bisturi da laboratorio sono stati allestiti i campioni per l'isolamento *in vitro* sopra descritti.

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

3.5.2. IDENTIFICAZIONE DEGLI ENDOFITI

Dai miceli sviluppati dai singoli frammenti si è proceduto a successivi re-isolamenti, fino ad ottenere per ogni tipo di micelio una coltura in purezza.

3.5.2.1. Riconoscimento attraverso analisi morfologica

Allo scopo di poter determinare i vari *taxa* endofiti isolati dai campioni, le colture pure dei diversi morfotipi sono state sottoposte ad un primo riconoscimento morfologico, attraverso osservazioni sia macro che microscopiche.

All'uopo, le varie colonie, di almeno sette giorni di età, erano in prima istanza confrontate con alcuni isolati di riferimento presenti nella micoteca del Dipartimento, al fine di individuare eventuali somiglianze e farsi una prima idea sulla classificazione del fungo in oggetto. Raramente comunque la classificazione era possibile sugli isolati puri messi a crescere su PDA, in quanto questo substrato era presumibilmente troppo ricco, per cui prevaleva la produzione di micelio, mentre le fruttificazioni (più facilmente agamiche) erano più rare. Per questo motivo abbiamo ritenuto opportuno variare le condizioni di crescita, sia in relazione al substrato, sia alla temperatura ed all'illuminazione. Tutti gli endofiti isolati sono stati così nuovamente re-isolati su tre diversi substrati: PDA, Malt-Agar (MA) allo 0,5% (5 grammi di estratto di malto più 10 grammi di agar per litro d'acqua), e Agar-Acqua (20 grammi di Agar per litro d'acqua), in modo da fornire ai funghi condizioni di disponibilità nutritive sempre minori. Oltre al substrato di crescita, per indurre la produzione di fruttificazioni, sia agamiche che gamiche (queste ovviamente solo nel caso dei funghi rivelatisi poi omotallici), le diverse colonie sono state fatte crescere parte a 4 °C, parte a 25 °C e parte sottoponendole a continui e violenti sbalzi termici. Allo stesso modo si interveniva anche sul fattore luminoso, sottoponendo le colonie a buio costante, ad illuminazione costante e ad alternanza delle due condizioni.

Periodicamente si procedeva quindi all'analisi delle colonie allo stereoscopio, allo scopo di meglio visualizzare eventuali corpi fruttiferi od ammassi di fruttificazioni (a volte comunque già visibili ad occhio nudo). Quando dalla visione allo stereoscopio la colonia risultava aver prodotto qualcosa che poteva essere utile al riconoscimento, si procedeva alle osservazioni microscopiche, sia della piastra intera, sia di porzioni di micelio montate su vetrino. L'osservazione della piastra intera, seppure possibile solo

ad ingrandimenti minori, era ritenuto un procedimento molto utile soprattutto per l'identificazione degli Ifali, in cui era importante distinguere la presenza e la forma dei conidiofori, nonché il modo in cui erano inseriti i conidi sugli stessi. Su vetrino infatti la presenza di acqua utilizzata per il montaggio del coprioggetto comportava il distacco dei conidi dal conidioforo, facendo perdere un importante elemento di distinzione tassonomica.

La determinazione del genere e/o della specie di ciascuna tipologia fungina è stata effettuata confrontando i caratteri macro e microscopici rilevati, con tabelle, disegni e schemi riportati in testi di riferimento (Barnett *et al.*, 1972; Lanier *et al.*, 1976; Carmichael *et al.*, 1980; v. Arx, 1987; Williams Woodward, 2001) o con parametri utilizzati dal Dipartimento di Protezione delle Piante.

Le caratteristiche morfologiche distintive fra i vari funghi isolati durante i campionamenti, tramite opportune chiavi tassonomiche dicotomiche, ci hanno permesso in più casi la loro classificazione, almeno al genere di appartenenza. Limitatamente (per motivi di tempo) a quei funghi che dall'analisi morfologica risultavano ascrivibili a *taxa* potenzialmente agenti di necrosi corticali, è stata tentata l'identificazione delle specie, facendo ricorso ad approcci biomolecolari.

3.5.2.2. Riconoscimento attraverso analisi molecolare

Come detto, volendo tentare l'identificazione più precisa di tutti quei funghi che in prima analisi erano riferibili a generi di cui fanno parte specie connesse a necrosi corticali, e di cui pertanto ci sembrava importante ai fini della Tesi determinarne con il maggior grado di accuratezza possibile la classificazione specifica, si è scelto di ricorrere alle tecniche di biologia molecolare, in particolare estrazione di DNA genomico, amplificazione di regioni di DNA e sequenziamento degli amplificati da poter confrontare con le banche dati mondiali. A tal fine ci siamo rivolti al *Centraal Bureau voor de Statistiek*. (Utrecht The Netherlands)

3.5.3. QUANTIFICAZIONE DELLE TIPOLOGIE FUNGINE

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

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

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

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

3.6. RILIEVO DEGLI ATTACCHI DI NECROSI CORTICALI

Al fine di rilevare l'eventuale comparsa di necrosi corticali sulle pioppelle e i lecci trapiantati, a partire dalla messa a dimora, ogni 10 giorni per due mesi, ciascuna pianta è stata sottoposta ad osservazioni visive, contando gli attacchi sintomatici di necrosi corticali, stimati come numero di punti di infezione per pianta o, in presenza poi di manifestazioni più estese, come percentuale stimata di superficie del fusto interessata dalla necrosi.

Si è poi cercato di identificare l'agente causale sulla base dell'aspetto delle necrosi e delle eventuali fruttificazioni (tipologia, colore, localizzazione, presenza di cirri, ecc.), e/o di osservazioni microscopiche e/o isolamenti *in vitro*.

Più precisamente, nel caso di tipologie di necrosi con fruttificazioni fungine, sono stati prelevati piccoli campioni per le relative osservazioni al microscopio ottico.

Nel caso di tipologie di necrosi con assenza di fruttificazioni, è stato fatto ricorso alla camera umida per indurre la loro produzione e/o ad isolamenti *in vitro* per le ulteriori osservazioni del caso.



Figura 3. Necrosi corticali da *Discosporium populeum* su pioppella in vivaio; in “A”, manifestazione esterna con numerosi picnidi; in “B”, tessuti alterati messi in evidenza attraverso decorticazione.



Figura 4. Necrosi corticale da *Phomopsis* spp. su pioppella del clone I-214 al secondo anno di vivaio, prima (A) e dopo (B) decorticazione.

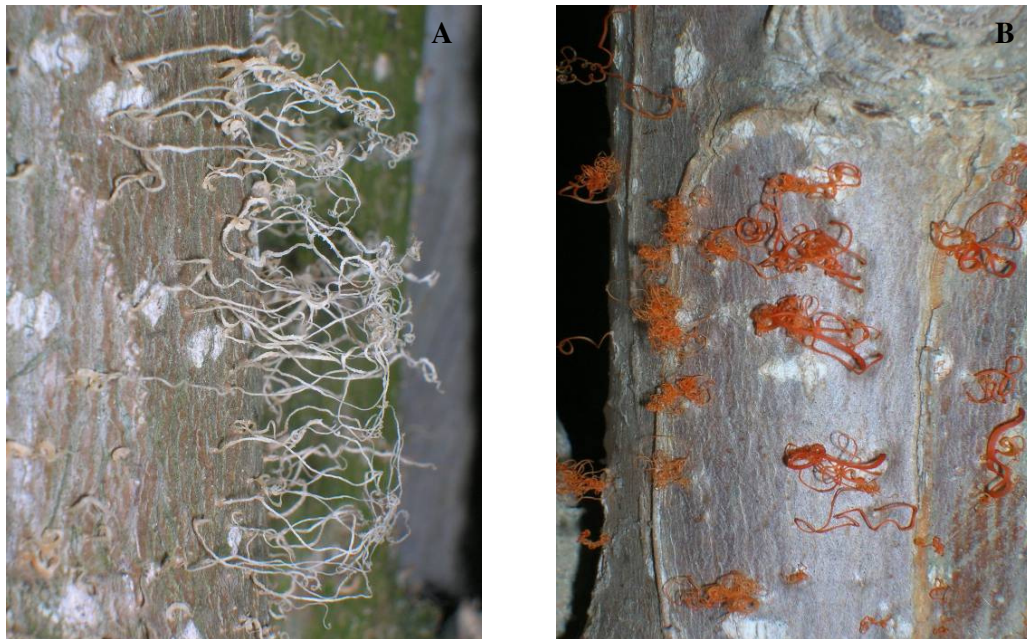


Figura 5. Fruttificazioni di *Phomopsis* spp. (A) e *Cytospora chrysosperma* (B), su pioppelle di due anni dei cloni I-214 e L. Avanzo rispettivamente.

3.7. RILIEVO DELL'INCIDENZA DELLE CRISI DI TRAPIANTO

In occasione dei vari monitoraggi in campo, unitamente al rilievo degli eventuali attacchi sintomatici, è stato individuato anche il numero delle piante, appartenenti a ciascuna specie e tesi, morte in conseguenza alla crisi di trapianto. Tale numero è stato poi espresso come valore percentuale.

3.8. DATI CLIMATICI

Grazie alle stazioni meteorologiche dell'Azienda Sperimentale dell'Università della Tuscia, "Nello Lupori" e dell'Azienda "Mezzi" dell'Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura di Casale Monferrato, è stato possibile reperire per le due stazioni i dati sulle temperature minime, medie e massime giornaliere e sulle precipitazioni giornalmente cadute durante i periodi di prove considerati. Più precisamente, i dati raccolti riguardano il periodo che va dal gennaio 2006 fino all'agosto 2008. A partire da tali dati, prendendo in considerazione le temperature medie mensili e l'ammontare delle piogge mensili, sono stati elaborati i diagrammi Bagnouls-Gaussen e graficizzati i valori decadal delle precipitazioni e delle temperature minime medie e massime del periodo considerato.

4. RISULTATI

Le ricerche hanno fornito un volume di dati e di informazioni particolarmente rilevante, di notevole interesse scientifico e pratico. Con le varie indagini condotte sono stati individuati numerosi endofiti fungini, sia potenzialmente patogeni sia non. Buona parte di essi è stata identificata fino al genere ed in molti casi alla specie. Per alcuni endofiti patogeni è stato dimostrato il legame con le crisi di trapianto. Detti risultati verranno esposti distintamente per il pioppo e per il leccio, procedendo secondo gli obiettivi prefissati. Prima di illustrare i vari risultati, si ritiene opportuno fare cenno all'andamento climatico relativo agli anni delle ricerche, che in più casi ha condizionato i risultati stessi.

4.1. ANDAMENTO CLIMATICO

Gli andamenti climatici relativi alle due stazioni considerate, Viterbo e Casale Monferrato, sono apparsi molto simili tra loro.

4.1.1. STAZIONE DI VITERBO

Nelle figure 7 e 8 sono riportati rispettivamente il diagramma Bagnouls-Gausson ed il grafico dei valori decadali delle precipitazioni e delle temperature minime, medie e massime relativi alla stazione di Viterbo nel periodo considerato.

L'annata 2006, nel cui mese di aprile è stato costituito il vivaio sperimentale di pioppo e leccio, è stata caratterizzata da forte siccità nei mesi di maggio, giugno e luglio ed abbondanti precipitazioni nei mesi di agosto e settembre. Nelle annate 2007 e 2008 spiccano i mesi estivi, caratterizzati da siccità, seppure non straordinarie.

4.1.2. STAZIONE DI CASALE MONFERRATO

Nella stazione di Casale Monferrato, (figure 9 e 10) sono da sottolineare i mesi di maggio, giugno e luglio del 2006, di febbraio, aprile e luglio 2007 e di febbraio e marzo (nonché la prima decade di aprile) 2008 caratterizzati da siccità. In pressoché tutti gli altri mesi si sono verificate invece discrete o abbondanti precipitazioni.

Figura 6. Andamento termo-pluviometrico nella zona di Viterbo, secondo lo schema Bagnouls-Gaussen, nel periodo dal gennaio 2006 all'agosto 2008.

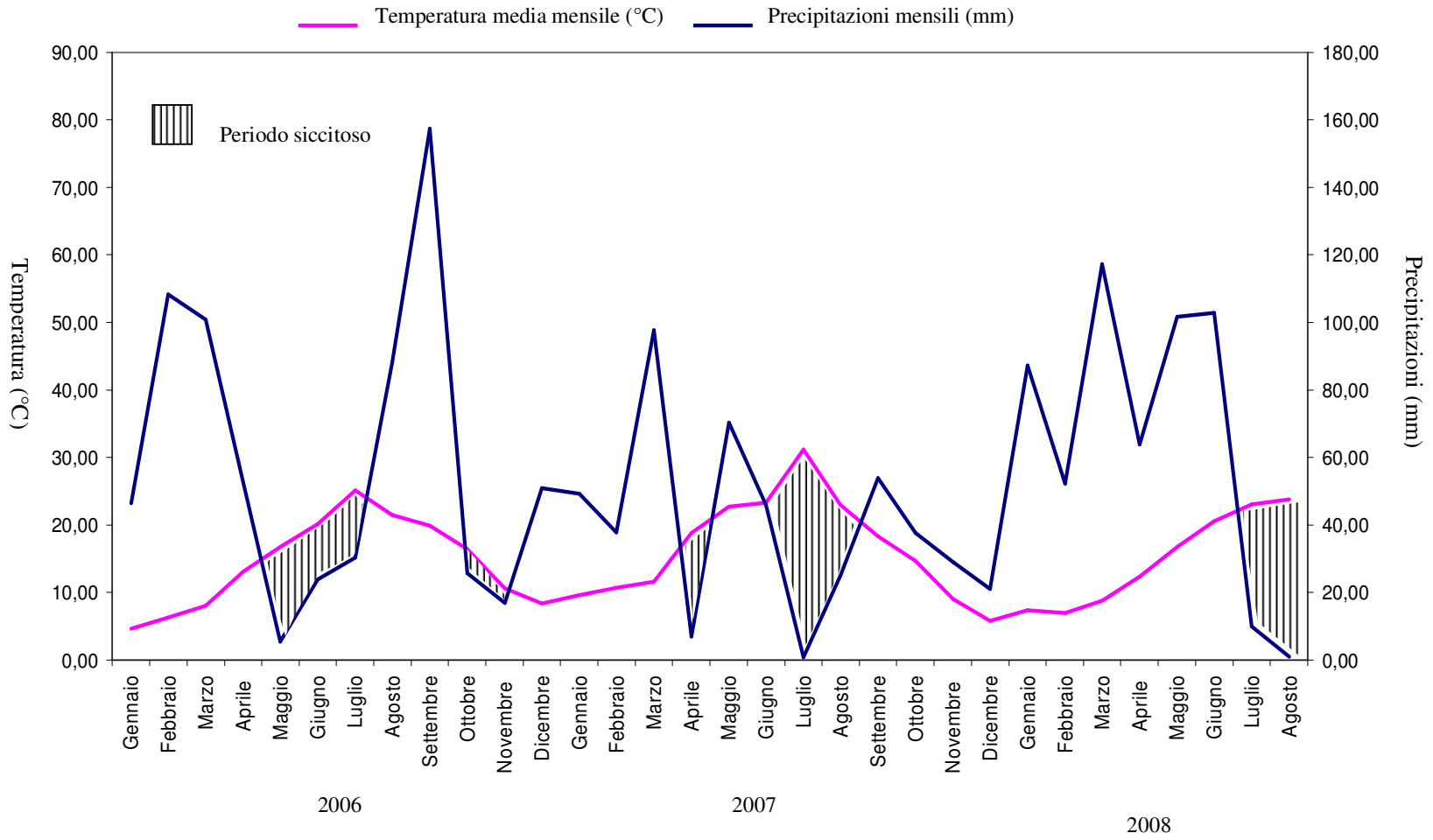
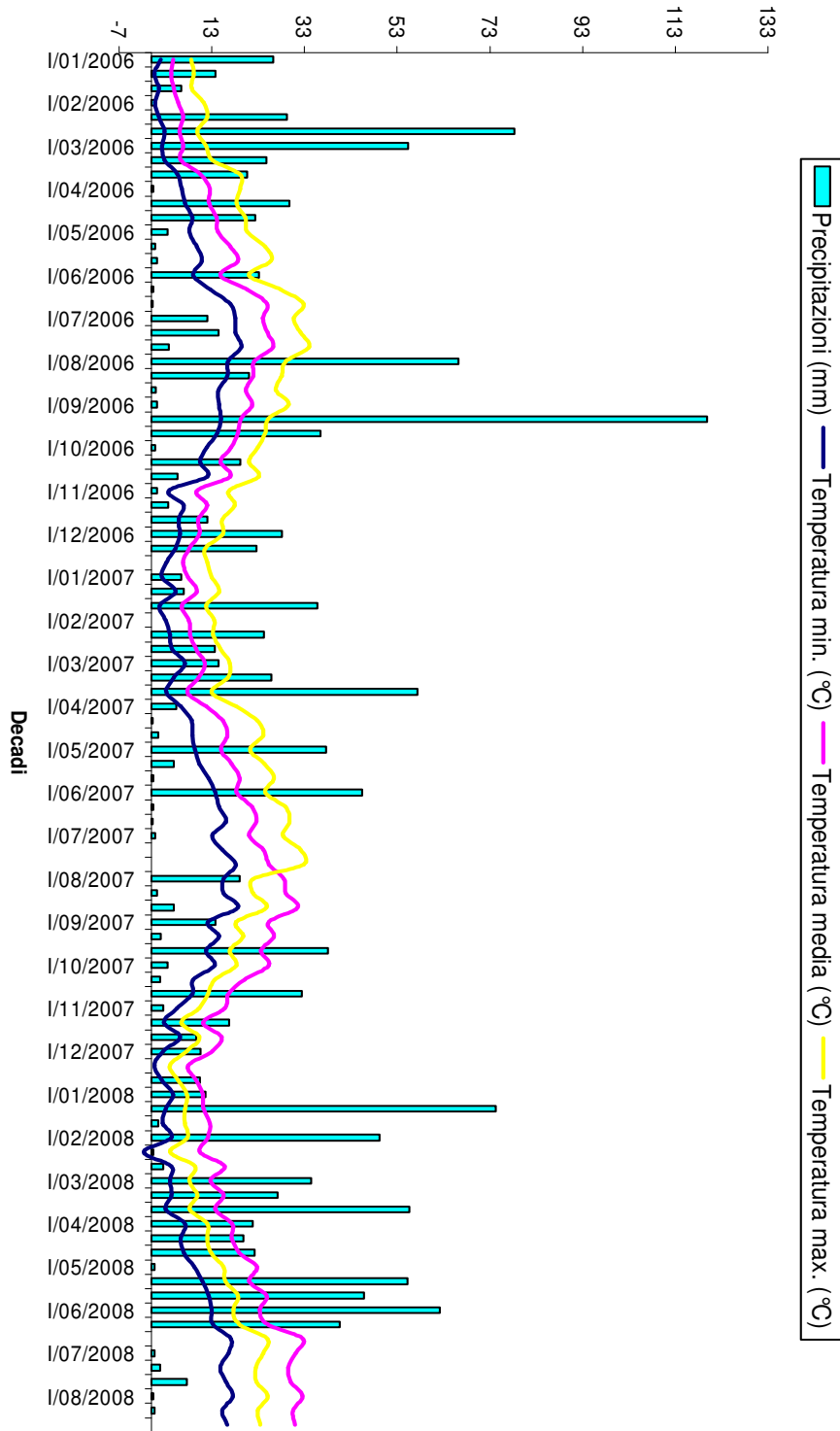


Figura 7. Andamento delle temperature (°C) minime, medie e massime (media dei valori giornalieri) e delle precipitazioni (mm) decadali (totali) relative a Viterbo, nel periodo gennaio 2006 – agosto 2008.



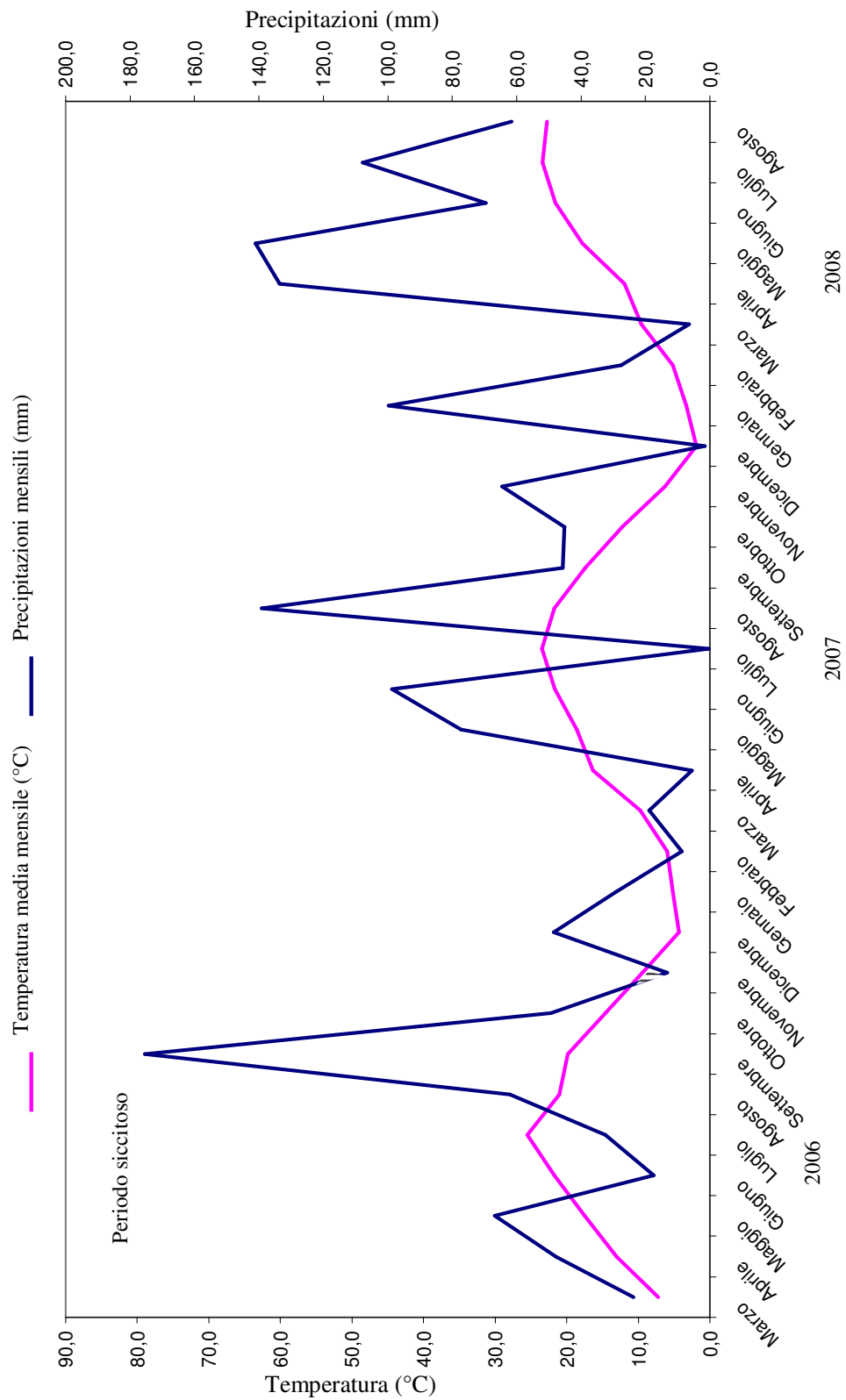
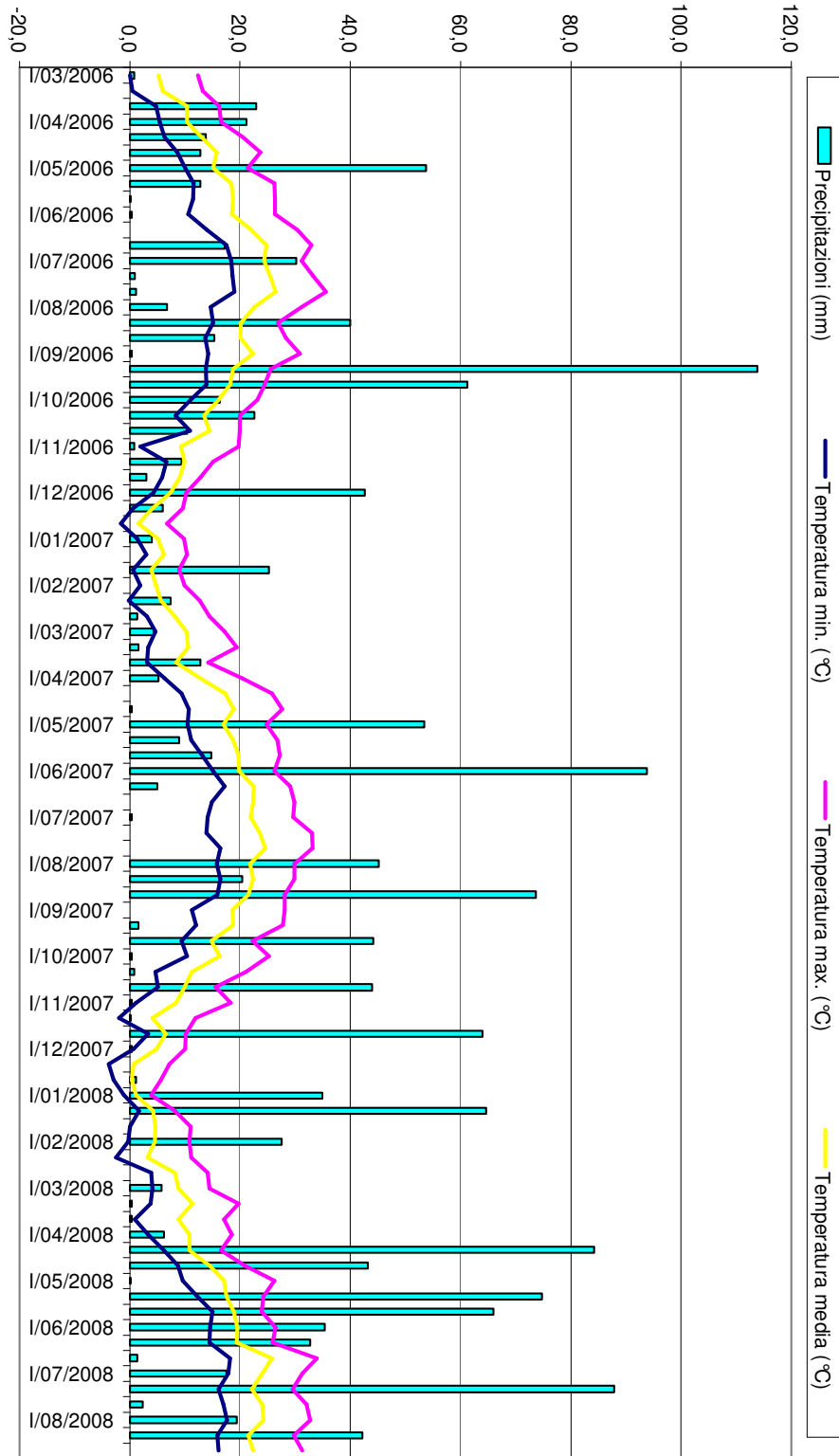


Figura 8. Andamento termo pluviometrico nella zona di Casale Monferrato (AL), secondo lo schema Bagnouls-Gaussen, nel periodo dal marzo 2006 all'agosto 2008.

Figura 9. Andamento delle temperature (°C) minime medie e massime (media dei valori giornalieri) e delle precipitazioni (mm) decadali (totali) relative a Casale Monferrato (AL), nel periodo marzo 2006 – agosto 2008.



4.2. RISULTATI RELATIVI AL PIOPPO

Si esporranno nell'ordine i risultati ottenuti nell'ambito dei vari obiettivi affrontati, e precisamente: presenza di endofiti fungini nelle talee, diffusione organotropica dei patogeni fungini dalle talee ai germogli, insediamento nel tempo degli endofiti nelle giovani piante, distribuzione dei vari endofiti fungini nelle varie parti delle piante, influenza della stazione, del materiale genetico o delle cure colturali (concimazione e/o irrigazione) sull'incidenza degli endofiti fungini, influenza della disidratazione o reidratazione delle pioppelle al trapianto sull'isolabilità degli endofiti, sul loro viraggio alla fase patogena e sulle crisi di trapianto.

4.2.1. PRESENZA DEGLI ENDOFITI FUNGINI NELLE TALEE

Gli isolamenti condotti a carico delle talee del clone 'L. Avanzo' provenienti dai barbatellai delle aziende Mezzi di Casale Monferrato ed Umbraflor di Spello hanno evidenziato (tabella 1) una diversa carica di endofiti. Le talee provenienti da Casale M.to, sono risultate ricche di endofiti patogeni corticali, soprattutto *Phomopsis* spp. (*P. pallida* (Sacc.) Harter e *P. macrospora* Kobay and Chiba; figura 8), *Cytospora chrysosperma* (Pers.) e *Fusarium* spp. (*F. proliferatum* (Mats.) Niren. e *F. semitectum* Berk. & Ravenel), a cui si univano endofiti patogeni non corticali (*Alternaria alternata*, ecc) e non patogeni, almeno su pioppo, quali *Epicoccum nigrum*, *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) e *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud. Al contrario, le talee provenienti dai barbatellai umbri, sono risultati privi di importanti endofiti patogeni corticali; buona parte degli endofiti aveva carattere non patogeno (tabella 1).

La rilevante carica di endofiti patogeni a Casale M.to è probabilmente connessa alla massiccia presenza di pioppeti nella zona, che inevitabilmente ha garantito (da rami secchi, piante dominate, ecc.) una continua, elevata carica di inoculo di agenti di necrosi corticali.

4.2.2. DIFFUSIONE ORGANOTROPICA DEGLI ENDOFITI FUNGINI

Nelle apposite prove condotte a Viterbo, le periodiche osservazioni condotte sui giovani germogli emessi dalle talee, sia provenienti da Casale Monferrato sia da Viterbo, non hanno in nessun caso fatto rilevare endofiti fungini (patogeni o non), (tabella1, figura

12). Ciò dimostra pertanto che gli endofiti fungini presenti nelle talee non passano in alcun caso nei nuovi germogli (assenza di diffusione organotropica).

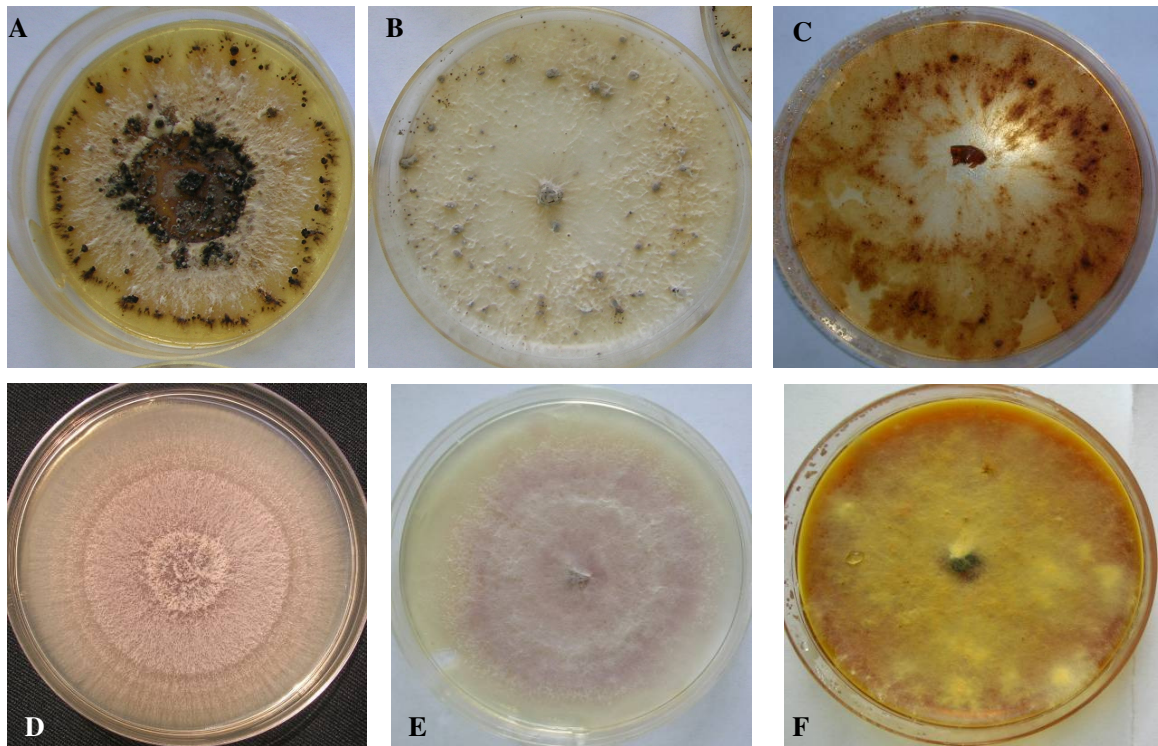


Figura 10. Colonie di alcune specie fungine isolate in purezza su PDA da pioppelle asintomatiche in vivaio. Agenti di necrosi corticali: *Phomopsis macrospora* (A); *P. pallida* (B); *Cytospora chrysosperma* (C); *Fusarium proliferatum* (D); *Fusarium semitectum* (E); specie non patogene: *Epicoccum nigrum* (F).

Generi fungini			Talee		Nuovi germogli	
			Provenienza Viterbo	Provenienza Casale M.to	Provenienza Viterbo	Provenienza Casale M.to
Patogeni	Agenti di necrosi corticale	<i>Phomopsis</i> spp.	0	20,60±2,33	0	0
		<i>Cytospora chrysosperma</i>	0	6,70±0,9	0	0
		<i>Discosporium populeum</i>	0	4,30±0,7	0	0
		<i>Fusarium</i> spp.	0	5,67±0,9	0	0
		Totale	0	37,27	0	0
	Altri	<i>Alternaria alternata</i>	28±2,4	48,40±2,7	0	0
Non patogeni		<i>Epicoccum nigrum</i>	16±1,96	17,40±2,13	0	0
		<i>Aureobasidium pullulans</i>	12±1,2	0	0	0
		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	18±2,3	0	0	0
		Totale	46	17,40	0	0
Altri			4,5±0,7	0	0	0
Isolamenti nulli			21,5±1,1	10,00±2,0	100	100
Totale			100	113,07	100	100

Tabella 1. Viterbo, primavera 2006. Frequenze di isolamento (%) di endofiti fungini riscontrate su talee del clone 'L. Avanzo' provenienti da Viterbo e Casale M.to, nel momento della messa a dimora e sui primi germogli dalle stesse emessi in vaso, in ambiente protetto.

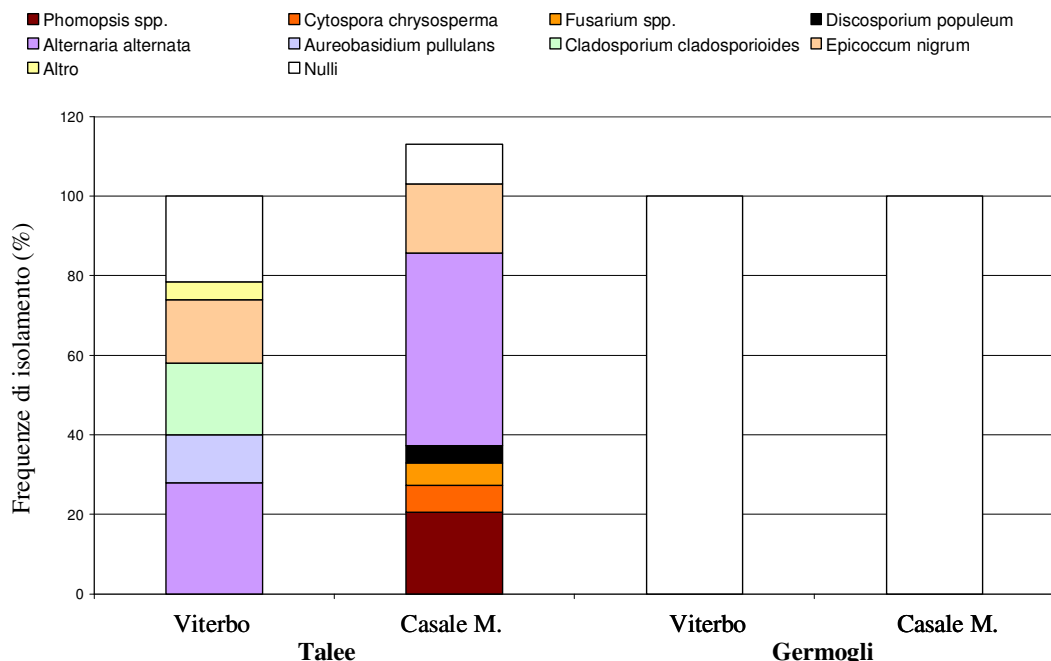


Figura 11. Viterbo, primavera 2006. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) di endofiti fungini riscontrate su talee del clone 'L. Avanzo' provenienti da Viterbo e Casale M.to, nel momento della messa a dimora e sui primi germogli dalle stesse emessi in vaso, in ambiente protetto.

4.2.3. INSEDIAMENTO DEGLI ENDOFITI FUNGINI NELLE PIOPPELLE

Come evidenziato nella tabella 2 e nella figura 13, i primi endofiti fungini riscontrati nelle giovani pioppelle del nuovo impianto, costituito nel 2006 a Viterbo, sono stati rilevati solo nel mese di settembre 2006, dopo le abbondanti piogge dell'agosto. A partire da tale periodo, si assiste ad un accumulo di endofiti nel tempo. Ciò sta ad indicare che le piogge hanno rappresentato il vettore principale degli endofiti.

4.2.4. DISTRIBUZIONE DEGLI ENDOFITI NELLE VARIE PARTI DELLA PIANTA.

Gli isolamenti, che hanno considerato i diversi organi di pioppelle al secondo anno del clone 'I-214' dei vivai di Casale Monferrato, hanno evidenziato come gli strati corticali del fusto siano le parti più ricche di endofiti, patogeni e non. In particolare, le frequenze di isolamento degli endofiti patogeni aumentano passando dalla porzione apicale a quella basale della pianta, sono sensibilmente più basse nelle gemme e nei germogli e pressoché assenti nei tessuti legnosi interni che risultano colonizzati solo saltuariamente. Negli strati corticali sono stati riscontrati *Phomopsis* spp., *Cytospora chrysosperma*, *Fusarium* spp., mentre *Discosporium populeum* era presente, seppure con frequenze estremamente basse, solo nella zona di passaggio tra la porzione di pioppella di un anno e quella di due anni di età (figura 14). D'altra parte è proprio al cercine che si osservano in genere i più frequenti attacchi sintomatici in campo di questo patogeno.

Gli organismi fungini non patogeni osservati sono *Epicoccum nigrum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Aureobasidium pullulans* (tabella 3); essi risultano presenti in modo piuttosto omogeneo nei diversi organi e tessuti, fatta eccezione per quelli legnosi la cui colonizzazione è estremamente scarsa (isolamenti muti pari a circa il 65%).

Generi fungini		Frequenze di isolamento (%)						
		Epoche dei campionamenti						
		2006					2007	
		Aprile	Giugno	Luglio	Settembre	Novembre	Gennaio	Marzo
Patogeni	<i>Biscogniauxia</i> sp.	0	0	0	1,2±0,6	4,8±1,9	6,6±2,3	8,2±
	<i>Alternaria alternata</i>	0	0	0	15,2±2,2	23,7±3,1	26,5±3,4	27,4±2,9
	Totale patogeni	0	0	0	16,4	28,5	33,1	35,6
Non patogeni	<i>Epicoccum nigrum</i>	0	0	0	6,5±1,7	11,6±1,5	9±2,0	8,4±2,1
	<i>Cladosporium</i> spp.	0	0	0	3,9±0,9	18,3±2,8	18,9±2,4	18,4±3,1
	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	3,2±1,1	13,5±2,3	13,1±1,8	12,6±2,1
	Totale non patogeni	0	0	0	13,6	43,4	41	39,4
Isolamenti nulli		100	100	100	70±4,7	28,1±3,6	25,9±3,8	25±3,3
Totale		100	100	100	100	100	100	100

Tabella 2. Viterbo, 2006-2007. Frequenze di isolamento (%) degli endofiti fungini riscontrati sulle giovani pioppelle del clone 'L. Avanzo' originati dalle talee messe a dimora nell'aprile 2006. Rilievi effettuati dall'aprile 2006 al marzo 2007.

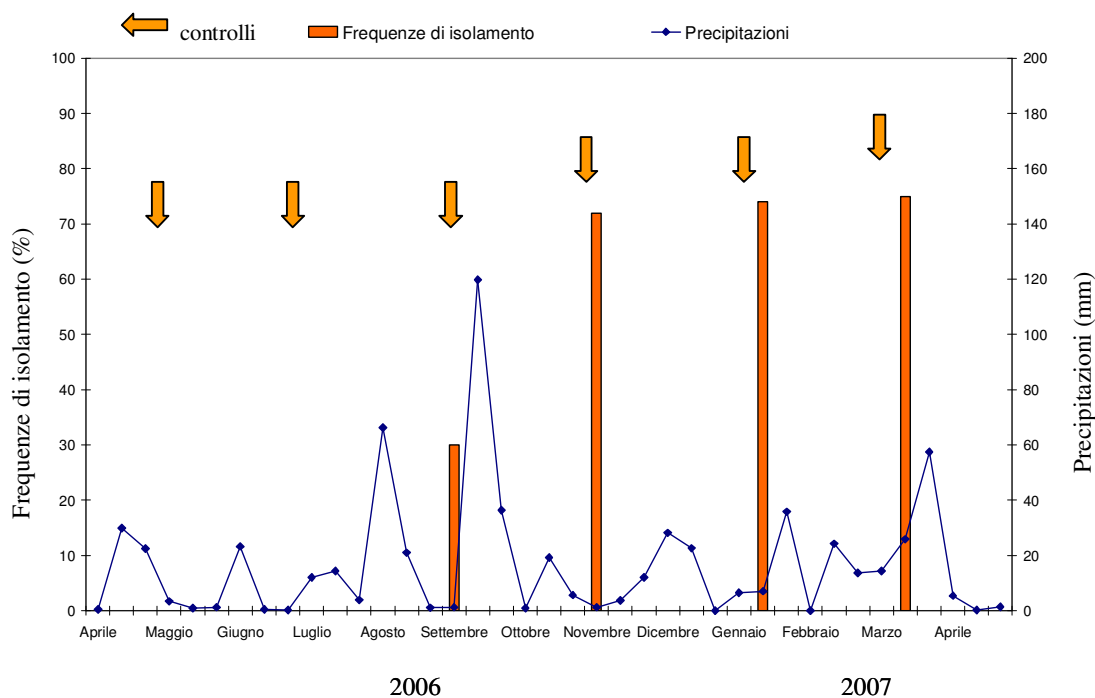


Figura 12. Viterbo, 2006-2007. Istogrammi delle frequenze di isolamento positive (%) di endofiti fungini sulle giovani pioppelle del clone 'L. Avanzo' originate da talee messe a dimora nell'aprile 2006 e andamento delle precipitazioni decadali (mm) del periodo da aprile 2006 ad aprile 2007.

Generi fungini			Frequenze di isolamento (%)				
			Gemme	Tessuti corticali del fusto			Legno zona basale
				Zona apicale	Zona cercine	Zona basale	
Patogeni	Agenti di necrosi corticale	<i>Phomopsis</i> spp.	0,00	12,33±2,3	10,67±2,1	18,60±1,7	0,00
		<i>Cytospora chrysosperma</i>	2,20±0,3	10,20±1,7	11,00±1,1	9,67±0,9	0,00
		<i>Discosporium populeum</i>	0,00	0,00	4,67±0,8	0,00	0,00
		<i>Fusarium</i> spp.	6,67±1,2	0,00	5,67±1,3	3,30±1,04	0,00
		Totale	8,87	22,53	32,01	31,57	0,00
Altri	<i>Alternaria alternata</i>	0	12,33±2,4	10,67±2,1	18,60±1,7	0,00	
Non patogeni		<i>Epicoccum nigrum</i>	44,30±3,7	50,30±4,1	53,33±	42,40±	28,60±
		<i>Aureobasidium pullulans</i>	3,40±1,6	2,90±0,7	3,30±0,9	4,00±1,2	0,00
		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4,40±1,3	4,20±0,9	4,00±0,7	4,16±1,1	1,80±0,7
		Totale non patogeni	46	31,30	6,67	3,40	17,40
Isolamenti nulli			11,60±1,3	14,67±1,2	10,40±1,5	10,00±2,2	65,20±4,7
Totale			103,87	101,27	106,43	109,53	100,00

Tabella 3. Casale Monferrato, 2007. Frequenze di isolamento (%) di endofiti fungini su parti diverse di pioppelle del clone 'I-214' al secondo anno di vivaio.

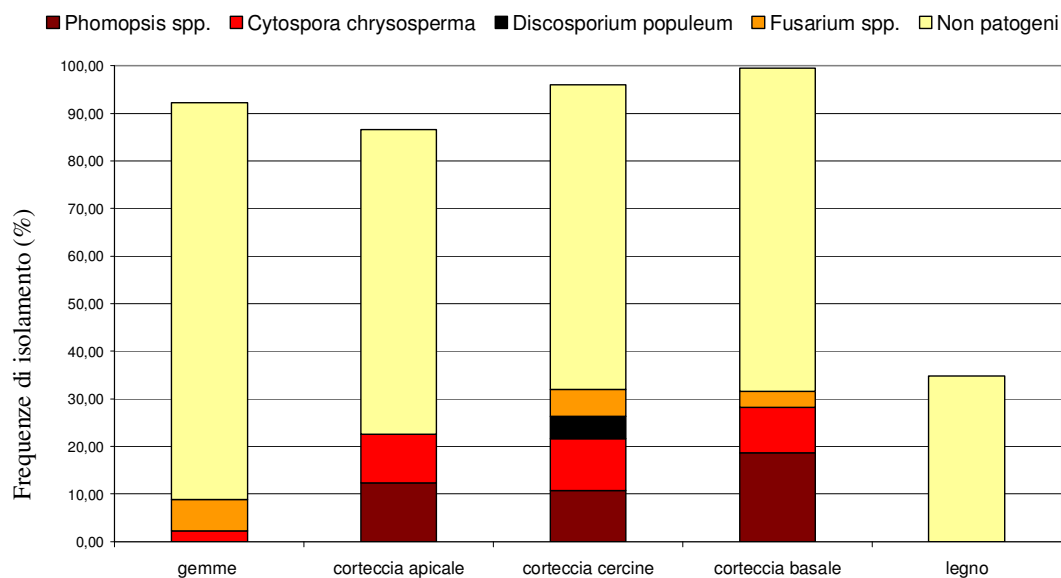


Figura 13. Casale Monferrato, 2007. Frequenze di isolamento (%) di endofiti fungini su parti diverse di pioppelle al secondo anno di vivaio del clone 'I-214'.

4.2.5. INFLUENZA DELLA STAZIONE SULL'INCIDENZA DEGLI ENDOFITI

Il confronto tra gli isolamenti condotti sulle pioppelle di un anno del clone 'L. Avanzo' allevate a Viterbo e quelli condotti su pioppelle del medesimo clone allevate a Casale Monferrato ha evidenziato differenze sostanziali e significative.

Le due stazioni hanno fortemente influenzato la composizione degli endofiti nelle piante, probabilmente per la diversità degli inoculi presenti nelle due zone considerate (vedi capitolo 4.2.1.). A Viterbo, ad esempio, né sulle piantine esaminate in vivaio, né sui pioppi adulti presenti nelle vicinanze dello stesso, in verità abbastanza sporadici, è stata riscontrata la presenza endofitica di *Phomopsis* spp., *Discosporium populeum*, *Fusarium* spp., rilevati invece a Casale Monferrato (tabella 4, figura 15), sia su materiale vivaistico che su piante adulte.

Merita essere sottolineato come dal complesso degli isolamenti effettuati sia sempre stata constatata l'assenza completa nel Centro Italia ed una presenza assai sporadica a Casale Monferrato di *Discosporium populeum*, patogeno che in passato rappresentava il principale responsabile di crisi di trapianto, soprattutto nel Nord.

Generi fungini			Frequenze di isolamento (%)			
			Gemme		Strati corticali	
			Viterbo	Casale M.to	Viterbo	Casale M.to
Patogeni	Agenti di necrosi corticale	<i>Phomopsis</i> spp.	0	8,73±1,55	0	11,4±1,7
		<i>Cytospora chrysosperma</i>	0	6,7±0,8	0	8,7±1,1
		<i>Discosporium populeum</i>	0	3±0,9	0	4,8±1,35
		<i>Fusarium</i> spp.	0	3,2±0,7	0	3,6±1,1
		<i>Biscogniauxia</i> sp.	8±1,2	0	8±1,4	0
		Totale	8	21,63	8	28,5
	Altri	<i>Phoma</i> sp.	0	4,4±0,65	0	4,2±0,4
		<i>Alternaria alternata</i>	27±3,8	42±4,3	30,3±2,9	36±3,85
Non patogeni		<i>Epicoccum nigrum</i>	8±1,75	6,8±1,3	10±1,1	15±1,9
		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	18±2,35	6,7±2,6	19,7±3,1	6±1,5
		<i>Penicillium</i> spp.	12±1,4	0	13±1,2	0
		Totale	38	13,5	42,7	21
Isolamenti nulli			28±2,4	20±1,9	20±1,4	15,6±1,3
Totale			101	101,53	101	105,3

Tabella 4. Marzo 2007. Frequenze di isolamento (%) di endofiti fungini su pioppelle del clone 'L. Avanzo' al primo anno, relative a gemme e strati corticali della parte basale del fusto, nei vivaia di Viterbo e Casale Monferrato.

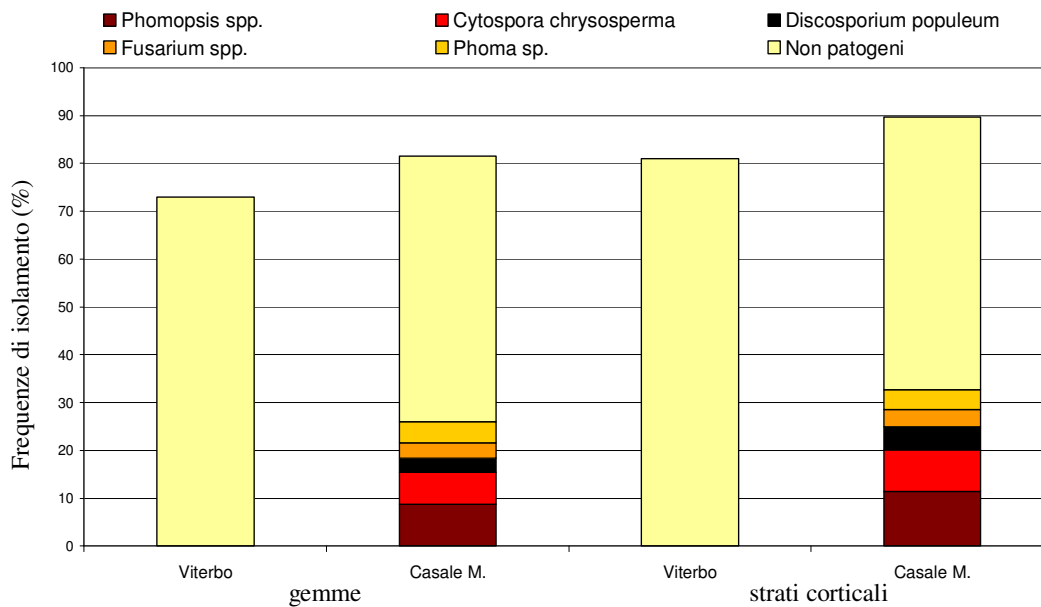


Figura 14. Marzo 2007. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) di endofiti fungini su pioppelle del clone 'L. Avanzo' al primo anno; relative a gemme e strati corticali della parte basale del fusto, nei vivai di Viterbo e Casale Monferrato.

4.2.6. VARIABILITÀ DEGLI ENDOFITI IN FUNZIONE DELLA SPECIE E/O DEL CLONE OSPITE

I rilievi condotti sulle diverse specie e cloni considerati nei vivai di Casale Monferrato hanno fatto rilevare una scarsa diversificazione nella flora endofitica. È stata comunque evidenziata una più elevata frequenza di isolamento di endofiti patogeni nei cloni di *Populus x euramericana*, in particolare su 'I-214' e 'L. Avanzo'. Non è escluso che a questo, almeno in parte, sia correlabile la consistente predisposizione di questi cloni agli attacchi di agenti di necrosi corticali in campo.

Per contro, gli ibridi di *Populus trichocarpa*, Beaupré e Thricobel, e quello di *P. deltoides*, Lux, hanno presentato frequenze di isolamento degli endofiti patogeni sensibilmente più basse degli altri cloni considerati (es. 60,43, 60,57, 56,16% rispettivamente su Lux, Beaupré e Thricobel contro l'81,69% dell'I-214', tabella 5).

In tali cloni non è mai stata riscontrata la presenza di *Discosporium populeum*, a cui *Populus trichocarpa* e *P. deltoides* sono tendenzialmente resistenti.

Generi fungini			Frequenze di isolamento (%)					
			I-214	L. Avanzo	Lux	Beauprè	Thricobel	Villafranca
Patogeni	Agenti di necrosi corticale	<i>Phomopsis</i> spp.	16,52 ±3,4	15,81 ±2,6	12,29 ±2,2	12,29 ±1,9	11,52 ±1,8	12,05 ±1,5
		<i>Cytospora chrysosperma</i>	10,70 ±2,2	13,20 ±1,8	8,50 ±1,6	3,20 ±0,6	4,43 ±1,1	6,60 ±1,1
		<i>Discosporium populeum</i>	5,29 ±2,1	4,76 ±1,7	3,92 ±0,8	0,00	0,00	3,76 ±0,6
		<i>Fusarium</i> spp.	5,31 ±0,8	2,30 ±0,5	0,00	0,00	4,76 ±1,1	0,00
		Totale	37,82	36,07	24,71	15,49	20,72	22,41
	Altri	<i>Phoma</i> sp.	2,60 ±0,9	1,30 ±0,8	5,92 ±1,1	0,00	1,80 ±0,6	4,76 ±1,2
		<i>Alternaria alternata</i>	41,27 ±4,5	40,10 ±3,8	29,80 ±3,6	45,08 ±3,8	33,64 ±2,9	41,33 ±5,3
Non patogeni	<i>Epicoccum nigrum</i>	15,53 ±1,8	16,38 ±2,3	17,70 ±2,0	20,05 ±3,0	16,80 ±2,4	13,76 ±1,9	
	Totale	15,53	16,38	17,70	20,05	16,80	13,76	
Isolamenti nulli			6,90 ±1,2	12,38 ±0,9	22,86 ±2,4	20,05 ±2,0	27,39 ±3,4	18,34 ±2,2
Totale			104,12	106,23	100,99	100,66	100,34	100,61

Tabella 5. Casale Monferrato, marzo 2007. Frequenze di isolamento (%) di endofiti fungini negli strati corticali della parte basale del fusto di pioppelle al primo anno di vivaio relativi a diversi cloni di pioppo.

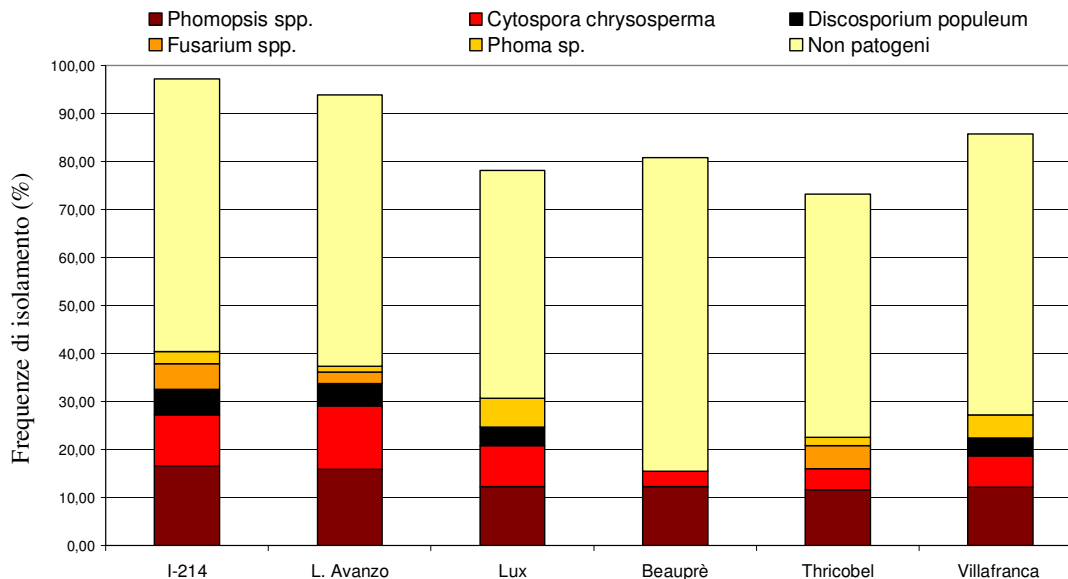


Figura 15. Casale Monferrato, marzo 2007. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) di endofiti fungini negli strati corticali della parte basale del fusto di pioppelle al primo anno di vivaio relativi a diversi cloni di pioppo.

4.2.7. INFLUENZA DEI REGIMI IDRICI IN VIVAIO SULL'INCIDENZA DEGLI ENDOFITI NELLE PIOPPELLE

4.2.7.1. Indagini condotte a Viterbo

A Viterbo è stata seguita, come si ripete, l'incidenza degli endofiti fungini su pioppelle del clone L. Avanzo al primo e al secondo anno di vivaio allevate in parcelle sottoposte, o meno, ad irrigazione e/o concimazione bilanciata NPK.

Complessivamente sono state realizzate 4 tesi: una parcella testimone, senza alcun trattamento, una sottoposta ad irrigazione, una sottoposta ad irrigazione e concimazione ed una sottoposta alla sola concimazione.

In questa stazione, a differenza di quanto riscontrato a Casale M.to (vedi poi), non sono stati riscontrati endofiti agenti di necrosi corticali specifici del pioppo (la presenza di *Biscogniauxia* sp., agente del cancro carbonioso delle querce, è giustificata dal forte inoculo derivato da roverelle deperienti adulte vicino al vivaio). Probabilmente per tale motivo non sono state riscontrate differenze significative tra le incidenze dei vari endofiti nelle tesi realizzate (tabella 6).

Cionondimeno i dati relativi al vivaio di Viterbo ci sono stati di grande aiuto per comprendere gli effetti di tali tecniche colturali sullo sviluppo delle piante.

Dalla tabella 7 emerge infatti come mentre una concimazione bilanciata non influisce significativamente sull'accrescimento delle piante, l'irrigazione abbia sempre indotto un accrescimento delle pioppelle significativamente maggiore delle parcelle non irrigate, sia in diametro sia in altezza, tanto al primo quanto al secondo anno. Le pioppelle delle parcelle irrigate al secondo anno, ad esempio, hanno presentato altezze e diametri medi di quasi il 30% superiori a quelli delle parcelle non irrigate (441,5 cm contro 310 cm per l'altezza; 4,4 cm contro 3,4 cm per il diametro).

Generi fungini		Frequenze di isolamento (%)			
		Trattamenti in vivaio			
		Tesimone	Irrigato	Irrigato e Concimato	Concimato
Patogeni	<i>Biscogniauxia</i> sp.	1,2±0,6	1±0,8	1,1±0,4	0,8±0,4
	<i>Alternaria alternata</i>	15,2±2,2	16,6±3,1	14,9±1,6	16,7±2,3
	Totale	16,4	17,6	16	17,5
Non patogeni	<i>Epicoecum nigrum</i>	6,5±1,7	9,4±1,8	4,6±1,2	6,4±1,3
	<i>Cladosporium</i> spp.	3,9±0,9	4,5±0,6	6,3±1,3	6,6±1,1
	<i>Penicillium</i> spp.	3,2±1,1	2,9±0,7	4,4±0,3	3,8±0,9
	Totale	13,6	16,8	15,3	16,8
Isolamenti nulli		70±4,7	65,6±3,4	68,7±4,0	65,7±5,5
Totale		100	100	100	100

Tabella 6. Viterbo, settembre 2006. Frequenze di isolamento (%) di endofiti fungini in tessuti corticali di pioppelle di L. Avanzo al secondo anno di vivaio.

Trattamento		Fine 1° anno		Fine 2° anno	
		Altezza * (cm)	Diametro * (cm)	Altezza * (cm)	Diametro * (cm)
Concimato	Irrigato	289,42 a	2,28 a	490,36 a	4,52 a
	Non irrigato	201,75 b	1,11 b	404,78 b	3,46 b
Non concimato	Irrigato	292,43 a	2,24 a	496,22°a	4,31 a
	Non irrigato	194,21 b	1,14 b	399,84 b	3,34 b

Tabella 7. Altezze e diametri medi (cm) di pioppelle di 1 e 2 anni del clone L. Avanzo sottoposti ai diversi trattamenti di concimazione e irrigazione in vivaio.

* I valori di ciascuna colonna contrassegnati con la medesima lettera non differiscono tra loro per P=0,05.

4.2.7.2. Indagini condotte a Casale Monferrato

Come indicato nei materiali e metodi, dette ricerche sono state condotte a Casale Monferrato considerando pioppelle di *Populus nigra* al secondo anno di vivaio allevate in parcelle sottoposte a tre diversi regimi di irrigazione: parcelle “wet”, “ambient” e “dry”, rispettivamente irrigate artificialmente, in condizioni ambientali e sottoposte a carenza idrica mediante intercettazione dell’acqua sotto chioma.

Tali indagini hanno in primo luogo confermato la distribuzione e composizione degli endofiti all'interno dei diversi organi: i tessuti legnosi sono sempre scarsamente colonizzati mentre le gemme e soprattutto gli strati corticali presentano frequenze di isolamento di endofiti, patogeni e non, più elevate. Questo andamento viene confermato in tutte le tesi, a prescindere dal regime di idratazione a cui erano sottoposte le pioppelle.

Quanto all'incidenza asintomatica dei vari funghi nelle piante delle diverse tesi, è emerso che gli endofiti fungini non patogeni subiscono un decremento, seppur lieve, su pioppelle cresciute in condizioni di stress, mentre quelli patogeni invece sembra riescano a trarre vantaggio quando le pioppelle in vivaio sono sottoposte a carenze idriche (tabella 8 e figura 17). Le frequenze di isolamento degli endofiti patogeni, sia negli strati corticali sia nel legno, sono infatti più elevate nelle parcelle scarsamente irrigate e più basse in caso di irrigazioni in vivaio e conseguente buona vigoria delle piante (tabella 8 e figura 17).

Negli strati corticali i patogeni agenti di necrosi corticali sono stati *Phomopsis* spp., *Cytospora chrysosperma*, *Fusarium* spp. e *Discosporium populeum*. La loro frequenza di isolamento complessiva passa da 20,33% nella parcella dry, a 17,58% nella testimone (la differenza comunque non è statisticamente significativa), per scendere addirittura al 10,2% in quella irrigata. Nel legno tale frequenza complessiva passa da 12,57% nelle piante dry a 7,25% nel testimone, fino ad annullarsi, come si ripete, nelle piante irrigate. Questo calo di presenza è pressoché analogo per *Phomopsis* e *Cytospora*, mentre *Fusarium* e *Discosporium* scompaiono addirittura nelle piante irrigate. Questo ultimo patogeno è peraltro risultato sempre assente nel legno.

Da sottolineare il comportamento di *Discosporium populeum*, la cui presenza è apparsa saltuaria e con frequenze di isolamento sempre molto basse, ma che tuttavia non è stato mai rilevato nelle pioppelle sottoposte ad irrigazione.

L'irrigazione, oltre ad aver influito sulla composizione endofitica, sia patogena sia non patogena, al pari di quanto avvenuto a Viterbo, ha indotto un maggior accrescimento delle pioppelle rispetto a quelle testimoni e non irrigate. Omettendo il dettaglio dei dati si indica ad esempio l'altezza media delle piante irrigate (wet) raggiungeva gli 850 cm contro 799 cm di quelle del testimone ed appena 734 cm delle piante nella parcella "dry". Resta pertanto da comprendere se la minor incidenza di endofiti nelle piante irrigate sia da imputare al fatto che esse non abbiano subito stress idrico o, piuttosto, ad una loro "sfuggenza" alle cariche di inoculo.

4.2.8. INFLUENZA DELLO STATO DI IDRATAZIONE DELLE PIOPPELLE AL TRAPIANTO SULL'ISOLABILITÀ DEGLI ENDOFITI

Queste indagini sono state condotte su piante provenienti dalle sopradescritte parcelle, sottoposte per due anni a diversificati regimi di idratazione: parcelle “wet” e “dry”, rispettivamente irrigate artificialmente e sottoposte a disidratazione mediante intercettazione dell'acqua sotto chioma.

L'incidenza degli agenti di necrosi corticali allo stato endofitico nelle pioppelle, otto giorni dopo la messa a dimora (e dopo l'eventuale trattamento di idratazione delle piante) e quindi durante l'avvio della germogliazione *post*-trapianto, mentre ha continuato ad essere condizionata dal regime idrico riservato al vivaio, non è risultata influenzata da trattamenti di idratazione agli astoni effettuati appena prima della messa a dimora.

Infatti, le piante provenienti da parcelle in stress idrico hanno continuato a presentare frequenze di isolamento di endofiti fungini patogeni più elevate rispetto a quelle provenienti dalle parcelle irrigate; in particolare, *Discosporium populeum* passava da valori di 3,33% (provenienti da parcella dry e non reidratate) e 4,67% (provenienti da parcella dry e reidratate) a valori di 1,67% (provenienti da parcella wet e non reidratate) fino a scomparire nella tesi proveniente dalla parcella irrigata e le cui pioppelle venivano reidratate prima della messa a dimora (tabella 9).

Per quanto concerne l'influenza sull'isolabilità degli endofiti fungini da parte del trattamento di idratazione delle pioppelle al trapianto, a mezzo immersione in acqua per 5 giorni, non sembrerebbero emergere risultati rilevanti, almeno nella prima settimana dal trattamento. Quantunque le piante disidratate presentino una maggiore isolabilità di taluni patogeni agenti di necrosi corticali, le differenze non risultano essere statisticamente significative.

Sebbene le frequenze di isolamento di detto patogeno siano sempre molto basse, questo ha mostrato la più alta sensibilità allo stato idrico delle piante.

Generi fungini			Frequenze di isolamento (%)					
			Strati corticali			Legno		
			Dry	Amb	Wet	Dry	Amb	Wet
Patogeni	Agenti di Necrosi corticale	<i>Phomopsis</i> spp.	10,73 ±0,95	8,90 ±0,85	5,60 ±0,8	5,56 ±1	1,60 ±0,3	0,00
		<i>Cytospora chrysosperma</i>	6,60 ±0,9	5,83 ±0,8	4,60 ±0,5	4,30 ±0,5	2,80 ±0,5	0,00
		<i>Discosporium populeum</i>	3,00 ±0,5	2,85 ±0,7	0,00	2,71 ±0,6	2,85 ±0,8	0,00
		<i>Fusarium</i> spp.	4,71 ±1,1	2,20 ±0,8	0,00	0,00	0,00	0,00
		Totale	25,04	19,78	10,2	12,57	7,25	0,00
Non patogeni	Altri	<i>Alternaria alternata</i>	53,29 ±3,4	60,14 ±4,2	56,27 ±3,8	16,14 ±3,3	16,28 ±3,5	10,58 ±2,6
		<i>Epicoccum nigrum</i>	8,56 ±1,1	6,71 ±0,9	10,40 ±1,2	0,00	8,42 ±1,1	2,85 ±0,6
Totale			8,56	6,71	10,40	0,00	8,42	2,85
Altro			2,86 ±0,7	3,60 ±1,1	2,90 ±0,6	0,00	0,00	0,00
Isolamenti nulli			14,43 ±1,7	12,14 ±1,2	20,56 ±2,7	71,43 ±4,7	68,57 ±4,6	86,57 ±5,4
Totale			101,17	102,37	100,33	100,14	100,52	100,00

Tabella 8. Casale M.to fine stagione vegetativa 2007. Frequenze di isolamento (%) negli strati corticali e nel legno di piante di *Populus nigra* al secondo anno di vivaio in parcelle sottoposte a diverso regime idrico: dry = carenza idrica; amb = condizioni ambientali; wet = con irrigazione.

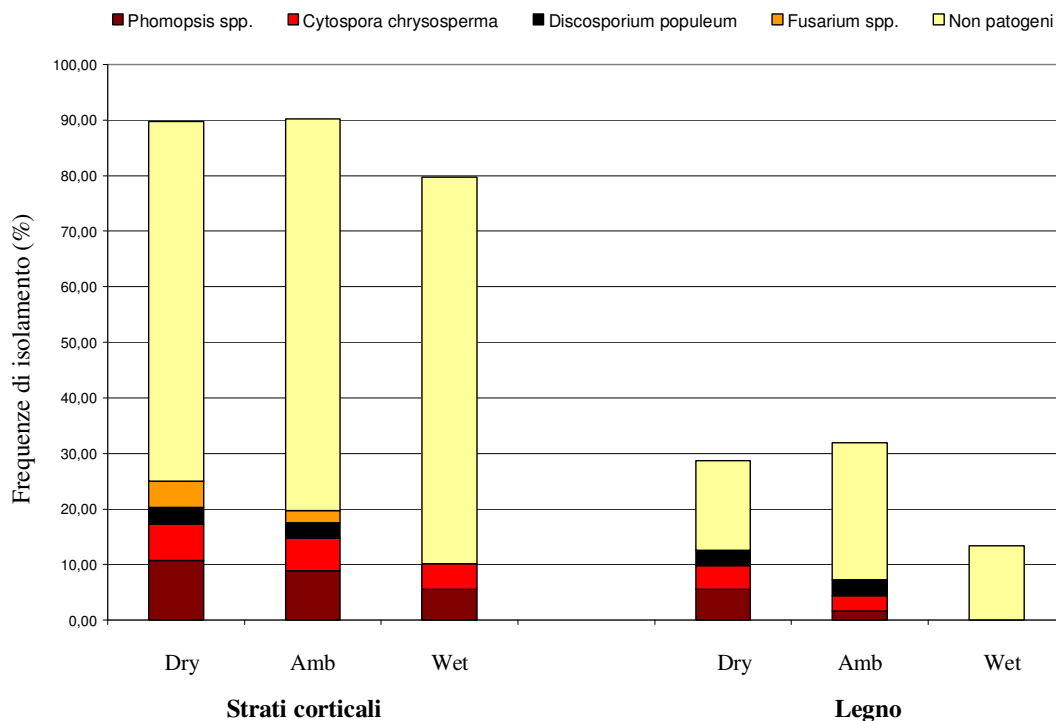


Figura 17. Casale M.to fine stagione vegetativa 2007. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) negli strati corticali e nel legno di piante di *Populus nigra* al secondo anno di vivaio in parcelle sottoposte a diverso regime idrico: dry = carenza idrica; amb = condizioni ambientali; wet = con irrigazione.

Generi fungini>			Frequenze di isolamento (%)			
			Strati corticali			
			WET		DRY	
			Reidratate	Non reidratate	Reidratate	Non reidratate
Patogeni	Agenti di necrosi corticale	<i>Phomopsis</i> spp.	16,30±2,1	13,40±2,6	22,00±3,0	20,67±5,1
		<i>Cytospora chrysosperma</i>	6,67±2,4	4,67±2,6	11,67±3,2	7,67±3,9
		<i>Discosporium populeum</i>	1,67±1,2	0,00	3,33±1,5	4,67±2,3
		<i>Fusarium</i> spp.	0,00	1,67±1,2	1,67±0,9	0,00
		Totale	24,63	19,73	38,67	33,00
Non patogeni	Altri	<i>Alternaria alternata</i>	40,00±12,2	43,20±7,8	42,24±9,8	38,67±10,1
		<i>Cladosporium</i> spp.	4,67±1,6	4,60±2,3	6,33±3,2	10,33±2,4
		<i>Epicoccum nigrum</i>	15,40±2,6	15,33±4,1	13,80±2,8	13,20±3,3
		Totale	20,07	19,93	20,13	23,53
Altro			3,20±2,4	0,00	0,00	0,00
Isolamenti nulli			12,33±3,6	20,33±4,5	9,66±3,3	10,60±4,0
Totale			100,23	103,20	110,70	105,80

Tabella 9. Casale M.to Primavera 2007. Frequenze di isolamento (%) in strati corticali di piante del clone I-214 al secondo anno di vivaio provenienti da parcelle irrigate (wet) o meno (dry), e sottoposte o meno a reidratazione con bagno in acqua prima della messa a dimora. Rilievi effettuati 8 giorni dopo il trapianto e la reidratazione delle piante.

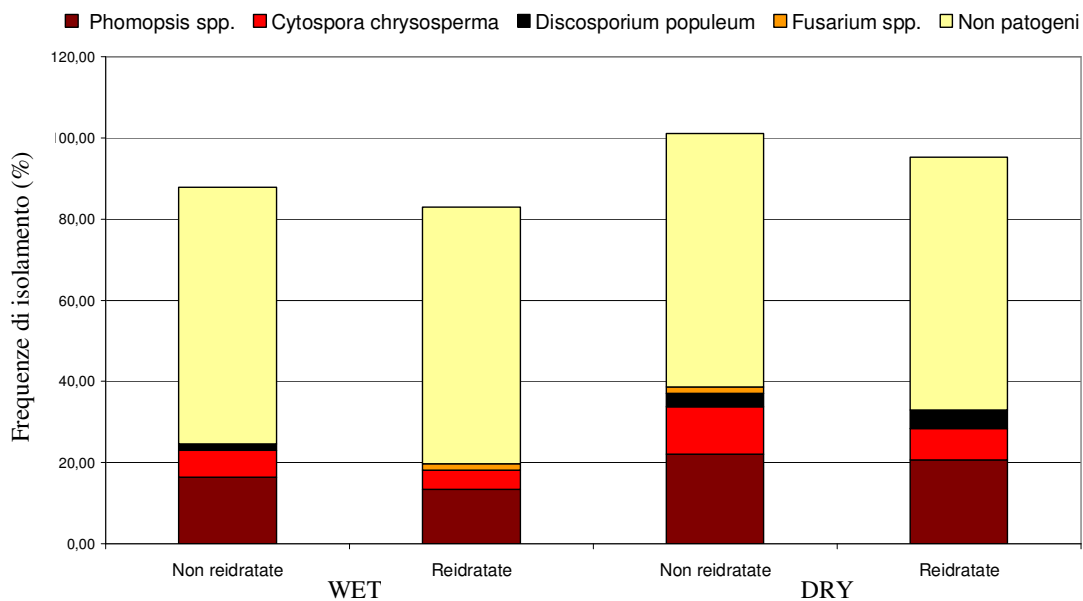


Figura 16. Casale M.to, primavera 2007. Frequenze di isolamento (%) in strati corticali di piante del clone I-214 al secondo anno di vivaio provenienti da parcelle irrigate (wet) o meno (dry), e sottoposte o meno a reidratazione con bagno in acqua prima della messa a dimora. Rilievi effettuati 8 giorni dopo il trapianto e la reidratazione delle piante.

4.2.9. INFLUENZA DELLO STATO DI IDRATAZIONE DELLE PIOPPELLE AL TRAPIANTO SULL'INCIDENZA DELLE NECROSI CORTICALI E SULLE CRISI DI TRAPIANTO

Come detto in precedenza, le indagini relative a questi aspetti sono state condotte nell'arco di due anni, 2007 e 2008.

4.2.9.1. Ricerche condotte nel 2007

Nel 2007 le indagini hanno preso in considerazione 5 diverse tesi: testimone non trattato; immersione in acqua per 10 giorni; esposizione all'aria per 5 giorni e immersione in acqua per altrettanto tempo; esposizione all'aria per 5 giorni; esposizione all'aria per 10 giorni.

Effetti dell'esposizione all'aria o dell'immersione in acqua sul contenuto idrico delle pioppelle

Nella tabella 10 è indicato il contenuto idrico (percentuale di umidità rispetto al peso secco) degli astoni prima della messa a dimora nelle diverse tesi considerate, mentre nella figura 18 sono riportati i relativi istogrammi.

Da tali rappresentazioni emerge come l'esposizione delle pioppelle all'aria o la loro immersione in acqua inducano una forte variazione nel loro contenuto idrico. Mentre un'esposizione delle pioppelle all'aria per 5 o 10 giorni ne riduce il contenuto idrico circa del 25 e 40% rispettivamente, al contrario, una loro immersione in acqua per 10 giorni quasi ne raddoppia il contenuto idrico.

Tuttavia, le piante disidratate per una esposizione all'aria di 5 giorni, se poi rimesse a bagno per altrettanto tempo, si imbibiscono nuovamente con un incremento dell'iniziale contenuto idrico di oltre il 30%.

Effetti della disidratazione od imbibizione delle pioppelle sull'isolabilità degli endofiti

Dalle frequenze di isolamento degli endofiti patogeni corticali relativi alle pioppelle sottoposte ai diversi trattamenti (tabella 11 e figura 19), riscontrata 20 giorni dopo l'inizio della germogliazione, si nota come una immersione in acqua delle piantine in fase di trapianto non ne modifichi sostanzialmente i valori mentre una disidratazione per esposizione all'aria, incrementi significativamente detta incidenza. In particolare, le frequenze di isolamento di *Phomopsis* spp. passano da 16,6% a 31,% e 36,11% rispettivamente negli astoni testimone (nessun trattamento) ed in quelli esposti all'aria

per 5 e 10 giorni mentre quelle di *Cytospora chrysosperma* passano da valori di 7,33% a 17,78 e 22,22%, ed infine *Discosporium populeum* da 5,4% a 7,67 e 9,33%.

Tuttavia una esposizione all'aria delle pioppelle per 5 giorni seguita da una reidratazione delle stesse per immersione in acqua per altrettanti giorni, riduce in genere nuovamente l'isolabilità di tali endofiti.

Effetti della disidratazione o della imbibizione delle pioppelle sullo sviluppo di necrosi corticali e sulla mortalità delle piante

Dai monitoraggi effettuati 45 giorni dopo l'impianto (figura 20) è emerso come la disidratazione delle pioppelle in fase di trapianto induca i patogeni endofitici ad un viraggio dallo stato asintomatico a quello patogenetico, con evidenti manifestazioni sintomatiche e talora fruttificazioni fungine.

Gli agenti maggiormente riscontrati sono stati *Phomopsis* spp. (con ~ 65% ed oltre delle piante colpite dalle sue fruttificazioni), *Cytospora* spp. (con ~ 30%) e *Discosporium populeum* (< 5%).

La percentuale di superficie esterna necrosata media al fusto per pianta a causa di attacchi di patogeni, nulla nelle piante messe a bagno, passa da 5% nel testimone a 42% ed addirittura oltre l'80% nelle piante lasciate all'aria per 5 e 10 giorni rispettivamente. Nel caso in cui le piante disidratate (5 giorni all'aria) vengano reidratate attraverso immersione in acqua (5 giorni), la superficie necrosata scende dal 42 al 23% (figura 20). Tali attacchi sintomatici nel tempo, in alcuni casi, hanno avuto come conseguenza la morte delle piante. Nella figura 21 si riportano gli istogrammi della percentuale di piante morte per le varie tesi, a fine giugno 2007, a 3 mesi dall'impianto. Tale mortalità è intorno al 9% nel testimone, si annulla nella tesi con piante sottoposte ad idratazione (immersione in acqua), mentre sale al 30% e addirittura all'85% con piante esposte all'aria per 5 e 10 giorni rispettivamente. Come avviene per le necrosi corticali, l'immersione in acqua (5 giorni) delle pioppelle precedentemente esposte all'aria (5 giorni), grazie alla reidratazione delle stesse (vedi tabella 10) fa scendere la mortalità dal 30 al 13%. Dai risultati ottenuti sembra che esista una chiara correlazione inversa tra il contenuto idrico delle pioppelle, l'isolabilità degli endofiti agenti di necrosi corticali, (e soprattutto) l'incidenza delle necrosi corticali e la mortalità delle piante.

La figura 22 riporta la retta di regressione della frequenza di isolamento (%) degli endofiti agenti di necrosi corticali sul contenuto idrico delle piante prima della messa a dimora, escludendo le piante reidratate. Si può notare una correlazione inversa

altamente significativa ($R^2=0,97$) tra il contenuto idrico delle pioppelle e la frequenza di isolamento.

Detta correlazione aumenta ($R^2=0,99$) considerando l'incidenza della sola *Phomopsis* spp. (figura 23), che è apparso peraltro tra gli endofiti patogeni corticali il più diffuso, andando a rappresentare intorno al 50% degli stessi.

Anche gli attacchi di necrosi corticali e la mortalità delle piante sono tendenzialmente correlati con il contenuto idrico delle piante e con l'incidenza degli endofiti patogeni corticali, ma con significatività per P leggermente superiore a 0,05. Una correlazione altamente significativa ($R^2=0,942$) è risultata invece tra superficie corticale necrosata ad opera di patogeni fungini e la mortalità delle piante dopo il trapianto (figura 24).

L'evidente correlazione (in verità non sempre suffragata da elevata significatività statistica) tra isolabilità degli endofiti patogeni corticali, incidenza degli attacchi sintomatici e mortalità delle piante dopo il trapianto sembra dimostrare un legame tra l'incidenza di tali endofiti e le crisi di trapianto.

Zona della pioppelle	Trattamento				
	Nessuno (Tesimone)	10 gg. in acqua	5 gg. all'aria e 5 gg. in acqua	5 gg. all'aria	10 gg. all'aria
Basale	128±3,2	246±6,8	160±3,3	98±4,9	80±3,3
Apicale	126±4,2	227±4,5	230±6,6	110±3,4	85,36±3,6

Tabella 10. Casale M.to, aprile 2007. Contenuto idrico (% di acqua rispetto al peso secco) delle pioppelle al momento del taglio e a seguito dei diversi trattamenti di idratazione e/o disidratazione.

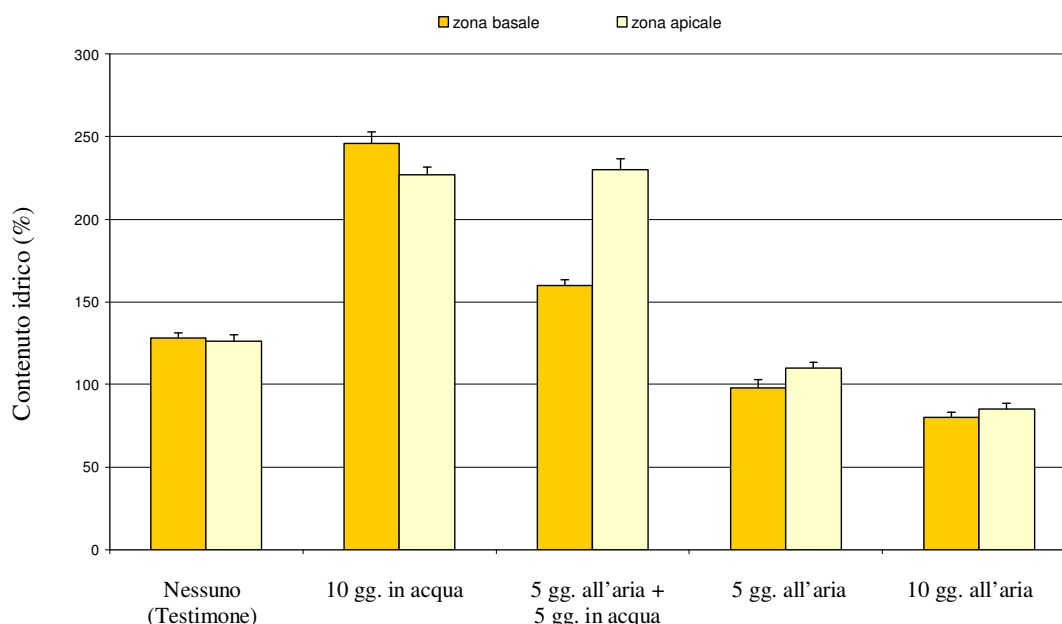


Figura 17. Casale M.to, aprile 2007. Istogrammi del contenuto idrico (% di acqua rispetto al peso secco) delle pioppelle (secondo anno di vivaio) sottoposte a diversi trattamenti di idratazione e/o disidratazione in confronto con le piante testimoni al momento del taglio.

Generi fungini			Frequenze di isolamento (%)				
			Strati corticali				
			Nessun trattamento	10 gg. di idratazione	5 gg. aria e 5 gg. idratazione	5 gg. all'aria	10 gg. all'aria
Patogeni	Agenti di necrosi corticale	<i>Phomopsis</i> spp.	16,60±4,3	18,00±4,1	25,67±3,2	31,11±3,9	36,11±4,0
		<i>Cytospora chrysosperma</i>	7,33±3,8	8,62±4,6	15,56±3,1	17,78±3,4	22,22±4,9
		<i>Discosporium populeum</i>	5,40±2,1	5,00±2,7	7,89±3,2	7,67±2,8	9,33±3,3
		<i>Fusarium</i> spp.	1,67±0,9	2,44±1,1	3,60±1,3	5,56±2,2	3,89±1,6
		Totale	31	34,07	52,71	62,11	71,56
Non patogeni	Altri	<i>Alternaria alternata</i>	28,33±6,5	32,11±7,3	30,00±5,9	25,33±5,5	26,00±6,0
		<i>Cladosporium</i> spp.	6,70±2,4	4,44±1,8	5,44±2,1	0,00	0,00
		<i>Epicoccum nigrum</i>	13,00±3,2	14,89±3,8	5,30±2,1	2,22±1,7	0,00
Totale		19,70	19,33	10,74	2,22	0,00	
Altro		4,67±2,1	0,00	5,56±2,4	3,89±1,9	2,44±1,7	
Isolamenti nulli		16,67±4,8	15,80±4,3	2,22±1,1	8,89±3,2	2,22±0,9	
Totale		100,37	101,31	101,23	102,44	102,22	

Tabella 10. Casale M.to, primavera 2007. Frequenze di isolamento (%) negli strati corticali di piante del clone I-214 al secondo anno di vivaio, sottoposte o meno a trattamenti di disidratazione e/o di reidratazione. Rilievi effettuati 20 giorni dopo il trapianto.

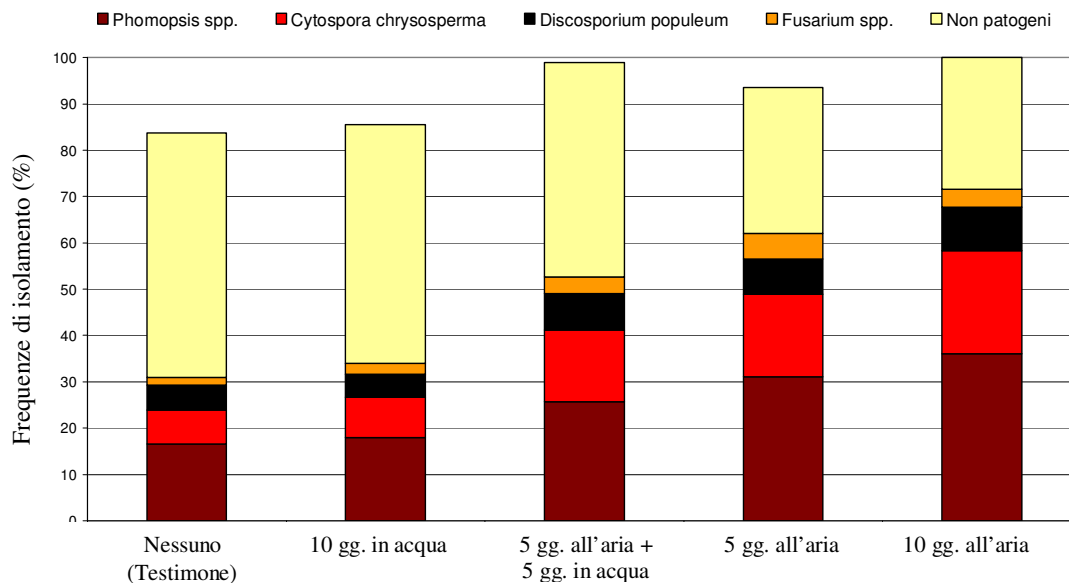


Figura 18. Casale M.to, primavera 2007. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) negli strati corticali di piante del clone I-214 al secondo anno di vivaio, sottoposte o meno a trattamenti di disidratazione e/o di reidratazione. Rilievi effettuati 20 giorni dopo il trapianto.

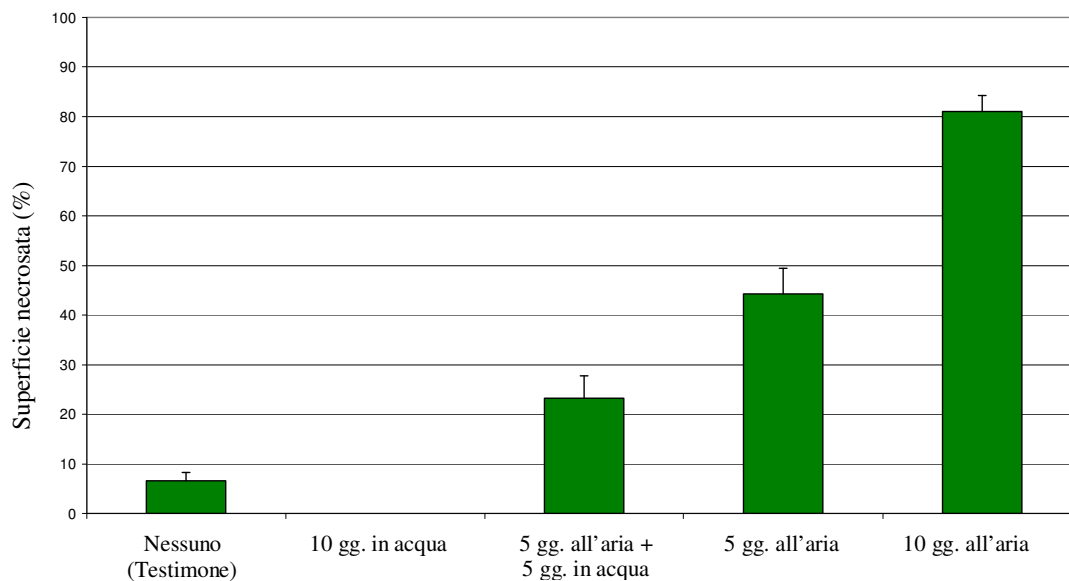


Figura 19. Casale M.to, giugno 2007. Istogrammi della superficie (%) necrosata per pianta, ad opera di attacchi di patogeni corticali, nelle pioppelle del clone I-214 al secondo anno di vivaio, sottoposte ai diversi trattamenti di disidratazione e/o reidratazione. Rilievi effettuati 45 giorni dopo il trapianto.

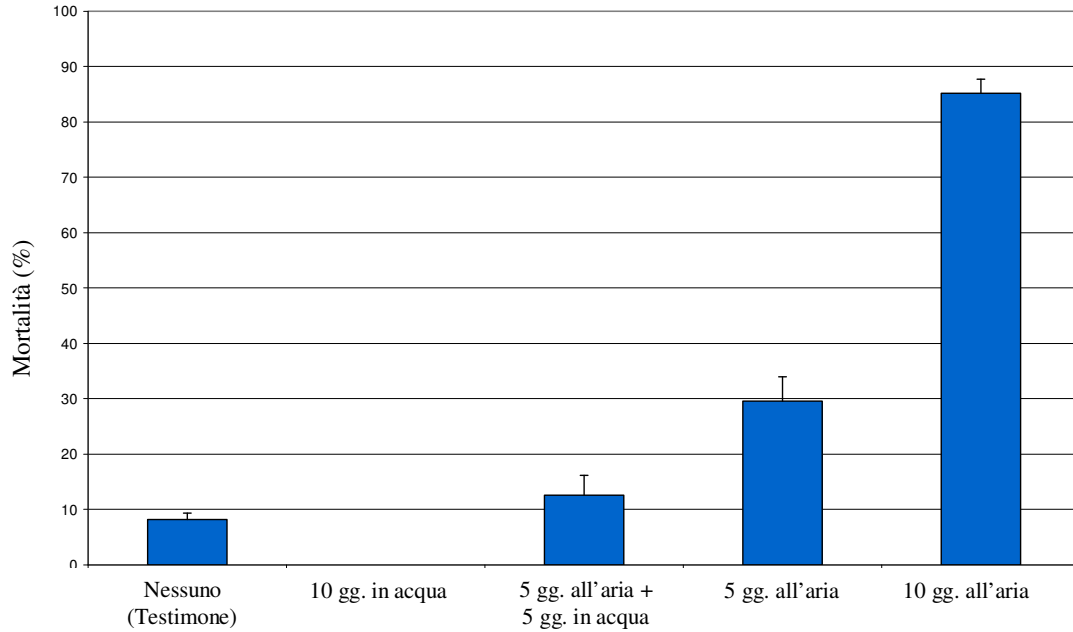


Figura 20. Casale M.to, giugno 2007. Istogrammi dell'incidenza (%) della mortalità delle pioppelle del clone I-214 al secondo anno di vivaio, sottoposte ai diversi trattamenti di disidratazione e/o reidratazione. Rilievi effettuati 60 giorni dopo il trapianto.

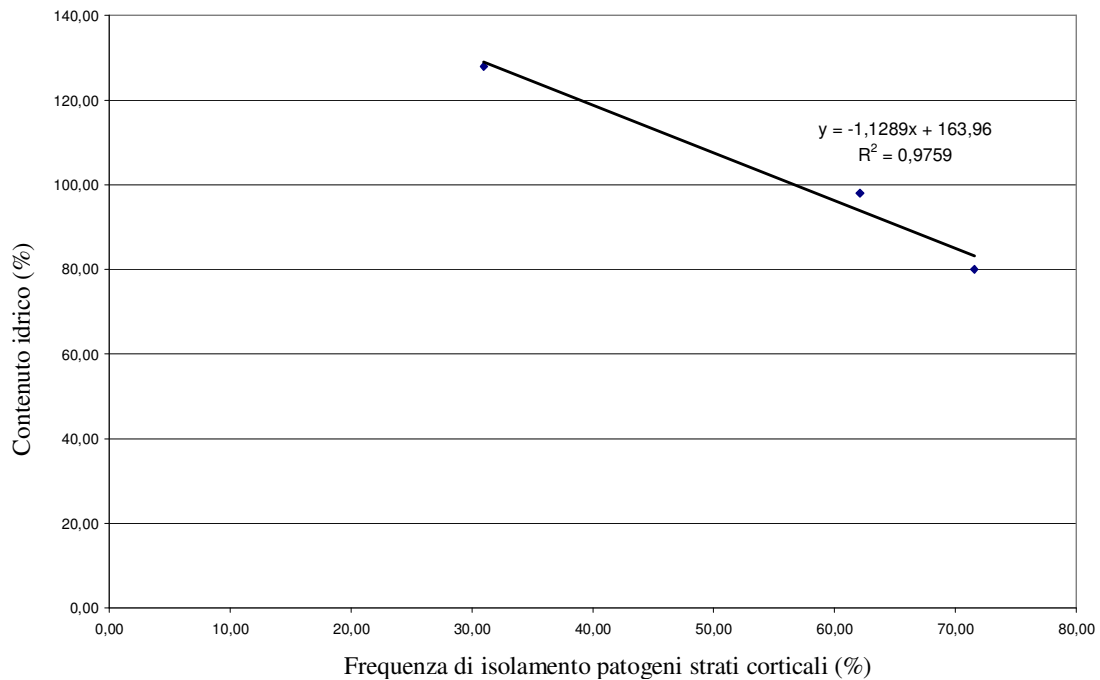


Figura 22. Casale M.to, 2007. Retta di regressione della frequenza di isolamento (%) degli endofiti patogeni negli strati corticali (20 giorni dopo il trapianto) sul contenuto idrico (%) rispetto al peso secco) delle pioppelle prima della messa a dimora.

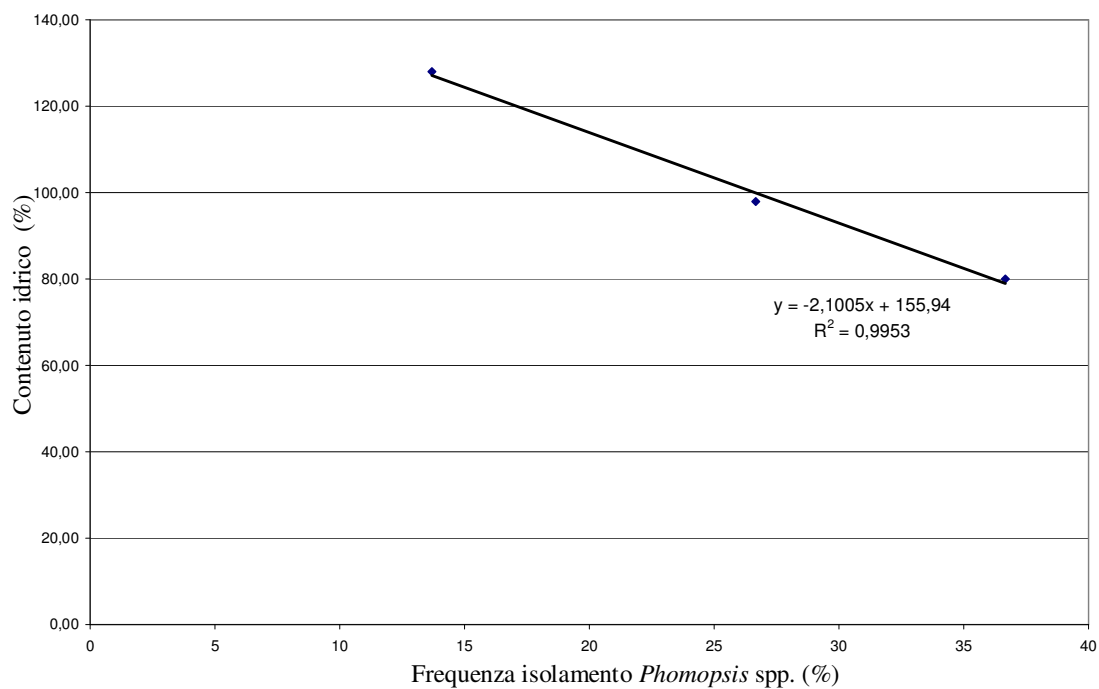


Figura 23. Casale M.to, 2007. Retta di regressione della frequenza di isolamento (%) di *Phomopsis* spp. (20 giorni dopo il trapianto) sul contenuto idrico (% rispetto al peso secco) prima della messa a dimora.

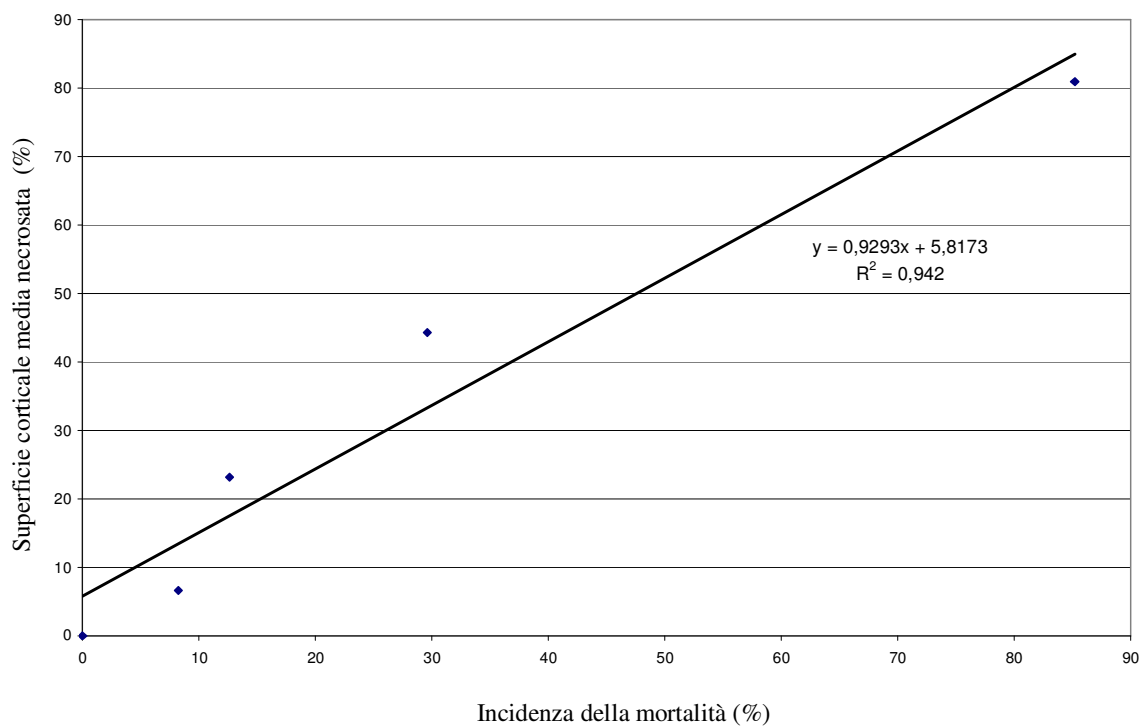


Figura 24. Casale M.to, 2007. Retta di regressione dell'incidenza (%) della mortalità (60 giorni dopo l'impianto) sulla superficie corticale media necrosata (%) 45 giorni dopo il trapianto.

4.2.9.2. Ricerche condotte nel 2008

Le indagini condotte nel 2008, quantunque penalizzate da inconvenienti tecnici che non hanno permesso di quantificare il contenuto idrico, né la superficie necrosata (per gli attacchi di patogeni) delle pioppelle hanno portato a risultati molto importanti, che sono andati a completare quelli ottenuti nel 2007, permettendo di delineare un quadro estremamente interessante.

Effetti della stazione di provenienza sulla isolabilità degli endofiti

Gli isolamenti condotti sulle pioppelle appena prima della messa a dimora e dopo tre settimane da questa, hanno evidenziato come gli isolati nulli decrescano con il trascorrere del tempo (tabelle 12 e 13) e siano comunque più numerosi nelle piante del vivaio di Viterbo rispetto ai vivai di Casale M.to.

Gli endofiti patogeni, inizialmente assenti sul clone L. Avanzo in quanto proveniente da Viterbo, (tabella 12), tre settimane dopo il trapianto sono stati riscontrati su entrambi i cloni ed in entrambi i siti (tabella 13, figura 26). Le principali specie fungine patogene corticali rilevate sono risultate *Phomopsis* spp. e *Cytospora chrysosperma* *Fusarium* spp. e *Discosporium populeum*.

Appena prima del trapianto (tabella 12), infatti, mentre sulle piante del clone L. Avanzo provenienti da Viterbo e pertanto prive di endofiti patogeni, si mantiene tale assenza, sia negli impianti di Viterbo sia di Casale M.to, su quelle del clone I-214, già ricche di endofiti patogeni in quanto provenienti da Casale M.to, è stata rilevata ancora una consistente presenza degli stessi in entrambi i siti.

A tre settimane dal trapianto, a conferma di quanto osservato nel 2007, l'isolabilità degli endofiti patogeni corticali su I-214, in entrambe le stazioni, è risultata aumentare (tabella 13). Detti patogeni tuttavia sono stati riscontrati, sia a Casale M.to che a Viterbo sia pure con valori modesti, anche su L. Avanzo, che provenendo da Viterbo doveva esserne invece esente.

Ciò dimostrerebbe che nelle tre settimane trascorse dall'impianto si siano verificate infezioni dall'esterno. Nella stazione di Viterbo, dove non risulta presente inoculo del luogo, le infezioni su L. Avanzo sono derivate probabilmente dalle fruttificazioni nel frattempo riscontrate sulle piante di I-214 messe a dimora.

In ogni caso i dati portano ad affermare che una parte, sia pur piccola, della presenza dei vari funghi sia da attribuire ad infezioni esterne; tale constatazione viene confermata anche dalla maggiore frequenza di isolamento riscontrata a Casale M.to rispetto a

Viterbo. Nel primo sito, infatti, la pressione di inoculo è molto più elevata mentre nel secondo le nuove infezioni potevano solo derivare dalle fruttificazioni sviluppatesi dalle pioppelle provenienti da Casale M.to

Effetti della disidratazione o imbibizione delle pioppelle sull'isolabilità degli endofiti

Come osservato con le indagini del 2007, l'isolabilità dei patogeni corticali endofiti dopo 20 giorni dall'impianto aumenta con lo stato di disidratazione delle pioppelle, in particolare quella di *Phomopsis* spp., endofita patogeno che come detto è risultato il più frequente.

Nell'impianto di Casale M.to, ad esempio, sulle pioppelle di I-214, cresciute nella stessa stazione, la frequenza di isolamento di *Phomopsis* spp. 3 settimane dopo l'impianto, attestata intorno al 22% sulle piante testimoni e su quelle messe a bagno per 7 giorni, sale al 35 e al 40% su piante esposte all'aria per 7 e 14 giorni rispettivamente (figura 28). Con una reidratazione delle pioppelle dopo l'esposizione all'aria, si assiste ad una sia pur modesta riduzione di tale isolabilità. Quanto sopra è messo in particolare evidenza dalla figura 30, in cui l'incidenza di *Phomopsis* spp. su I-214 è riportata in istogrammi come densità di isolamento. Qui si nota come nelle piante esposte all'aria quasi il 60% degli isolati appartengano a questo patogeno.

Nelle suddette indagini viene confermata la ridottissima incidenza di *Discosporium populeum*, indicato come specie sempre altamente presente negli anni passati.

I rilievi effettuati sul clone L. Avanzo, proveniente da Viterbo e pertanto privo di endofiti patogeni, confermano che gli endofiti riscontrati 20 giorni dopo l'impianto, in realtà con modesta incidenza, derivano da infezioni da inoculo esterno. Anche in questo caso, tuttavia, le più elevate frequenze di isolamento riguardano le piante disidratate. Ciò che però più appare evidente è il diverso costante comportamento del clone L. Avanzo rispetto all'I-214. Sul clone L. Avanzo, in cui (in quanto proveniente da Viterbo) le infezioni di patogeni corticali derivano da inoculo totalmente esterno, mentre la densità di isolamento di *Phomopsis* è nettamente inferiore a quella di I-214 (figure 29 e 30), quella relativa a *Cytospora chrysosperma* è pressoché analoga (figure 31 e 32). Questo dimostra una maggior recettività di tale clone alle infezioni di *Cytospora*.

I fenomeni di disidratazione delle pioppelle al trapianto oltre ad aumentare fortemente l'isolabilità nel tempo degli endofiti agenti di necrosi corticali sulle piante nel nuovo

impianto sembrerebbe incidere notevolmente sui relativi attacchi sintomatici, causa spesso della morte delle piante.

Generi fungini			Frequenze di isolamento (%)				
			L. Avanzo		I-214		
			Viterbo	Casale M.to	Viterbo	Casale M.to	
Patogeni	Agenti di necrosi corticale	<i>Phomopsis</i> spp.	0,00	0,00	17,30±2,3	18,40±3,0	
		<i>Cytospora chrysosperma</i>	0,00	0,00	8,90±1,6	13,20±2,1	
		<i>Discosporium populeum</i>	0,00	0,00	1,60±0,6	1,90±0,9	
		<i>Fusarium</i> spp.	0,00	0,00	2,00±0,5	3,10±1,3	
		Totale.	0,00	0,00	29,8	36,6	
	Altri	<i>Phoma</i> sp	0,00	0,00	2,70±1,2	2,90±0,4	
		<i>Alternaria alternata</i>	22,66±5,6	30,33±3,6	24,63±4,2	30,00±3,0	
	Non patogeni		<i>Cladosporium</i> spp.	8,30±2,5	6,20±2,9	3,53±0,9	5,40±2,1
			<i>Epicoccum nigrum</i>	3,83±1,3	5,40±2,4	0,00	4,53±2,3
			<i>Aureobasidium pullulans</i>	6,15±3,1	4,60±2,2	5,40±3,3	3,80±2,6
		Totale	18,28	16,20	8,93	13,73	
Altro			4,33±2,4	4,13±3,0	4,73±2,8	0,00	
Isolamenti nulli			56,00±5,6	50,00±4,3	32,00±4,0	22,50±4,3	
Totale			101,27	100,66	102,79	105,73	

Tabella 12. Aprile 2008. Frequenze di isolamento (%) in tessuti corticali di pioppelle di due anni dei cloni L. Avanzo (proveniente da Viterbo) e I-214 (proveniente da Casale M.to), sottoposte a 7 giorni di esposizione all'aria prima della messa a dimora. Rilievi effettuati prima dell'impianto, avvenuto contemporaneamente a Viterbo e Casale M.to.

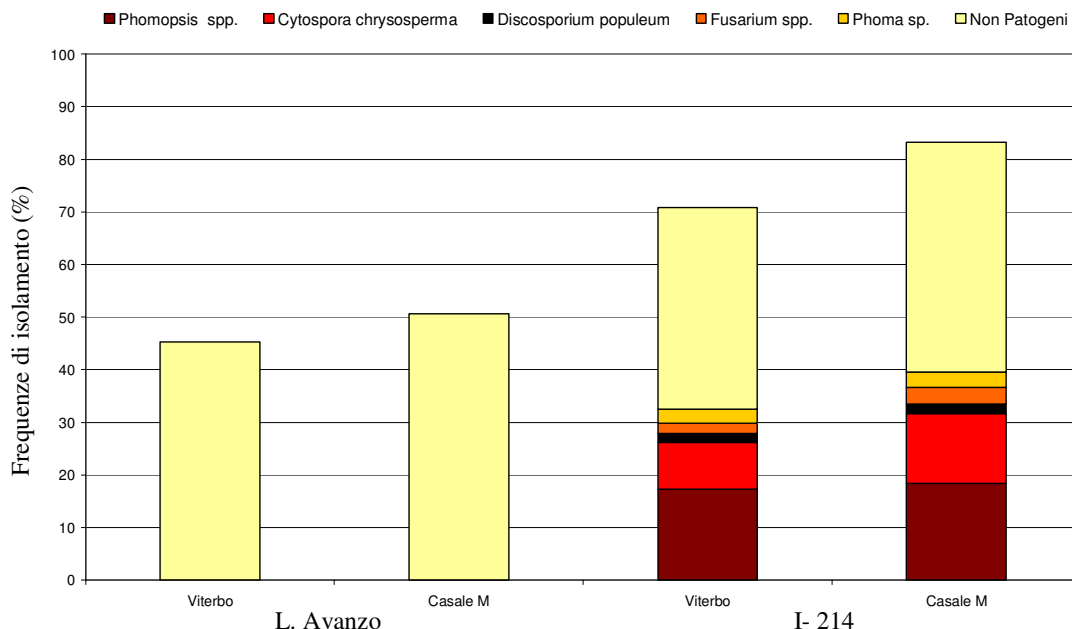


Figura 25. Aprile 2008. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) in tessuti corticali di pioppelle di due anni dei cloni L. Avanzo (proveniente da Viterbo) e I-214 (proveniente da Casale M.to), sottoposte a 7 giorni di esposizione all'aria prima della messa a dimora. Rilievi effettuati prima dell'impianto, avvenuto contemporaneamente a Viterbo e Casale M.to

Generi fungini			Frequenze di isolamento (%)			
			L. Avanzo		I- 214	
			Viterbo	Casale M.to	Viterbo	Casale M.to
Patogeni	Agenti di necrosi corticale	<i>Phomopsis</i> spp.	2,33±2,1	3,33±0,8	22,80±4,4	25,33±3,1
		<i>Cytospora chrysosperma</i>	5,33±2,1	6,40±1,4	12,33±2,0	16,66±2,3
		<i>Discosporium populeum</i>	0,00	0,00	0,60	0,80
		<i>Fusarium</i> spp.	0,00	3,33±0,8	2,00±1,3	3,33±1,2
		Totale	7,66	13,06	37,73	46,12
	Altri	<i>Phoma</i> sp.	0,00	3,33±2,0	3,30±2,3	3,33±1,9
		<i>Alternaria alternata</i>	22,66±3,6	32,33±4,0	26,33±5,0	30,00±4,6
Non patogeni	<i>Cladosporium</i> spp.	5,30±2,1	3,30±2,3	4,33±1,9	6,67±2,1	
	<i>Epicoccum nigrum</i>	4,33±1,8	6,40±2,0	0,00	3,33±0,9	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	8,15±3,2	3,33±1,9	8,00±2,4	4,50±2,0	
	Totale	17,78	13,03	12,33	14,50	
Altro		4,9±1,7	3,33±1,3	3,33±0,7	0,00	
Isolamenti nulli		47,43±3,4	40,00±4,0	18,30±2,6	10,00±2,0	
Totale		100,43	105,10	101,32	103,96	

Tabella 13. Aprile 2008. Frequenze di isolamento (%) in tessuti corticali di pioppelle di due anni dei cloni L. Avanzo (proveniente da Viterbo) e I-214 (proveniente da Casale M.to), sottoposte a 7 giorni di esposizione all'aria prima della messa a dimora. Rilievi effettuati 3 settimane dopo l'impianto, avvenuto contemporaneamente a Viterbo e Casale M.to.

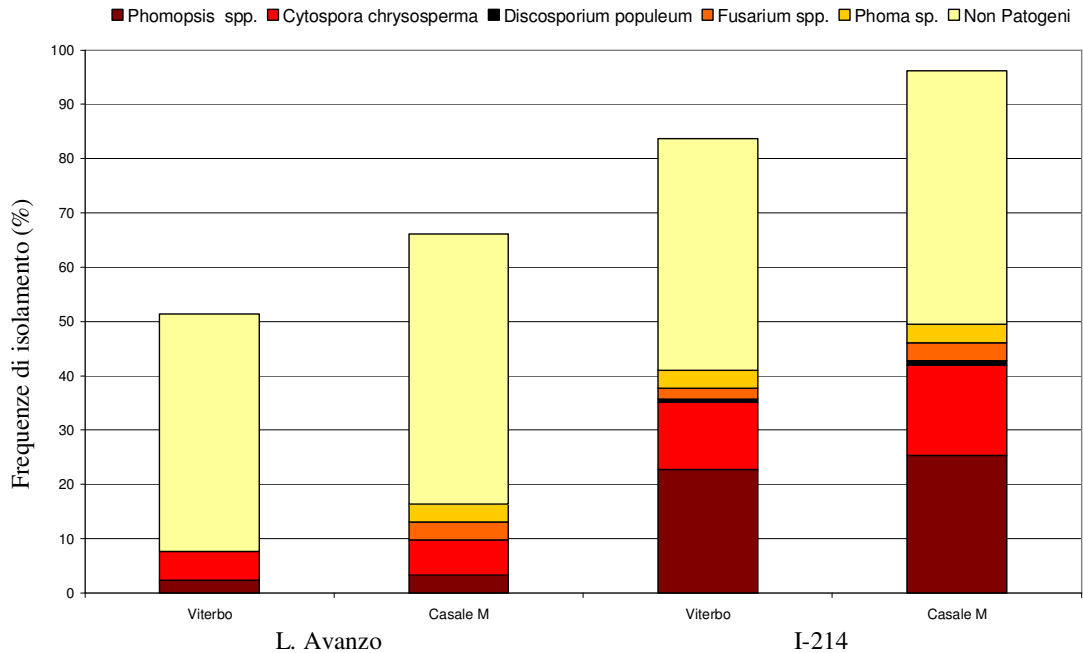


Figura 26. Aprile 2008. Frequenze di isolamento (%) in tessuti corticali di pioppelle di due anni dei cloni L. Avanzo (proveniente da Viterbo) e I-214 (proveniente da Casale M.to), sottoposte a 7 giorni di esposizione all'aria prima della messa a dimora. Rilievi effettuati 3 settimane dopo l'impianto, avvenuto contemporaneamente a Viterbo e Casale M.to.

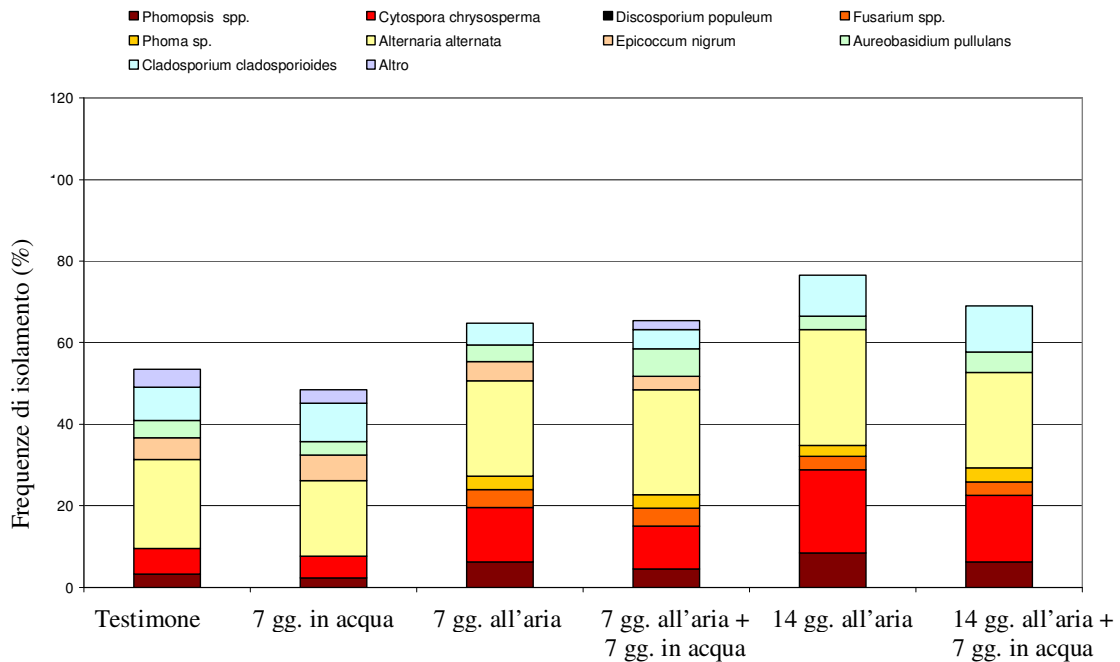


Figura 27. Casale M.to, maggio 2008. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) di pioppelle di 2 anni del clone L. Avanzo trapiantate con o senza trattamenti di disidratazione e/o reidratazione. Rilievi condotti 20 giorni dopo l'impianto.

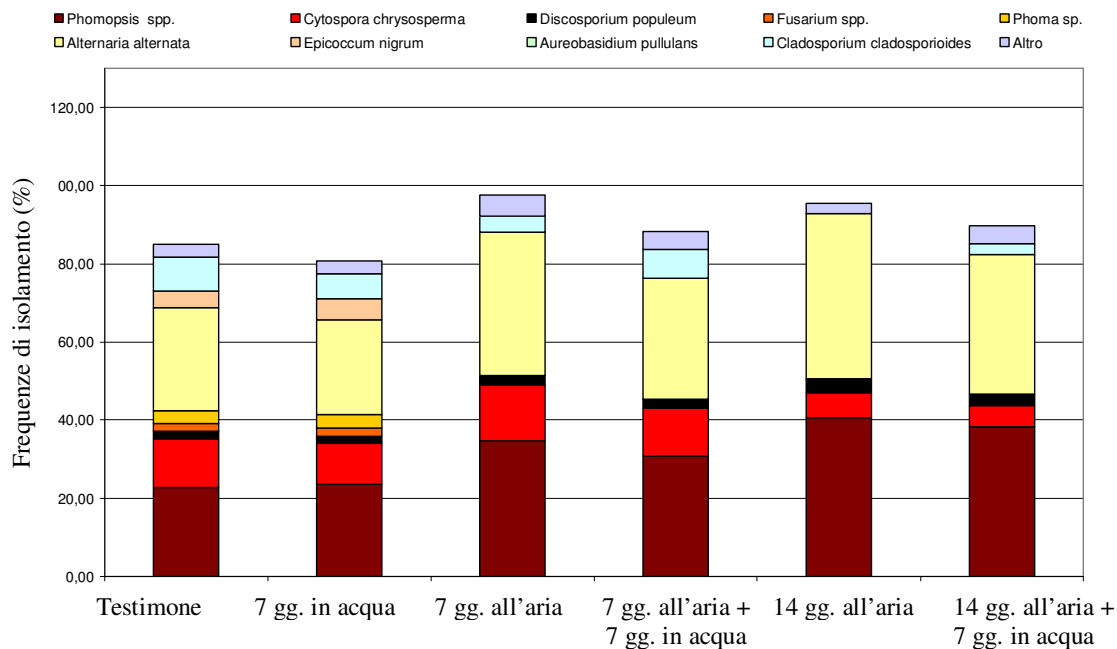


Figura 28. Casale M.to, maggio 2008. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) di pioppelle di 2 anni del clone I-214 trapiantate con o senza trattamenti di disidratazione e/o reidratazione. Rilievi condotti 20 giorni dopo l'impianto.

Effetti della disidratazione o della imbibizione delle pioppelle sullo sviluppo di necrosi corticali e sulla mortalità delle piante

Il rilievo degli attacchi sintomatici di necrosi corticali sulle pioppelle messe a dimora, quantunque condotto con puntualità prevalentemente nelle parcelle costituite con astoni sottoposti ad una settimana di esposizione all'aria, hanno comunque fornito interessanti indicazioni.

L'insieme delle osservazioni ha confermato come, a prescindere dai trattamenti, le necrosi corticali siano da imputare a *Cytospora* e, soprattutto, a *Phomopsis*, mentre *Discosporium* è stato riscontrato assai sporadicamente. I primi attacchi sintomatici dopo il trapianto (apparsi già dopo 7-10 giorni), sia a Casale M.to che a Viterbo, hanno interessato il clone I-214 che, provenendo da Casale M.to, già presentava i patogeni corticali allo stato endofitico ma non il L. Avanzo (proveniente da Viterbo) esente da endofiti patogeni corticali.

A partire da 25-30 giorni dopo l'impianto le necrosi, soprattutto nelle piante che avevano subito disidratazione, oltre a crescere rapidamente sul clone I-214, hanno cominciato a manifestarsi anche sul L. Avanzo, sia a Casale M.to sia a Viterbo.

Come già indicato per gli isolamenti, appare evidente che le necrosi su questo ultimo clone siano da imputare ad infezioni esterne. A Viterbo, dove non risultava presente

inoculo, dette infezioni derivavano inevitabilmente dalle fruttificazioni nel frattempo formatesi sul clone I-214. Questo fenomeno appare particolarmente evidente nella tabella 14, dove è riportata l'incidenza di necrosi corticali di *Phomopsis* e di *Cytospora* su pioppelle dei cloni I-214 (proveniente da Casale M.to) e L. Avanzo (proveniente da Viterbo) messe a dimora a Viterbo e Casale M.to dopo averle esposte all'aria per 7 giorni.

Si può notare come, mentre sulle piante di I-214 le necrosi corticali, soprattutto da *Phomopsis*, già presenti 10 giorni dopo l'impianto, siano andate aumentando, sul clone L. Avanzo, esente da infezioni endofitiche, le necrosi sono state riscontrate solo nel controllo effettuato 30 giorni dopo l'impianto, principalmente determinate da *Cytospora chrysosperma* e più intensamente a Casale M.to.

Per tali piante la crisi di trapianto è stata quasi totale sull'I-214 (leggermente inferiore a Viterbo), mentre su L. Avanzo (peraltro più soggetto a mortalità dell'I-214) ha interessato il 50% delle piante a Casale M.to e il 32% a Viterbo. Ciò dimostra l'influenza della carica di endofiti patogeni corticali sulla mortalità delle piante in caso di disidratazione delle stesse.

Anche con le indagini del 2008 è stato riscontrato come le crisi di trapianto, sia nel clone I-214 sia nel L. Avanzo, siano notevolmente influenzate da fattori che modificano il contenuto idrico delle piante. Nell'impianto di Casale M.to (figure 33 e 34), in entrambi i cloni caratterizzati da un 10-15% di mortalità nelle parcelle testimoni (non trattate) detta mortalità si annulla nelle piante immerse in acqua per 7 giorni.

Per contro, un'esposizione delle pioppelle all'aria per 7 e 14 giorni ha portato a mortalità quasi totale le piante di I-214 (inevitabilmente ricche di infezioni), e ben il 50 e il 75% delle piante di L. Avanzo, caratterizzate da assenza di endofiti patogeni corticali.

Una immersione in acqua per 7 giorni delle pioppelle preventivamente esposte all'aria ha ridotto notevolmente l'incidenza della crisi di trapianto (figure 33 e 34).

Le indagini condotte nel 2008 hanno confermato i risultati del 2007, mettendo tuttavia ancor meglio in evidenza come le crisi di trapianto, quantunque possano derivare da necrosi corticali causate da infezioni esterne del momento, risultino correlabili (figure 35 e 36) con la precedente presenza endofitica dei relativi patogeni responsabili. In ogni caso, mentre una idratazione delle piante, tramite immersione in acqua, riduce l'incidenza della mortalità delle piante, una disidratazione delle stesse, quale quella che si verifica per una prolungata esposizione all'aria ne esalta notevolmente le crisi di

trapianto (figure 33 e 34), indubbiamente anche per la maggiore incidenza di necrosi corticali dovute almeno in parte al viraggio degli agenti di necrosi corticali dallo stato endofitico a quello patogenetico.

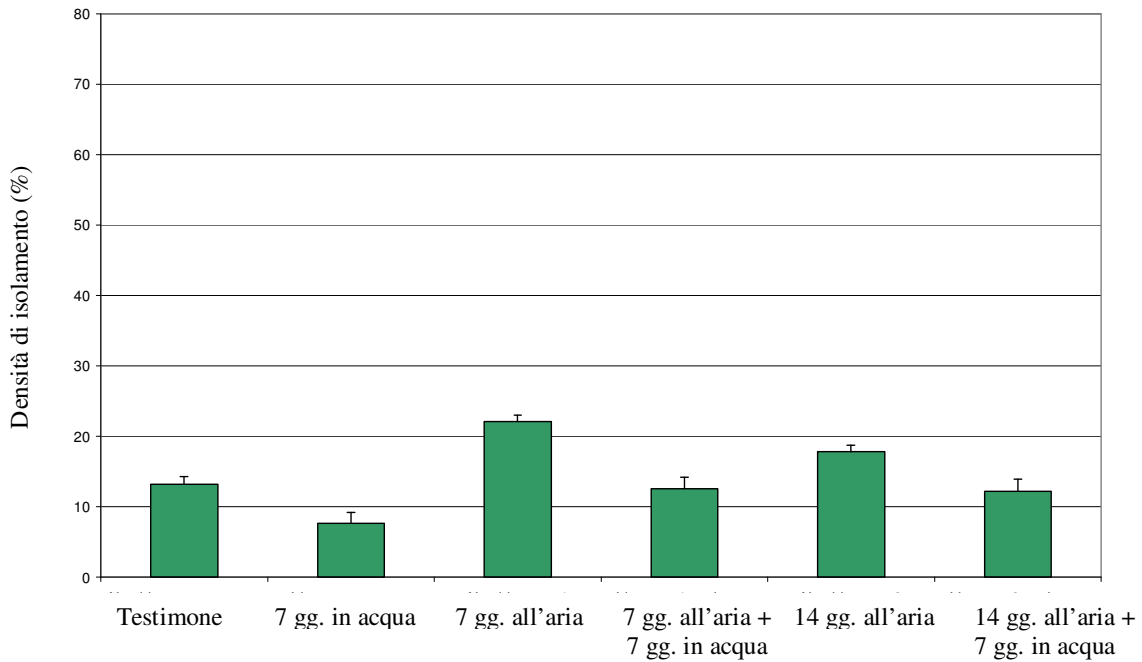


Figura 29. Istogrammi delle densità d'isolamento (%) di *Phomopsis* spp. su pioppelle di 2 anni di L. Avanzo provenienti da Viterbo, messe a dimora nell'aprile 2008 a Casale Monferrato. Rilievi effettuati 3 settimane dopo l'impianto.

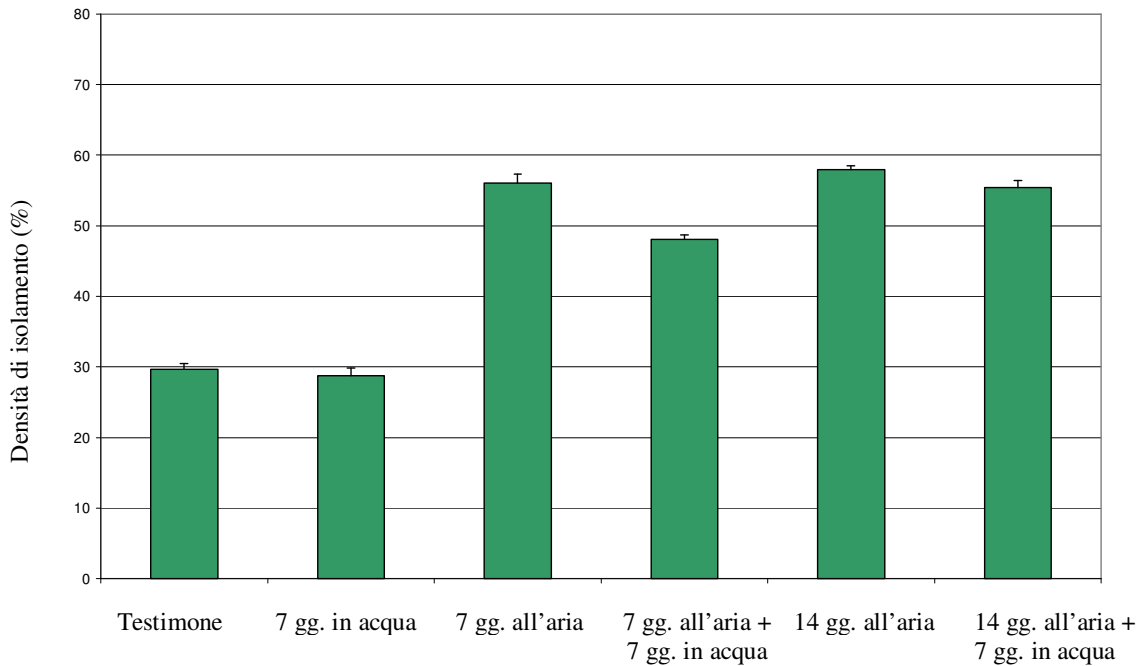


Figura 30. Istogrammi delle densità d'isolamento (%) di *Phomopsis* spp. su pioppelle di 2 anni di I-214 allevate a Casale M.to e ivi messe a dimora nell'aprile 2008. Rilievi effettuati 3 settimane dopo l'impianto.

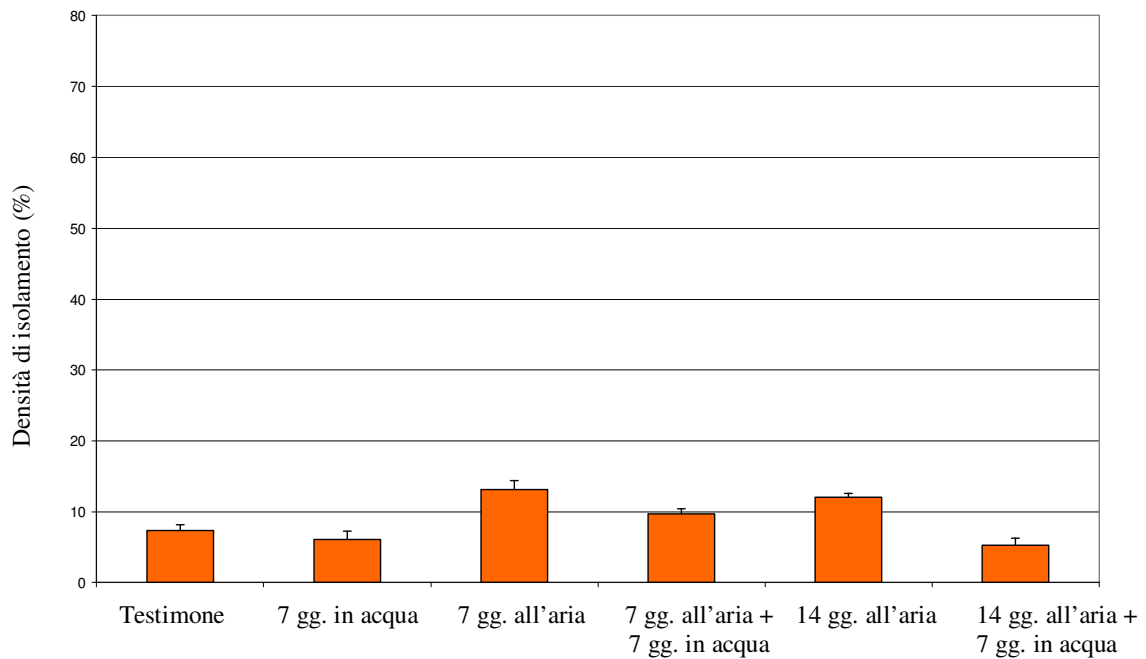
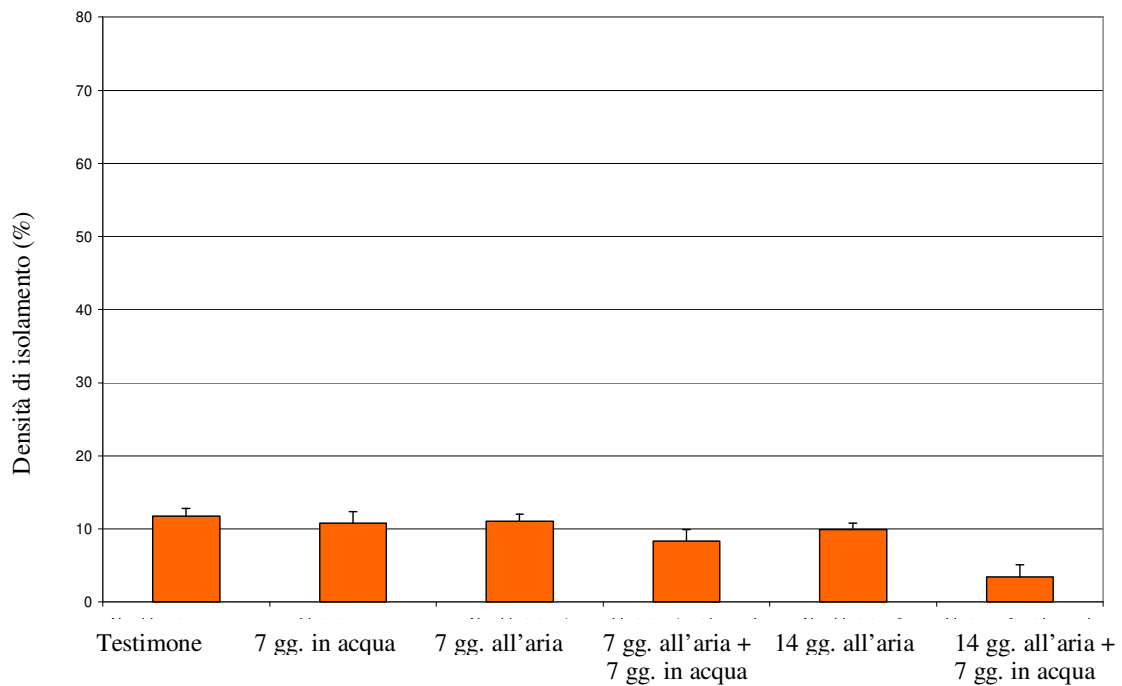


Figura 31. Istogrammi delle densità d'isolamento (%) di *Cytospora chrisosperma*. su pioppelle di 2 anni di L. Avanzo provenienti da Viterbo, messe a dimora nell'aprile 2008 a Casale M.to. Rilievi effettuati 3 settimane dopo l'impianto.



32. Istogrammi delle densità d'isolamento (%) di *Cytospora chrisosperma*. su pioppelle di 2 anni di I 214 allevate a Casale M.to e ivi messe a dimora nell'aprile 2008. Rilievi effettuati 3 settimane dopo l'impianto.

Clone e provenienza	Stazione di impianto	Incidenza media delle necrosi corticali								Mortalità (% piante morte)
		10 gg. dopo l'impianto		20 gg. dopo l'impianto		30 gg. dopo l'impianto		60 gg. dopo l'impianto		
		<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Cytospora chrysosperma</i>	<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Cytospora chrysosperma</i>	<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Cytospora chrysosperma</i>	<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Cytospora chrysosperma</i>	
L. Avanzo (Viterbo)	Viterbo	0	0	0	0	0	3	1	8	32
	Casale M.to	0	0	0	0	1	9	2	18	50
I-214 (Casale M.to)	Viterbo	10	3	20	3	20	3	25	3	88
	Casale M.to	15	3	25	4	30	4	30	4	96

Tabella 14. Incidenza media (n° di necrosi/pianta) nel tempo degli attacchi di *Phomopsis* spp. e *Cytospora chrysosperma* su pioppelle dei cloni I-214 (provenienza Casale M.to) e L. Avanzo (provenienza Viterbo) messe a dimora a Viterbo e Casale M.to dopo 7 giorni di esposizione all'aria.

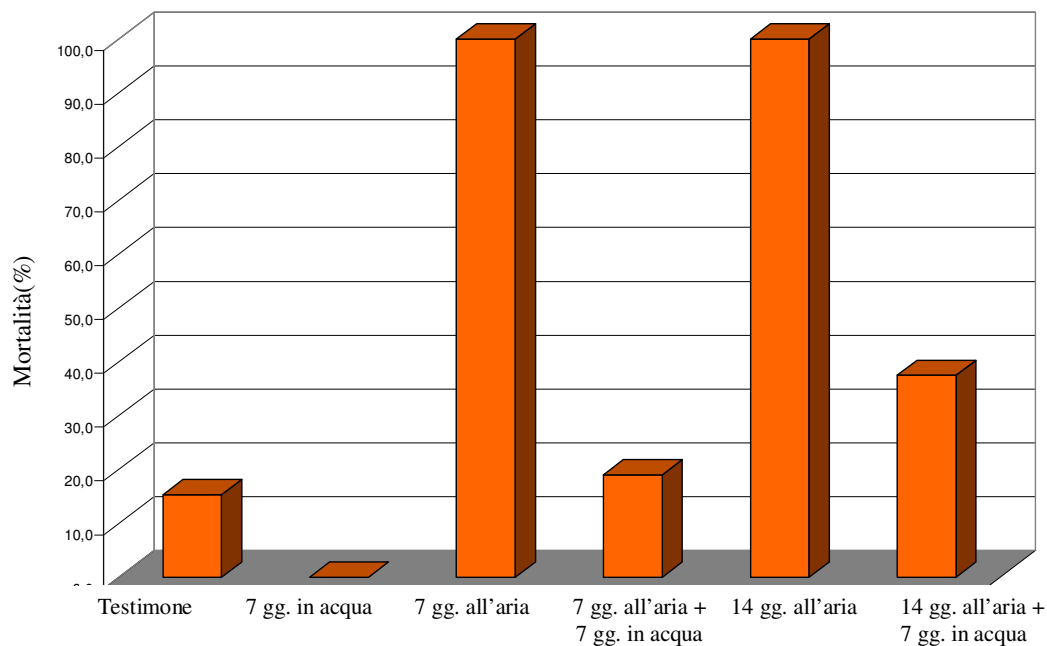


Figura 33. Casale M.to, luglio 2008. Istogrammi della percentuale di pioppelle di I-214 di due anni delle diverse tesi, morte per crisi da trapianto.

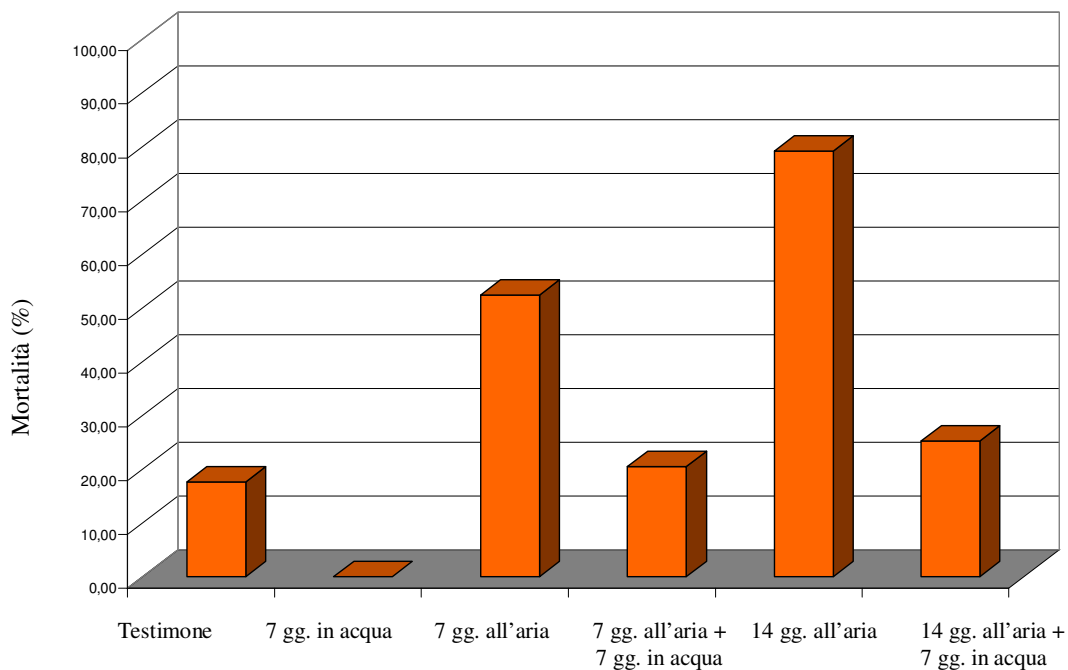


Figura 34. Casale M.to, luglio 2008. Istogrammi della percentuale di pioppelle di L: Avanzo di due anni delle diverse tesi, morte per crisi da trapianto.

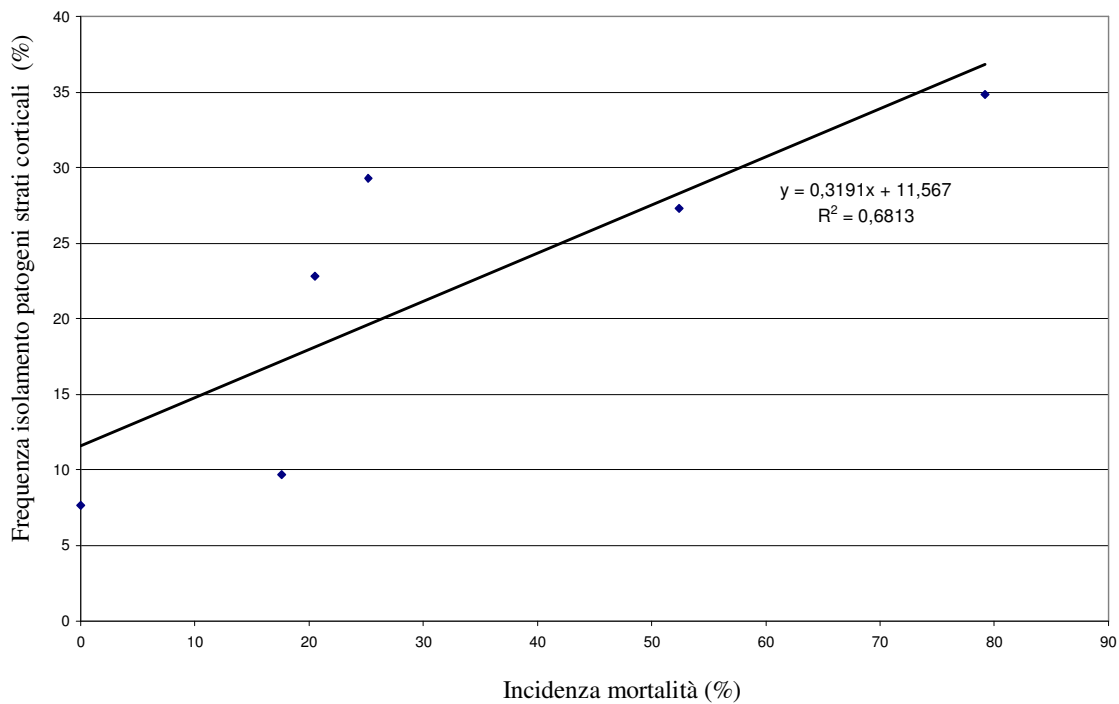


Figura 35. Casale M.to, 2008. Retta di regressione dell'incidenza (%) della mortalità (60 giorni dopo l'impianto) sulla frequenza di isolamento (%) degli endofiti patogeni negli strati corticali delle piante del clone L. Avanzo, 20 giorni dopo il trapianto.

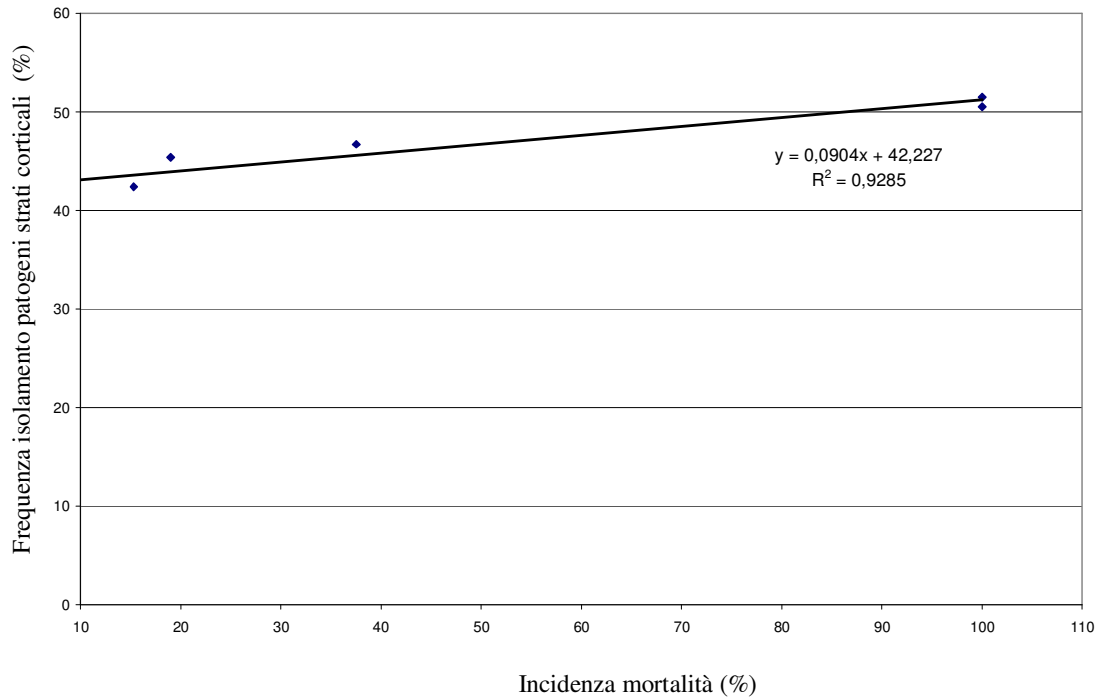


Figura 36. Casale M.to, 2008. Retta di regressione dell'incidenza (%) della mortalità (60 giorni dopo l'impianto) sulla frequenza di isolamento (%) degli endofiti patogeni negli strati corticali delle piante del clone I-214, 20 giorni dopo il trapianto.

4.3. RISULTATI RELATIVI AL LECCIO

4.3.1. PRESENZA DI ENDOFITI FUNGINI NELLE GHIANDE

Gli isolamenti condotti nella primavera del 2006 su ghiande di leccio, ed in particolare da porzioni di embrione, endosperma e tegumento, hanno dato modo di rilevare una completa assenza di endofiti fungini all'interno dei semi (figura 37); solo occasionalmente e con frequenze di isolamento sempre molto basse, sono stati riscontrati endofiti non patogeni negli strati del tegumento, la porzione più esterna del seme. I microrganismi osservati erano in particolare *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Alternaria alternata* e *Penicillium* spp.

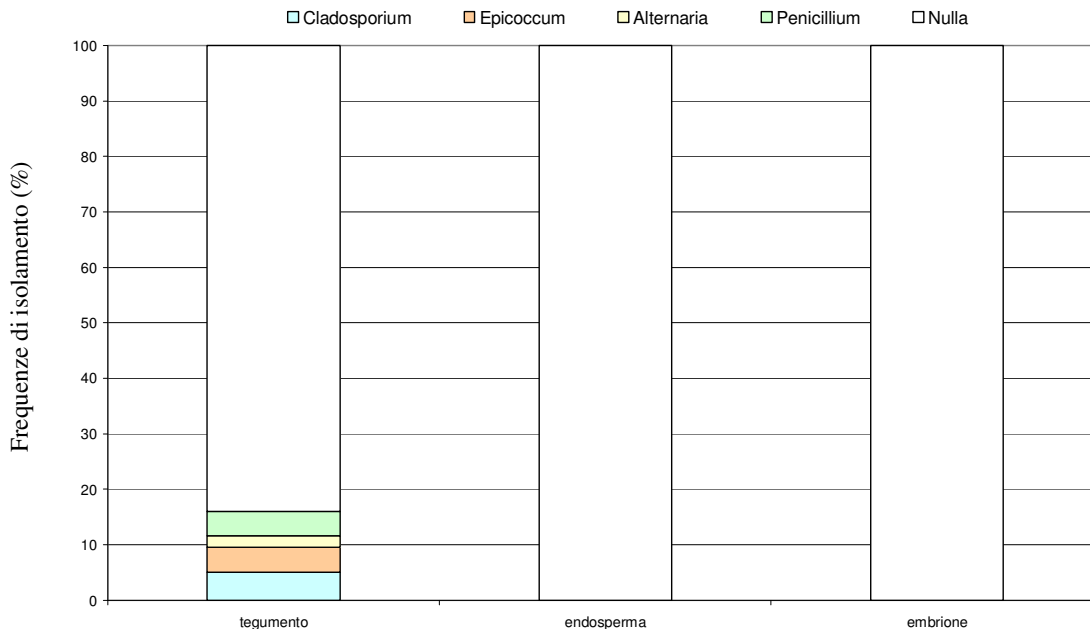


Figura 37. Viterbo, maggio 2006. Istogrammi delle frequenze d'isolamento degli endofiti fungini in ghiande di *Quercus ilex*.

4.3.2. TRASMISSIONE ORGANOTROPICA

I germogli e poi le piantine derivati dalle ghiande di leccio messe a dimora in ambiente protetto sono risultati a lungo esenti da endofiti fungini, patogeni e non. Ciò, in accordo con quanto riscontrato per il pioppo, confermerebbe pertanto che gli endofiti fungini presenti nelle ghiande non vengano trasmessi in alcun caso ai nuovi germogli (assenza di diffusione organotropica).

4.3.3. INSEDIAMENTO DEGLI ENDOFITI NEI SEMENZALI

Come già riscontrato per il pioppo, le piantine derivate dalle ghiande messe a dimora presso l'Azienda Sperimentale dell'Università della Tuscia, sono risultate esenti da endofiti patogeni per diversi mesi dopo la messa a dimora. Infatti, analogamente a quanto verificatosi nello stesso sito per il pioppo, solo a seguito delle piogge più intense a partire dal mese di settembre 2007, in esse fu riscontrata una presenza endofitica, sia patogena che non patogena (tabella 15 e figura 39). Le specie patogene riscontrate sono rappresentative di quelle già segnalate su leccio in bosco, sia pur meno numerose. In particolare, i patogeni corticali riscontrati sono stati *Biscogniauxia mediterranea* (figura

38 B), *Phomopsis quercina* (figura 38 C) e *Discula quercina* (figura 38 A), i primi due notoriamente agenti di cancro corticali, l'ultima sintomaticamente specifica di alterazioni di foglie e germogli.

A partire da tale periodo, si assiste ad un accumulo di endofiti nel tempo.

Endofiti	Generi fungini	Frequenze di isolamento (%)					
		2006				2007	
		maggio	giugno	agosto	settembre	gennaio	aprile
Patogeni	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	0	0	0	3,6±0,4	5,1±0,6	5,85±1,1
	<i>Discula quercina</i>	0	0	0	1,3±0,4	2,8±0,7	3,6±0,5
	<i>Phomopsis quercina</i>	0	0	0	3,2±0,3	4,4±1,2	5,1±0,8
	Totale	0	0	0	8,1	12,3	14,55
	<i>Alternaria</i> spp.	0	0	0	20,2±2,4	27,6±3,0	39,2±3,2
Non patogeni	<i>Epicoccum</i> sp.	0	0	0	3,6±0,7	6,2±0,9	9,9±0,5
	<i>Cladosporium</i> sp.	0	0	0	2,1±0,6	2,9±0,4	4,7±1,0
	Totale	0	0	0	5,7	9,1	14,6
Altro		0	0	0	1,3±0,4	2,7±0,7	4,3±1,1
Isolamenti nulli		100	100	100	64,7±4,2	48,3±3,6	27,35±3,4
Totale		100	100	100	100	100	100

Tabella 14. Viterbo, 2006 – 2007. Frequenze di isolamento (%) degli endofiti fungini nelle piantine di leccio derivate dalle gemme messe a dimora nell'aprile 2006. Rilievi effettuati da maggio 2006 ad aprile 2007.

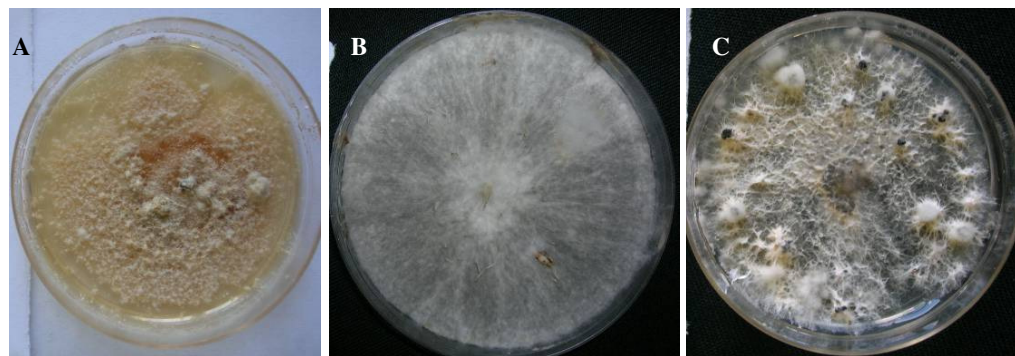


Figura 38. Colonie di specie fungine patogene isolate in purezza su PDA da piantine asintomatiche di leccio in vivaio: *Discula quercina* (A); *Biscogniauxia mediterranea* (B); *Phomopsis quercina* (C).

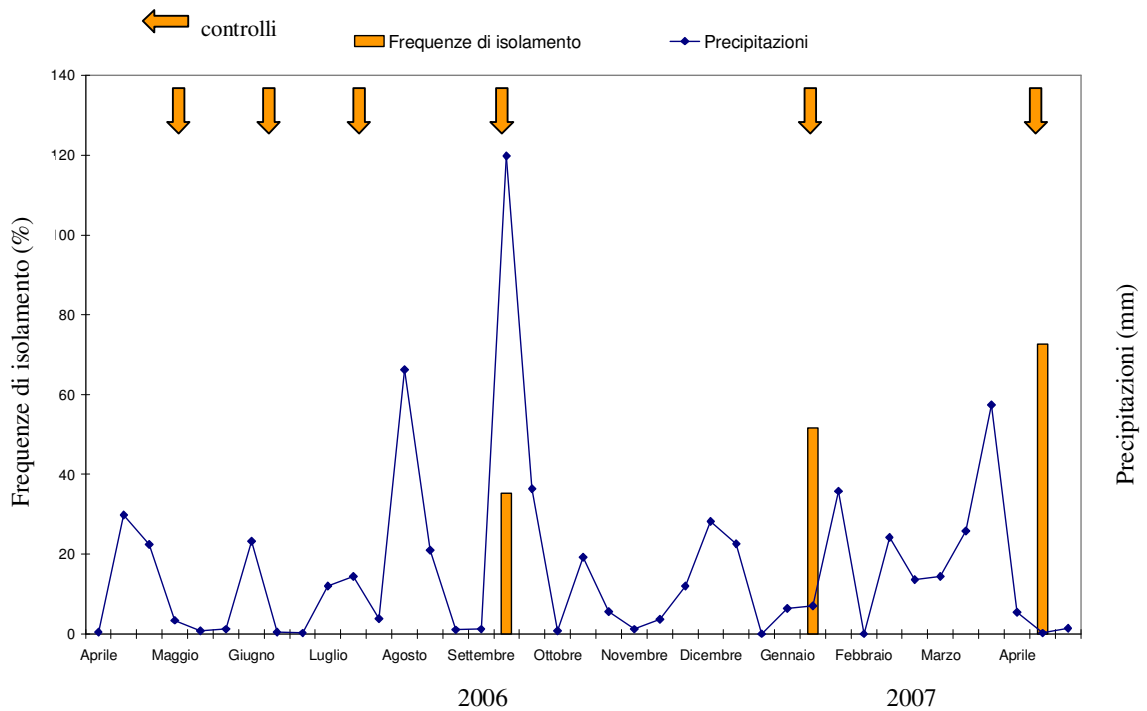


Figura 39. Viterbo, 2006-2007. Istogrammi delle frequenze di isolamento positive (%) di endofiti fungini sui semenzali di leccio dall'aprile 2006 (nascita) all'aprile 2007 presso l'Azienda di Viterbo.

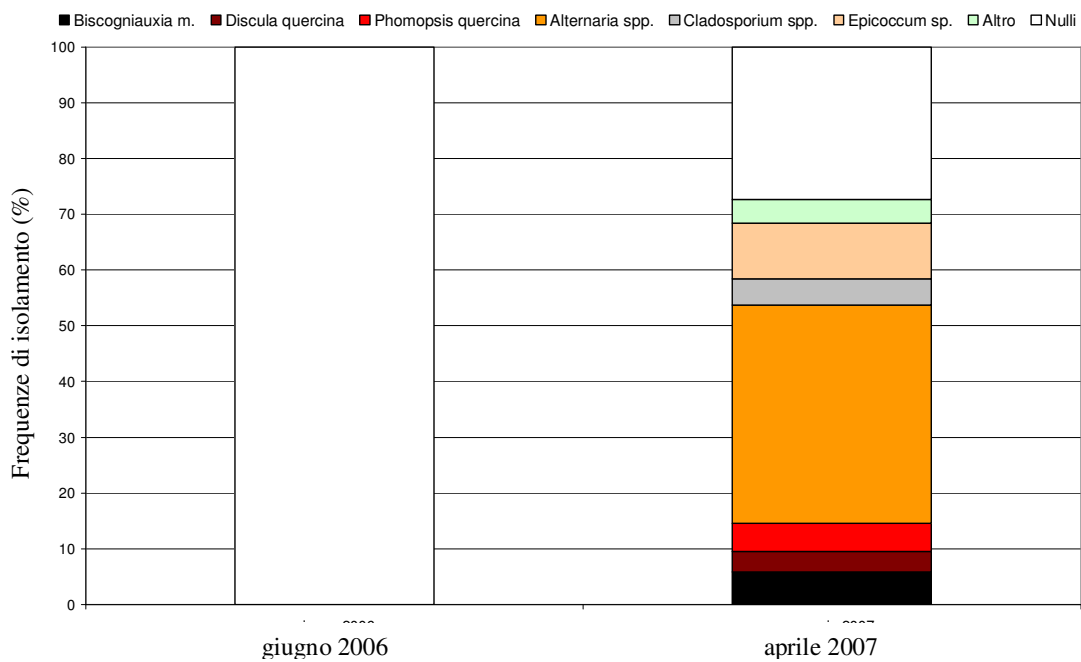


Figura 40. Viterbo, giugno 2006 e aprile 2007. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) sui semenzali di leccio nel giugno 2006 e nell'aprile 2007 presso l'Azienda di Viterbo.

4.3.4. DISTRIBUZIONE DEGLI ENDOFITI NEI VARI ORGANI DELLA PIANTA

Contrariamente a quanto riscontrato su pioppo, nelle piantine di leccio di tre anni messe a dimora presso l'Azienda Sperimentale dell'Università della Tuscia, non sono state rilevate differenze significative nelle associazioni endofitiche presenti nei rametti e nei germogli; solo le frequenze di isolamento di taluni patogeni risultano leggermente più elevate nei rami rispetto ai tessuti erbacei. Le principali specie patogene rilevate nelle piantine sono *Biscogniauxia mediterranea*, *Discula quercina* e *Phomopsis quercina*, tutte con frequenze di isolamento piuttosto basse; *B. mediterranea* e soprattutto *D. quercina* aumentano la loro incidenza passando dai germogli ai rametti, con valori che vanno da 5 a 6 % e da 4 a 8,5% rispettivamente. Tale differenza probabilmente è da attribuire all'accumulo di endofiti nel tempo già riscontrata nel paragrafo 4.3.2 e precedentemente per il pioppo.

Endofiti	Generi fungini	Frequenze di isolamento (%)	
		Germogli	Rametti
Patogeni	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	5±2,1	6±2,4
	<i>Discula quercina</i>	4±1,7	8,5±2,7
	<i>Phomopsis quercina</i>	5,5±1,5	4,5±1,7
	Totale	14,5	19
	<i>Alternaria</i> spp.	49±5,8	66,5±7,2
	<i>Verticillium</i> spp.	0	2,5±0,8
Non patogeni	<i>Epicoccum</i> sp.	10±2,3	10,5±2,5
	<i>Cladosporium</i> sp.	3,5±1,2	3,5±0,9
	<i>Sordaria</i> sp.	1,5±0,6	3±0,9
Totale non patogeni		15	17
Altro		14±5,4	5±3,3
Isolamenti nulli		14±5,1	15±4,9
Totale		106,5	125

Tabella 16. Viterbo, giugno 2007. Frequenze d'isolamento (%) di endofiti fungini in gemme e rametti di piantine di leccio di 3 anni.

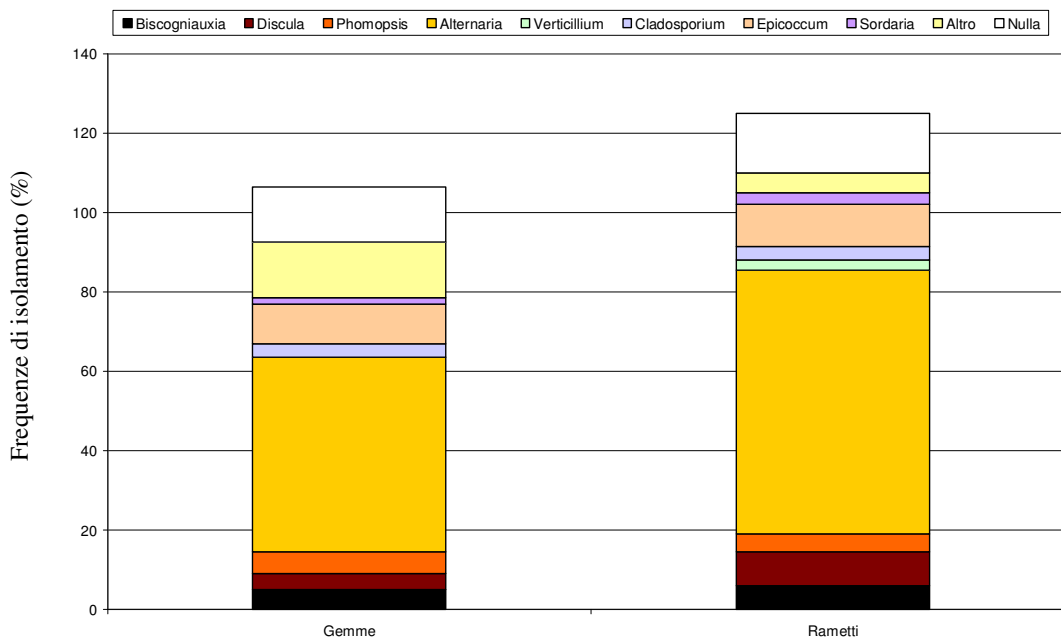


Figura 41. Viterbo, giugno 2007. Istogrammi delle frequenze d'isolamento (%) di endofiti fungini nelle gemme e rametti di piantine di leccio di 3 anni.

4.3.4. EFFETTI DELL'IRRIGAZIONE E/O DELLA CONCIMAZIONE SULL'INCIDENZA DEGLI ENDOFITI PATOGENI NELLE PIANTE IN VIVAIO

I trattamenti di concimazione e di irrigazione, così come effettuati, non hanno avuto significativa influenza né sullo sviluppo delle piante, né sull'incidenza degli endofiti. Sembra tuttavia, seppur senza conforto statistico, che l'incidenza degli endofiti patogeni corticali nel loro complesso (*Biscogniauxia mediterranea*, *Phomopsis quercina*(Sacc.) Höhn., *Discula quercina* (West) von Arx) sia maggiore nelle piante testimoni, senza trattamenti, rispetto a quelle irrigate e/o concimate (figura 42 e tabella 17). Sembra invece che una concimazione bilanciata riduca l'incidenza dei patogeni corticali, anche se in questo comportamento, un peso determinante è dato da *Discula quercina* che, come si ripete, produce necrosi quasi esclusivamente su foglie e germogli.

La presenza complessiva degli endofiti, sia patogeni che non, è rimasta sempre rilevante, con valori che in qualche misura ricordano le incidenze in bosco.

Endofiti	Generi fungini	Frequenze di isolamento (%)			
		Nessun Trattamento	Irrigato e Concimato	Irrigato	Concimato
Patogeni	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	4±1,6	3,4±1,2	3,3±2,3	4±2,6
	<i>Discula quercina</i>	14±3,4	11±2,6	8±3,3	5±1,9
	<i>Phomopsis quercina</i>	7±2,1	6±2,2	5±1,7	4±1,5
	Totale	25	20,04	16,3	13
	<i>Alternaria spp.</i>	41±4,5	48,2±4,9	33,1±3,8	46±5,2
	<i>Verticillium spp.</i>	3±1,6	1,5±0,9	1,5±0,6	2±0,9
Non patogeni	<i>Epicoccum sp.</i>	3±1,1	1±0,6	10±2,3	7±1,8
	<i>Cladosporium sp.</i>	9±2,2	13±2,3	13±2,6	12±1,9
	<i>Sordaria sp.</i>	2±0,8	1,5±0,6	1,5±0,9	2±1,2
	Totale	14	15,5	24,5	21
Altro		5±1,6	7,4±2,1	6,6±1,8	4±1,3
Isolamenti nulli		12±2,2	7±1,5	18±2,4	14±2,6
Totale		100	100	100	100

Tabella 17. Viterbo, settembre 2007. Frequenze di isolamento (%) degli endofiti fungini in piantine di leccio di 3 anni, sottoposte o meno ad irrigazione e/o concimazione.

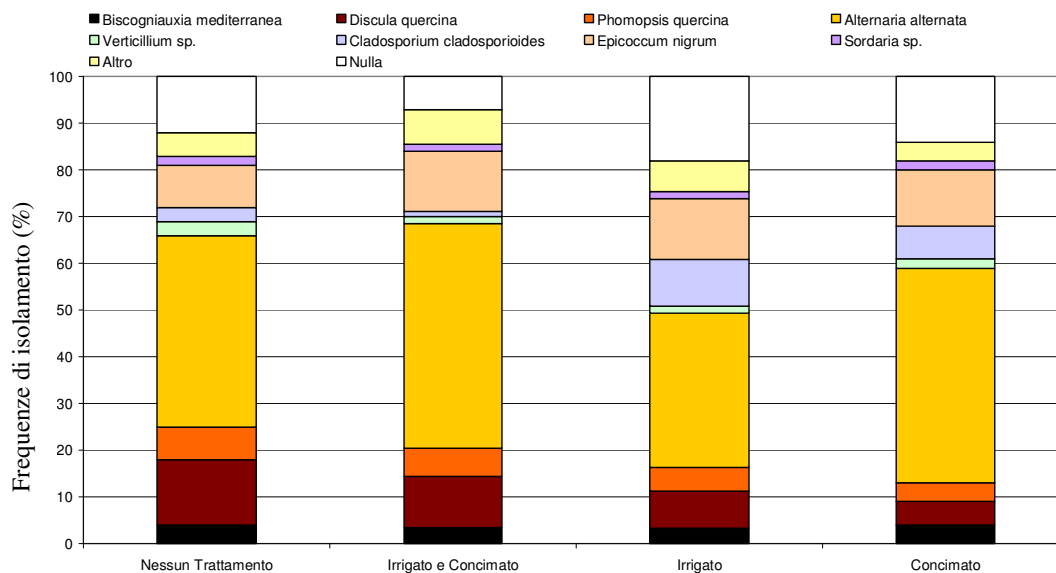


Figura 42. Viterbo, settembre 2007. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) degli endofiti fungini in piantine di leccio di 3 anni, sottoposte o meno ad irrigazione e/o concimazione.

4.3.5. INFLUENZA DELLO STATO DI IDRATAZIONE E/O DISIDRATAZIONE DELLE PIANTINE AL TRAPIANTO SULL'ISOLABILITÀ DEGLI ENDOFITI E SULLA CRISI DI TRAPIANTO

Queste indagini hanno preso in considerazione piantine di quattro anni di leccio (coetanee di quelle di cui al punto 4.3.4.) messe a dimora presso l'Azienda Sperimentale dell'Università della Tuscia e sottoposte a trapianto dopo essere state sottoposte o meno a trattamenti di disidratazione e/o idratazione.

Effetti della disidratazione o idratazione delle piantine sull'isolabilità degli endofiti

In primo luogo, dal confronto tra le frequenze di isolamento delle piantine rilevate prima del trapianto e quelle relative a tutte le altre tesi, emerge che la pratica del trapianto e lo stress che esso determina inducono un incremento dell'incidenza degli endofiti patogeni ed una flessione di quella dei non patogeni.

La disidratazione delle piantine prima della messa a dimora, in accordo con quanto osservato per il pioppo, induce un forte aumento delle frequenze di isolamento degli endofiti patogeni; *B. mediterranea* passa infatti dal 15,3 del testimone a 25,4 % dopo 4 giorni di esposizione all'aria, *P. quercina* da 12 a 17% e *D. quercina* da 16 a 20%. Al contrario, l'idratazione prima dell'impianto o una reidratazione dopo l'esposizione all'aria riducono questo incremento (tabella 18 e figura 43).

Generi fungini		Frequenze di isolamento (%)				
		Prima del trapianto	20 giorni dopo i trattamenti			
			Nessuno (testimone)	2 gg. idratazione	4gg. all'aria	4gg. all'aria + 2 gg. idratazione
Patogeni	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	9,7±2,4	15,3±4,1	13,7±3,5	25,4±4,4	23±3,9
	<i>Discula quercina</i>	8±2,2	16±3,6	14±2,8	20,3±3,5	17,7±3,9
	<i>Phomopsis quercina</i>	9±1,9	12±2,3	11±1,8	17±2,4	16,5±3,3
	Totale	26,7	75,3	38,7	62,7	57,2
	<i>Alternaria</i> spp.	40,75±5,3	35±4,8	32,4±3,8	24,5±2,4	27,6±2,8
	<i>Verticillium</i> spp.	3±0,8	3±1,1	3,6±1,2	0	0
Non patogeni	<i>Epicoccum</i> sp.	3,3±0,8	4±0,5	4,5±1,1	2,9±0,6	4,2±1,3
	<i>Cladosporium</i> sp.	10,75±2,3	1,5±0,6	5,3±1,4	0	0
	<i>Sordaria</i> sp.	4±1,3	4,5±0,7	5,4±1,6	2,5±0,9	1,8±0,5
	Totale	18,05	10	15,2	5,4	6
Altro		3,5±1,1	2,7±0,4	3,1±1,5	2,4±1,7	3,2±1,5
Isolamenti nulli		8±2,0	6±1,6	7±2,1	5±0,9	6±1,3
Totale		100	100	100	100	100

Tabella 18. Viterbo, giugno 2008. Frequenze di isolamento (%) degli endofiti fungini in piante di leccio di tre anni trapiantate previa diversi trattamenti di idratazione e/o disidratazione.

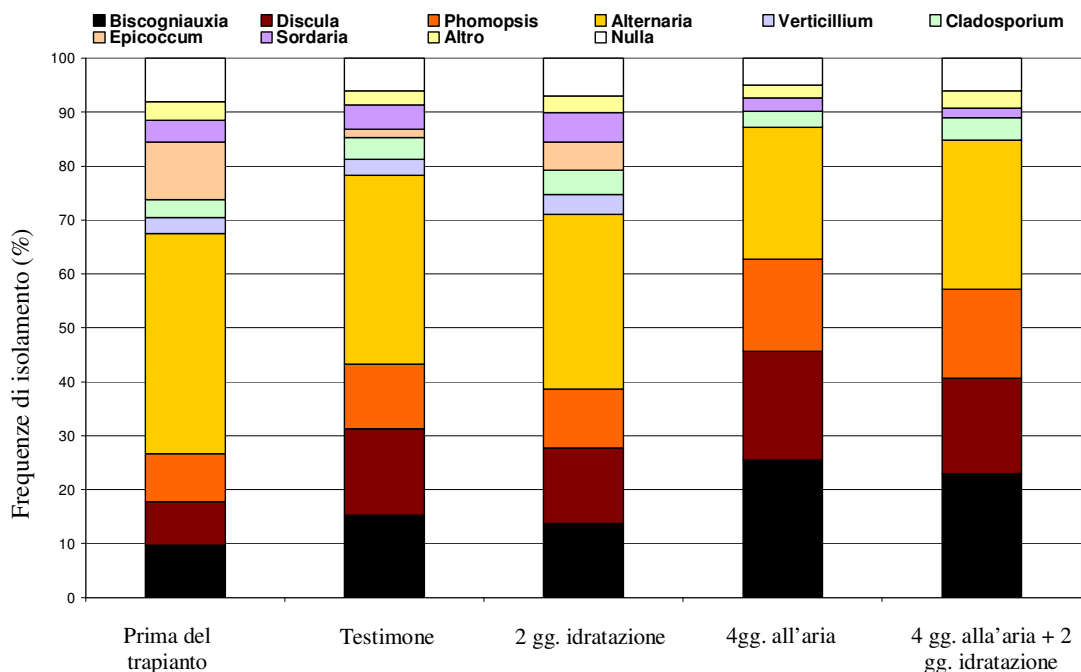


Figura 43. Viterbo, giugno 2008. Istogrammi delle frequenze di isolamento (%) degli endofiti fungini in piante di leccio di tre anni trapiantate previa diversi trattamenti di idratazione e/o disidratazione.

Effetti della disidratazione o idratazione delle piantine sull'incidenza delle crisi di trapianto e sullo sviluppo di necrosi corticali

L'esposizione delle piantine all'aria e/o la loro eventuale idratazione o reidratazione hanno una influenza decisiva sull'attecchimento dopo il trapianto. Mentre l'idratazione ha azzerato la percentuale di mortalità, la disidratazione ha portato a morte circa il 35% delle piante (figura 44). La reidratazione delle piante tramite immersione del pane di terra in acqua, dopo l'esposizione all'aria, ha leggermente ridotto l'incidenza di tale mortalità.

A partire dalla messa a dimora, è stata monitorata anche l'eventuale presenza di sintomatologia o fruttificazioni di agenti patogeni sulle piantine, con particolare riferimento agli agenti di necrosi corticali, ma in nessun caso questi sono stati osservati.

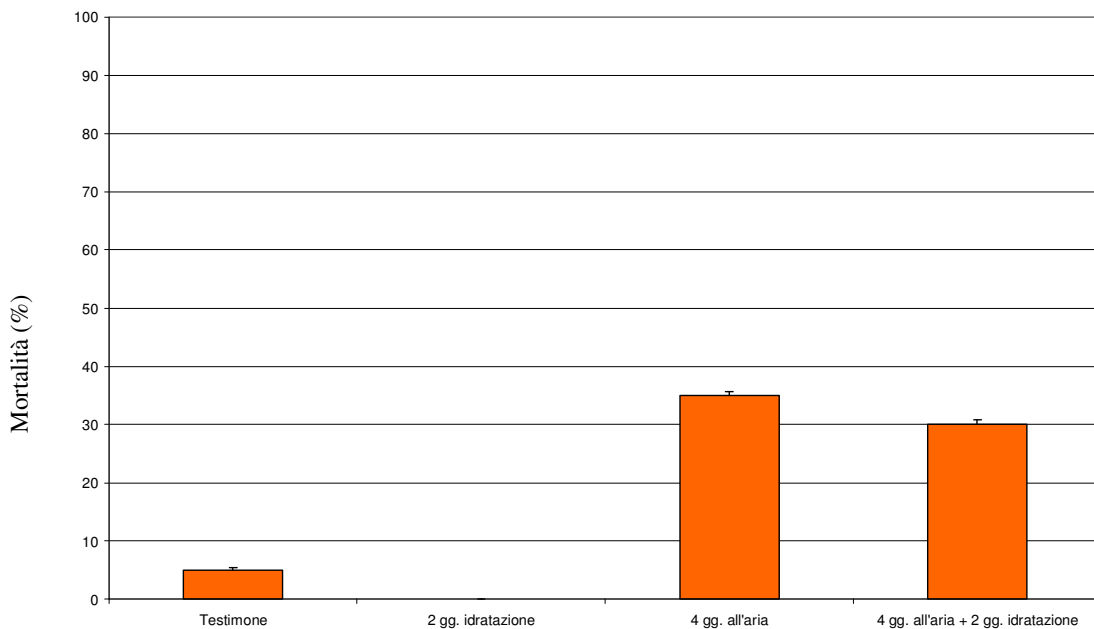


Figura 44. Viterbo, luglio 2008. Istogrammi dell'incidenza (%) della mortalità delle piante di leccio sottoposte ai diversi trattamenti di disidratazione e/o reidratazione prima della messa a dimora. Rilievi effettuati 45 giorni dopo il trapianto.

5. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Con le ricerche condotte con questa Tesi di Dottorato sono stati apportati significativi contributi alle conoscenze sugli endofiti patogeni fungini che si insediano nelle piante in vivaio e sulle relative implicazioni nel mancato attecchimento delle piante nei nuovi impianti.

Le ricerche su pioppo, grazie al suo rapido accrescimento, l'omogeneità delle risposte a livello clonale, la notevole diversificazione del materiale a disposizione e la collaborazione da parte dell'ex-Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura di Casale M.to, hanno permesso di ottenere una notevole varietà di risultati, con utili chiarimenti scientifici e pratici.

Le ricerche su leccio, limitate alla stazione di Viterbo, più difficoltose e variabili, hanno fornito risultati altrettanto interessanti, che sono andati a completare quelli relativi al pioppo.

Nel complesso è stata fatta luce sulla presenza di endofiti patogeni nel materiale propagativo di partenza (talee o ghiande), sul loro insediamento nel tempo nelle piantine in vivaio, anche in funzione della stazione, del materiale genetico, dei regimi idrici e della fertilizzazione, sull'influenza della idratazione o della disidratazione delle piante al trapianto verso la loro isolabilità dopo la messa a dimora, l'eventuale induzione di necrosi corticali e le crisi di trapianto.

Relativamente al pioppo, è stato in particolare messo in evidenza quanto in appresso.

1) Le talee hanno mostrato diversi endofiti patogeni (e non) al loro interno, la cui associazione è apparsa strettamente connessa al sito in cui si trovava il barbatellaio da cui esse sono state ricavate. Vivai isolati, lontani da aree pioppicole, probabilmente per penuria di inoculo, presentano incidenza nulla o modesta di endofiti patogeni corticali. Al contrario, questi sono assai frequenti in vivai costituiti in zone ad intensa pioppicoltura o comunque vicini a numerose piante adulte di pioppo.

2) Le piantine che nascono dalle talee sono tuttavia risultate prive di endofiti, il che dimostra come non si verifichi alcuna diffusione organotropica degli stessi.

3) Le inoculazioni degli endofiti patogeni nelle giovani piante sono apparse notevolmente legate alle piogge, che sembrerebbero rappresentare il vettore principale degli stessi.

4) Una volta avviato, l'insediamento degli endofiti si incrementa progressivamente con il tempo, prevalentemente proprio in occasione delle piogge, portando ad un aumento sia delle specie fungine che vanno via via ad associarsi, sia della loro incidenza.

5) Proprio per questo accumulo nel tempo, l'incidenza degli endofiti patogeni negli strati corticali del fusto cresce in genere passando dalle parti più giovani a quelle basali della pianta, sia nelle pioppelle di uno sia di due anni. Una presenza di endofiti particolarmente elevata è stata anche riscontrata nel cercine, zona di passaggio tra la parte di pioppella di uno e quella di due anni. È probabile che ciò sia da attribuirsi alla presenza in detta zona di più numerose soluzioni di continuità. D'altra parte è notorio come sia proprio al cercine che spesso si sviluppano i più intensi attacchi di necrosi corticali.

6) Le due stazioni considerate, Viterbo nel Lazio e Casale M.to in Piemonte, molto diverse tra loro, hanno fortemente influenzato la composizione degli endofiti nelle piante, probabilmente per la diversità degli inoculi in esse presenti. Infatti, mentre nei vivai di Casale M.to, che si trovano al centro di un'area intensamente pioppicola, è stata constatata una rilevante presenza di endofiti patogeni corticali (*Phomopsis* spp., *Cytospora chrysosperma*, *Fusarium* spp. e, saltuariamente, *Discosporium populeum*), nei vivai di Viterbo, dove la presenza di pioppo è assai sporadica, non è stata rilevata presenza di patogeni corticali.

7) Non sono state verificate significative differenze tra le varie specie o cloni di pioppo nella isolabilità dei vari endofiti patogeni, quantunque sia sembrato che cloni provenienti da *P. trichocarpa* o *P. deltoides*, dotati di una certa resistenza alle necrosi corticali, mostrino una tendenza ad essere meno ricettivi alle infezioni.

8) In vivaio, mentre le concimazioni (bilanciate) non sono risultate condizionare l'incidenza degli endofiti patogeni, le irrigazioni sembrano averne ridotto leggermente l'incidenza. Nelle nostre condizioni sperimentali, infatti, le piante provenienti da parcelle sottoposte a stress idrico hanno presentato frequenze di isolamento degli endofiti fungini agenti di necrosi corticali più elevate di quelle regolarmente irrigate.

D'altra parte, mentre la concimazione (bilanciata) non ha avuto alcun effetto sullo sviluppo delle piante, l'irrigazione ha indotto un accrescimento notevolmente superiore. Resta da comprendere se questo diverso accrescimento possa aver influenzato o meno l'incidenza dei vari endofiti.

9) L'isolabilità degli endofiti relativa alle pioppelle non irrigate in vivaio si è mantenuta superiore a quella delle irrigate anche dopo il trapianto.

10) Nei limiti delle nostre condizioni sperimentali, né l'irrigazione, né la concimazione in vivaio, e pertanto lo sviluppo delle pioppelle, hanno influenzato l'attecchimento delle piante dopo il trapianto, quando questo è stato effettuato senza alcun trattamento (disidratazione o idratazione) agli astoni.

11) Gli attacchi sintomatici dei vari patogeni corticali sono in genere risultati correlati con la presenza dei vari endofiti nelle pioppelle messe a dimora e pertanto, della pressione di inoculo presente nell'ambiente in cui queste sono cresciute. Gli attacchi di *Phomopsis* spp., ad esempio, sia negli impianti di Casale Monferrato che di Viterbo, si sono verificati solo su piante provenienti dalla prima stazione (I-214), dove il patogeno si riscontrava allo stato endofitico.

12) Con il tempo, tuttavia, le pioppelle sono risultate andare incontro ad attacchi di necrosi corticali anche per infezioni dall'esterno, quantunque in essi sia apparso sempre rilevante il peso della carica di patogeni presenti allo stato endofitico.

13) Gli attacchi di necrosi post-impianto sono apparsi comunque differenti da un clone all'altro. Relativamente ai due cloni considerati, I-214 e L. Avanzo, mentre il primo è risultato più colpito da *Phomopsis* spp., il secondo è apparso più suscettibile a *Cytospora chrysosperma*.

14) Una disidratazione delle pioppelle al trapianto, quale quella che si verifica con una loro esposizione all'aria, sembra fortemente aumentare l'isolabilità nel tempo degli endofiti agenti di necrosi corticali sulle piante nella nuova piantagione ed incidere notevolmente sui relativi attacchi sintomatici, causa spesso della morte delle piante. Al contrario, una imbibizione idrica delle pioppelle od una reidratazione di quelle in parte disidratate, tramite, ad esempio, una immersione in acqua, mantiene immutata l'isolabilità degli endofiti patogeni e ne riduce gli attacchi sintomatici.

Quanto agli attacchi di necrosi corticali, contrariamente a quanto rilevato nei decenni passati, nel Nord Italia sono risultati dominare gli attacchi di *Cytospora chrysosperma* e, soprattutto, di *Phomopsis* spp., rispetto a quelli di *Discosporium*, oramai piuttosto rari.

Appare in definitiva evidente come l'attecchimento delle pioppelle messe a dimora sia risultato nettamente favorito da una immersione in acqua degli astoni, grazie probabilmente alla notevole riduzione dello sviluppo delle necrosi corticali. Per contro, una disidratazione delle piante, a causa di una loro esposizione all'aria, ha fortemente esaltato lo sviluppo di necrosi corticali (a loro volta legati, almeno in parte, ai relativi endofiti patogeni) e le crisi di trapianto.

È stato constatato inoltre come *Discosporium populeum*, patogeno che in passato rappresentava il principale responsabile di crisi di trapianto nell'Italia Centro-Nord, oggi sia completamente assente nel Centro Italia e presente assai sporadicamente nelle regioni del Nord. È probabile che la notevole riduzione dell'incidenza di questo patogeno, che notoriamente predilige temperature primaverili relativamente basse, sia da collegare a quel cambiamento climatico del nostro Paese dai più sostenuto negli ultimi decenni, con andamenti più caldi e siccitosi.

Relativamente al leccio, la moltiplicazione per seme di questa specie e la forte pressione di inoculo di numerosi agenti di necrosi corticali presenti a Viterbo, dove erano costituite le parcelle di studio, hanno permesso di ottenere risultati interessanti, che vanno a completare quelli relativi al pioppo. In particolare è stato rilevato quanto segue.

1) Non è risultata alcuna presenza di patogeni corticali all'interno delle ghiande. Ciò dimostra come la moria dei semenzali sia da imputare essenzialmente alla spermoflora esterna del seme.

2) I semenzali sviluppatasi dai semi sono risultati esenti da endofiti patogeni, negando pertanto una diffusione organotropica e confermando quanto verificato per le talee di pioppo.

3) Anche per il leccio, l'insediamento di endofiti patogeni nelle giovani piantine si è verificato in occasione delle prime forti piogge, che sembrerebbero pertanto rappresentare il vettore principale degli stessi.

4) Detto insediamento, così come riscontrato per il pioppo, una volta avviato è aumentato progressivamente con il tempo, portando ad un incremento sia delle specie che vanno ad associarsi sia della loro incidenza.

5) Gli endofiti patogeni rilevati sono quelli tipicamente riscontrati sui lecci adulti nel Centro Italia, quali *Biscogniauxia mediterranea*, *Phomopsis quercina*, *Discula quercina*. Ad essi si uniscono molti endofiti non patogeni per il leccio quali *Verticillium* sp., *Sordaria* sp., *Alternaria alternata*, ecc. Non sono stati rilevati attacchi sintomatici di necrosi corticali in vivaio.

6) In vivaio, al contrario di quanto visto su pioppo, mentre le irrigazioni non sono risultate condizionare l'incidenza degli endofiti patogeni, le concimazioni bilanciate sembrano averla leggermente ridotta.

7) I fenomeni di disidratazione delle piantine al trapianto sembrano fortemente aumentare l'isolabilità nel tempo degli endofiti patogeni sulle piante nel nuovo impianto

e la morte di queste per crisi da trapianto. Al contrario, una idratazione delle piantine o reidratazione di quelle in parte disidratate, mantiene immutata l'isolabilità degli endofiti e garantisce un buon attecchimento.

* * * *

In conclusione, i risultati conseguiti con questa tesi di dottorato appaiono di notevole interesse, sia scientifico, sia pratico. Le evidenze emerse su pioppo e su leccio, generalmente concordanti, sono risultate ben integrarsi tra loro dando particolare rilevanza al relativo significato.

E' stato innanzitutto evidenziato come i semi siano esenti da colonizzazione di patogeni endofiti. Ciò significa che le eventuali morie di pre-emergenza dei semenzali dipendono esclusivamente dalla spermoforma esterna all'epicarpo. Le talee, per contro, possono invece presentare cariche di endofiti patogeni anche forti, che in ogni caso non vengono trasmesse nelle nuove piantine (assenza di diffusione organotropica). E' stato osservato anche come, nelle giovani piante, vadano progressivamente ad insediarsi, allo stato asintomatico, una serie di endofiti fungini, di cui alcuni non patogeni, altri tipicamente patogeni, vari dei quali agenti di necrosi corticali.

Nelle giovani pioppelle, l'insediarsi di endofiti agenti di necrosi corticali, quali *Cytospora chrysosperma*, *Discosporium populeum*, *Phomopsis* spp., *Fusarium* spp., indotto prevalentemente dalle piogge, è dipendente dall'inoculo locale, varia con la specie ospite ed aumenta con gli stress idrici alle piante.

Nelle specie o cloni di pioppo più resistenti alle necrosi corticali sembrerebbe insediarsi una minor carica endofitica dei relativi patogeni responsabili.

E' altresì emerso che molti di tali agenti, sia pur con diversificazioni tra zone diverse, sono gli stessi che concorrono alle crisi di trapianto.

La loro carica nelle piantine è risultata fortemente influenzata dalla stazione e, di conseguenza, dalla tipologia dell'inoculo presente in piante della stessa specie, limitrofe al vivaio. E' stato inoltre evidenziato come alcune tecniche colturali durante la fase vivaistica (es. irrigazione) e soprattutto del trapianto (disidratazione delle piante con esposizione all'aria o idratazione con immersione in acqua) incidano sulla composizione e sull'incidenza di tali endofiti patogeni e sulla loro implicazione nelle crisi di trapianto.

Più in particolare, mentre una perdita del contenuto idrico delle pioppelle al trapianto, quale quella che si verifica con l'esposizione all'aria, aumenta fortemente l'isolabilità degli endofiti patogeni, la comparsa di loro attacchi sintomatici e l'incidenza di crisi di

trapianto, una reidratazione delle stesse con una immersione in acqua riduce drasticamente detti fenomeni.

Le indagini su leccio, su cui sono stati riscontrati endofiti patogeni corticali del genere *Biscogniauxia mediterranea*, *Discula quercina*, *Phomopsis quercina*, ecc., hanno confermato i risultati ottenuti con il pioppo, salvo una riduzione degli endofiti corticali patogeni ad opera di concimazioni bilanciate ed un' assai modesta produzione di fruttificazioni da parte di tali miceti durante le crisi di trapianto.

Alla luce di quanto dimostrato con le nostre ricerche, dal punto di vista pratico i rischi di crisi di trapianto potrebbero in generale essere pertanto ridotti:

- costituendo, quando possibile, vivai in zone con bassa pressione di inoculo;
- offrendo concimazioni bilanciate ed evitando stress idrici in vivaio;
- evitando assolutamente la disidratazione delle piante al trapianto e comunque promuovendo una loro buona idratazione prima della messa a dimora attraverso, ad esempio, una immersione della parte basale degli astoni e dell'apparato radicale in acqua o un apporto di acqua nel pane di terra quando questo rende disagiata l'immersione.

6. BIBLIOGRAFIA CITATA

ANSELMI N., 1979. *Malattia delle "macchie brune" del pioppo*. Inf.tore Agr. 35, 36, 7275-7278.

ANSELMI N., 1986. *Resurgence of Cryptodiaporthe populea in Italy*. EPPO Bulletin, 16, 2, 571-583.

ANSELMI N., 1990. *Water deterioration in poplars following decline after water stress*. Eur. Jour. For. Path., 20: 321-328.

ANSELMI N., 1991. *Pathological problems in poplar plantations in Italy*. In: Proc. International Energy Agency Meetings, Ames, (USA), 22-27 August, 10-18.

ANSELMI N., 1992. *Difesa anticrittogamica di vivai ed impianti forestali. Seminario sul corretto uso dei fitofarmaci*. F.I.D.A.F., Federazione Italiana Dottori in Agraria e Forestali. Ministero Agricoltura e Foreste. 177-186.

ANSELMI N., 1998. *Le carie del legno e la stabilità degli alberi ornamentali*. Informatore fitopatologico, 6, 51-60.

ANSELMI N., 2007, a. *Difesa delle specie arboree ed arbustive impiegate per il verde Urbano*. Informatore Fitopatologico, 7-8, 26-38. (ISSN 0020-0735)

ANSELMI N., 2007, b. *Problematiche fitopatologiche nella gestione delle alberate urbane*. Italus Hortus, 14,5,52-58.

ANSELMI N., GIORCELLI A., 1989. *Dépérissement des peupliers dans la vallée du Pô*. Quelques nouvelles. Forêt-Entreprise, 57, 2-3. Firenze. pp. 369-390.

ANSELMI N., MAZZAGLIA A., 2003. *Aspetti fitopatologici nelle alberate ornamentali*. "Estratto da Informatore fitopatologico", Anno LIII – n.7-8 Luglio-Agosto 2003, Edagricole, pp.6-11 . (ISSN 0020-0735)

ANSELMI N., MAZZAGLIA A., 2005. *"Correlation between the incidence of endophytic pathogenic fungi and oak decline in Quercus ilex after fire damages"*. IOBC/wprs Bulletin Vol. 28(8) Proceedings Meeting Working Group "Integrated Protection in Oak Forests", Hammamet (Tunisia), 4-8 October, 2004, eds Claire Villemant & Mohamed Lahbib Ben Jamaa, 93-100 (ISBN 92-9067-180-5).

ANSELMI, N. e VANNINI, A., 1996. *Danni da inquinanti ambientali sulle alberate e sui parchi urbani*. Acer, 12(2): 18-22.

ANSELMI N., ARREGHINI R., LUCERO H., CALDERON A., 1996. *La "Mancha Parda" de alamo su precencia en Mendoza, Argentina*. Proceed. 37th FAO meeting Executive

Committee, International Poplar Commission, Sapanka, Turkey, October, FO:CIP: D/90/7, 9 pp.

ANSELMINI N., VANNINI A. e FORLENZA R., 1996 a. *Indagine sulla catena di funghi che colonizzano le grosse ferite di potatura*. Mic. Ital, 25(2): 29-34.

ANSELMINI N., MAZZAGLIA A., VANNINI A., 2000. *The role of endophytes in oak decline*. In Ragazzi *et al.* (eds) "Decline of Oak species in Italy. Problems and perspectives", Accademia Italiana di Scienze Forestali, 129-144.

ANSELMINI N., CAPRETTI P., CELLERINO G.P., FRANCESCHINI A., GRANATA G., LUISI N., MARRAS F., MAZZAGLIA A., MUTTO ACCORDI S., RAGAZZI A., VANNINI A., 2002. *Studi sull'endofitismo di patogeni fungini di debolezza implicati nel deperimento delle querce in Italia*. Atti del Convegno "L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive". A. Franceschini e F. Marras (Ed.), Sassari-Tempio Pausania, 19-21 maggio: 43-59. (ISBN 88-7138-272-2)

ANSELMINI N., CELLERINO G.P., FRANCESCHINI A., GRANATA G., LUISI N., MARRAS F., MAZZAGLIA A., MUTTO ACCORDI S., RAGAZZI A., 2004. "*Geographic distribution of fungal endophytes of Quercus sp. in Italy*". In "Endophytism in forest trees", Accademia Italiana di Scienze forestali, 73-89. (ISBN 88-87553-07-6)

ANSELMINI N., MAZZAGLIA A., NASINI M., LIBRANDI I., MORELLI F., ROCCO E., 2007. *Il deperimento delle querce sugli Appennini centrali. Ruolo degli endofiti fungini corticali patogeni*. Convegno Nazionale "Quale futuro per il bosco dell'Appennino", Fabriano 15-17 novembre 2007, pp.7.

ARX (v.) J. A., 1987. *Plant pathogenic fungi*. Berlin, Stuttgart J., Cramer Verlag, pp. 288.

AUTORI VARI, 1981. *Les maladie des peupliers*. AFOCEL (ed.), Paris, France, pp 198. (Gruppo di lavoro sulle malattie, Commissione Internazionale sul pioppo, FAO).

AUTORI VARI, 1990. *Oak decline and the status of Ophiostoma spp. on oak in Europe*. EPPO Bulletin. 20: 405-422.

AUTORI VARI, 1996. *Il deperimento delle alberate nell'ambiente urbano*. Atti del Convegno, Milano, 11 novembre. ACER , 2/1996: 1-39.

BARNETT H. L., BARRY B. HUNTER, 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Fourth edition, pp 164-171.

BELISARIO A., 2004. *Lotta alla Phytophthora*. Convegno "problematiche fitopatologiche delle latifoglie di pregio nella regione lazio".

- BELISARIO A., CACCIOLA S.O., MAGNANO DI SAN LIO G., 1997. *Phytophthora cactorum on walnut seedlings in Italian nurseries*. European Journal of Forest Pathology, 27: 137-146.
- BERNETTI G., 1995. *Selvicoltura speciale*. UTET, pp.415.
- BUSSOTTI, F., GELLINI, R., GROSSONI, P. e Raddi, S., 1992. *Mediterranean forest tree decline in Italy*. Ed. by P. Raddi. National Research Council (CNR), Italy. 64 pp.
- CARMICHAEL J. W., KENDRIK W. B., CONNER I. L., SIGLER L., 1980. *Genera of Hyphomycetes*. The university of Albert Press, Canada, 386 pp.
- CARROLL, F. E., MÜLLER, E. e SUTTON, B. C., 1977. *Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers*. Sydowia, 29: 87-103.
- CARROLL, G. C. e CARROLL, F. E., 1978. *Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest*. Canadian Journal of Botany, 56: 3034-3043.
- CASTELLANI E., ANSELMINI N., 1980. *Problemi patologici del pioppo e del salice da ombra e da ornamento*. Cellulosa e Carta, 31, 4, 27-39.
- CELLERINO, G. P., 1984. *Le Marssonina dei pioppi*. Cellulosa e carta, 11, 22-45.
- CELLERINO, G. P., 1986. *Evoluzione delle malattie del pioppo in Italia e strategie di lotta*. Annali Acc. Agric. Torino, 128, 1-14.
- CELLERINO G.P., ANSELMINI N., 1976. *Sur la présence de nécroses corticales dépourvues de fructifications de champignons*. XIX Sess. FAO/IPC/MAL/76/3-1, Bordeaux, 13-18 Septembre, 6 pp.
- CELLERINO G.P., ANSELMINI N., 1978. *Poplar disease situation in Italy in 1977-1978*. XX Sess. FAO/IPC/DIS/78/2-7, Vienna 28-31 August, 6 pp.
- CELLERINO G.P., ANSELMINI N., 1979. *Enfermedades observadas sobre frondosas en el norte de Italia*. Bol. Serv. Plagas, 5, 1, 85-96.
- CELLERINO G.P., ANSELMINI N., 1980. *Poplar diseases situation in Italy in 1979-1980*. Joint Symposium FAO/IPC/DIS-IUFRO S2.05.03 Kornik, Poland, 7 pp.
- CELLERINO, G. P., ANSELMINI, N., GHISLERI S., 1977. *La defogliazione primaverile del pioppo in Italia*. Arboricoltura da legno, 3-8.
- CELLERINO, G. P., GULLINO L., 1993. *Aspetti fitopatologici da considerare nella scelta e nella gestione delle specie arboree e da giardino*. Atti della giornata di studio "La pianta e il giardino", Torino, 30 settembre 1993, 57-81.
- CHEPLICK, G. P. e CLAY, K., 1988. *Acquired chemical defences in grasses: the role of fungal endophytes*. Oikos, 52: 309-318.

- COHEN S. D., 1999. *Technique for large scale isolation of Discula umbrinella and other foliar endophytic fungi from Quercus species*. Mycologia, 91(5), pp. 917-922.
- CHRISTENSEN, M. J. e LATCH, M. C., 1991. *Variation among isolates of Acremonium endophytes (A. coenophialum and possibly A. typhinum) from tall fescue (Festuca arundinacea)*. Mycol. Res., 95: 1123-1126.
- CLAY, K., 1987. *Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of Lolium perenne and Festuca arundinacea*. Oecologia, 73: 358-362.
- CLAY, K., 1988. *Fungal endophyte of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi*. Ecology. 69: 10-16.
- COLLADO J., PLATAS G., PELÁEZ F., 1996. *Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of Quercus ilex from central Spain*. Nova Hedwiga, 63 : 3-4, 347-360.
- COLLADO J., PLATAS G., GONZÁLES I., PELÁEZ F., 1999. *Geographical and seasonal influences on distribution of fungal endophytes in Quercus ilex*. New phytol. 144: 525-532.
- DE BARY H.A., 1866. *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten (Morphology and Physiology of Fungi, Lichens, and Myxomycetes)*. The Clarendon Press, Oxford. 522 p. 1887.
- DREYER, E. e AUSSENAC, G., eds., 1996. *Ecology and physiology of oaks in a changing environment*. Ann. Sci. For., Special Issue, 53: 161-800.
- FAGIOLI, R., 1998. *Studio sull'endofitismo di Hypoxylon mediterraneum (De Not.) Mill., in tessuti sani di Q. cerris L.*. Tesi di laurea. Dipartimento di Protezione delle Piante – Sezione di Patologia Vegetale - Università degli Studi della Tuscia di Viterbo.
- FAILLA O., BAGONI M., 1996. *Cause ecofisiologiche ed agronomiche del deperimento delle alberate cittadine*. In Atti del Convegno, Milano, 11 novembre, pp 6-8.
- FAO, 1980. *Poplars and willows*. Collection FAO number 10, Sagraf, Napoli, pp.343.
- FISHER P.J., PETRINI O., PETRINI L.E., SUTTON B. C., 1994. *Fungal endophytes from the leaves and twigs of Q. ilex L. from England, Majorca and Switzerland*. New Phytol. (1994), 127: 133-137.
- FRANCESCHINI A., MARRAS M. (Eds.), 2002. *Atti del Convegno Nazionale "L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive"*. Sassari – Tempio Pausania, 19 - 21 maggio 2002, pp. 403.
- FRANCESCHINI A., MADDAU L., MARRAS M., 2002 . *Osservazioni sull'incidenza di ednofiti fungini associati al deperimento di Quercus suber e Q. pubescens*. Atti del

- Convegno Nazionale “L’endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive”, Sassari – Tempio Pausania, 19 - 21 maggio 2002, pp. 313-326.
- FRÖHLICH J., HYDE K. D., PETRINI, O., 2000. *Endophytic fungi associated with palms*. Mycol. Res. 104 (10): 1202-1212 (October 2000).
- GELLINI R., GROSSONI P., 1997. *Botanica forestale*, II. Angiosperme. Ed. CEDAM, Padova.
- GENNARO M., 1993. *Indagini sulle ruggini del pioppo da Melampsora larici-populina Kleb. in Italia*. Tesi di Laurea, DI.VA.P.RA. – Sezione di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Torino.
- GIORCELLI A., VIETTO L., 1994. *Efficacia di alcuni fungicidi nei confronti di Discosporium populeum (Sacc.) Sutton*. Atti delle “Giornate Fitopatologiche”. Montesilvano Lido (PE), 9-12 maggio 1994, pp 203-210.
- GIORCELLI A., VIETTO L., ANSELMI N., GENNARO M., 1996. *Influence of clonal susceptibility, leaf age and inoculum density on infections by Melampsora larici-populina race E₁ and E₃*. Eur. J. For. Path., 26, 323-331.
- GRADI A., 1984. *Avversità d’ordine fitopatologico nell’ordinaria coltura dei vivai forestali*. Atti del Convegno “Problemi fitopatologici delle piante forestali”, Mestre 14 dicembre 1984, 65-81.
- GRANITI A., 2002. *L’endofitismo nei funghi: un adattamento ecologico o un modo di vita?* In: Atti del Convegno “L’endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive”, Sassari, 19-21 Maggio, 11-22.
- KOWALSKY, T. e KEHR, R. D., 1997. *Fungal endophytes of living branch bases in several European tree species*. in “Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants – Systematic, Ecology and Evolution.” Edited by Scott C. Redlin and Lori M. Carris. APS PRESS - The American Phytopathological Society, St.Paul, Minnesota, pp. 67-86.
- HELANDER M.L., RANTA H., NEUVONEN S., 1993. *Responses of phyllosphere microfungi to simulated nitric and sulphuric acid deposition*. Mycol. Res. 97: 533-537.
- LANIER L., JOLY P., BONDOUX P., BELLEMERE A., 1976. *Mycologie et pathologie forestière*. Tome I Mycologie forestière. Masson éditeur 1976, 504 pp.
- LEGAULT, D., DESSUREAULT, M. e LAFLAMME, G., 1989. *Mycoflore des aiguilles de Pinus banksiana et Pinus resinosa*. I. Champignons endophytes. Can. J. Bot., 67: 2052-2060.

- LIBRANDI I., 2006. *Indagini sugli endofiti fungini, patogeni e non, riscontrati su Quercus spp. e sulle reciproche relazioni antagonistiche*. Tesi di dottorato di ricerca in Protezione delle piante, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo, pp. 157.
- LUCHI N., CAPRETTI P., PAZZAGLI M., PIRIZANI P., 2004. *Time quantitative PCR detection of the endophytic occurrence of Biscogniauxia mediterranea in oaks*. In Ragazzi *et al.* (eds), 2004 "Endophytism in forest trees", Accademia di Scienze Forestali, 169-180.
- LUISI, N., LERARIO, P. e VANNINI, A., eds., 1992. *Recent Advances in Studies on Oak Decline*. Proceed. International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, September 13-18, 1992. 541 pp.
- MAGAN, N. e MCLEOD, A. R., 1991. *Effect of atmospheric pollutant on phyllosphere microbial communities*. in: "Microbial Ecology of Leaves." J. H. Anrews and Hirano, eds. Springer-Verlag, New York, pp. 379-400.
- MAZZAGLIA A., 1998. *Studi su alcuni aspetti della biologia di Hypoxylon mediterraneum e sulla relativa diagnosi in fase endofitica mediante tecniche di biologia molecolare*. PhD in Plant Pathology. Università della Tuscia, Viterbo, 117 pp.
- MAZZAGLIA A., ANSELMINI N., GASBARRI A., VANNINI A., 2001. *Development of a polymerase Chain Reaction (PCR) assay for the specific detection of Biscogniauxia mediterranea living as an endophyte in oak tissues*. Mycol. Res., 105 (8), 952-956.
- MAZZAGLIA A., LIBRANDI I., CIAMBELLA L., VANNINI A., ANSELMINI N., 2002 a). *Indagine sui periodi di infezioni endofitiche di Biscogniauxia mediterranea su quercia*. Atti del Convegno "L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive". A. Franceschini e F. Marras (Ed.), Sassari-Tempio Pausania, 19-21 maggio: 293-302. (ISBN 88-7138-272-2)
- MAZZAGLIA A., LIBRANDI I., ANSELMINI N., VANNINI A., 2002 b). *Variabilità genetica di Biscogniauxia mediterranea in piante asintomatiche e sintomatiche di Quercus cerris*. Atti del Convegno "L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive". A. Franceschini e F. Marras (Ed.), Sassari-Tempio Pausania, 19-21 maggio: 379-390. (ISBN 88-7138-272-2)
- MERCURIO R., 1997. *Aspetti colturali e produttivi delle latifoglie di pregio in ambiente mediterraneo*. Atti del Convegno "Arboricoltura da legno: quale futuro?", Nuoro 30-31 ottobre 1997, 99-116.
- MERCURIO R., MINOTTA G., 2000. *Arboricoltura da legno*. Clueb, Bologna, pp. 2003.

- MINERVINI G., 1996. *Il deperimento delle alberate cittadine indotto da funghi*. In Atti del Convegno, Milano, 11 novembre, pp. 31-34.
- MINOTTA G., 2003. *L'arboricoltura da legno: un'attività produttiva al servizio dell'ambiente*. Avenue Media, Bologna, 243pp.
- MULAS F., 2003. *Indagini sullo sviluppo di carie su tagli di potatura in alberi ornamentali e su tecniche molecolari di diagnosi*. Tesi di dottorato di ricerca in Protezione delle piante, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo, pp. 119.
- NASINI M., 2003. *Indagini sull'endofitismo di patogeni connessi a necrosi corticali in piante forestali ornamentali*. Tesi di dottorato di ricerca in Protezione delle piante, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo, pp. 124.
- NASINI M., MAZZAGLIA A., ANSELMINI N., 2006. *In vitro tests on antagonism of endophytic fungi from Quercus spp. towards Biscogniauxia mediterranea*. Journal of Plant Pathology, 87 (4): 299. (ISSN 1125-4653).
- ODONE P., 1993. *Il verde pubblico, allestimento e manutenzione*. Atti Giornata di Studio "La pianta nel giardino", Torino, 30 settembre 1993, 163-181.
- PAOLETTI, E., ed., 1998. *Stress factors and air pollution*. Chemosphere, Special Issues, 36: 625-1166.
- PAOLETTI E., 2006. *Impact of ozone on Mediterranean forests: a review*. Environmental Pollution 144:463-474.
- PAVARI A., 1956. *Alcuni esempi di alberature e loro insegnamenti*. Atti del Convegno "Alberature da legno nella bonifica del Mezzogiorno", Roma, pp.12.
- PETRINI, O. e CARROLL, G., 1981. *Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon*. Can. J. Bot. 59: 629-636.
- PETRINI, O., 1986. *Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues*. In "Microbiology of the phyllosphere" Eds., N.J. Fokkema and J. van den Heuvel. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 175-187.
- PETRINI, O. e FISHER, P. J., 1988. *A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stems of Pinus sylvestris and Fagus sylvatica*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 91: 233-238.
- PETRINI, O. e FISHER, P. J., 1990. *Occurrence of fungal endophytes in twigs of Salix fragilis and Quercus robur*. Mycol. Res., 94: 1077-1080.
- PETRINI, O., 1991. *Fungal endophytes of tree leaves*. In: Microbial Ecology of Leaves (ed. Andrews, J. H. e Hirano, S. S.). Springer Verlag: New York. pp. 179-197.

- PRESTIDGE R. A., GALLAGHER R. T., 1988. *Endophyte fungus conifers resistance to regrass: Argentine stem weevil studies*. Ecol. Entomol. 13: 429-435.
- RAGAZZI A., DELLA VALLE I., 2000. *Decline of oak species: problems and perspective*. Accademia Italiana di Scienze forestali, Firenze, 257 pp. 3.20
- RAGAZZI A., MORICCA S., DELLA VALLE I., 2004. *Endophytism in forest trees*. Accademia Italiana di Scienze Forestali. Pp. 239.
- RAGAZZI A., MORICCA S., CAPRETTI P., DELLA VALLE I., TURCO E., MARIANELLI L., 2002. *Endofiti fungini in Quercus cerris L.: frequenza temporale di isolamento in piante asintomatiche*. Atti del Convegno Nazionale “L’endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive”. Sassari–Tempio Pausania, 19-21 maggio 2002, 269-282.
- RAGAZZI A., MORICCA S., CAPRETTI P., DELLA VALLE I., TURCO E., 2003. *Differences in composition of endophytic mycobiota in twigs and leaves of healthy and declining Quercus species in Italy*. For. Path. 33, pp. 31–38.
- RAVAIOLI F., ANSELMINI N., MAZZAGLIA A., NASINI M., ROCCO E., GORI M., 2006, a. *Indagini fitosanitarie nelle formazioni forestali della Tenuta Presidenziale di Castelporziano*. In “il sistema ambientale della Tenuta di Castelporziano. Ricerche sulla complessità di un ecosistema forestale costiero e mediterraneo”, II serie, Accademia Nazionale delle Scienze detta dei Quaranta “ Scritti e documenti XXXVIII, 675-700”.
- RAVAIOLI F., ROCCO E., NASINI M., MAZZAGLIA A., ANSELMINI N., 2006, b. *Associazioni in Quercus ilex di endofiti fungini, patogeni e non, in relazione ai danni da fuoco subiti dalle piante*. In Atti del XVI Convegno Unione Micologica Italiana, Firenze 4 – 6 dicembre, 47.
- RAVAIOLI F., ROCCO E., NASINI M., MAZZAGLIA A., ANSELMINI N., 2007. *Associazioni in Quercus ilex di endofiti fungini, patogeni e non, in relazione ai danni da fuoco subiti alle piante*. XVI Convegno Nazionale di Micologia, Firenze, 4-6 Dicembre, 13pp, Micologia Italiana, (ISSN 0390-0460)
- RODOLFI M., BRANDOLINI M.A., LORENZI E., RODINO D., PICCO A.M., 2004. *Bipolaris spp. su seme di varietà italiane di Oryza sativa L.* Micologia Italiana: 33, N° 2, Agosto 2004. 28 – 34.
- RODRIGUES, K., 1994. *The foliar fungal endophyte of the Amazonian palm Euterpe oleracea*. Mycologia, 86: 376-385.
- ROLLINGER, J. L. e LANGENHEIM, J. H., 1993. *Geographic survey of fungal endophyte community composition in leaves of coastal redwood*. Mycologia, 85:149-156.

- SANTAMARIA O., DIEZ J. J., 2005. *Fungi in leale, twigs and stem bark of Populus tremula from northern Spain*. For. Path. 35, pp 95-104.
- SCHULZ B., RÖMMERT A.K., DAMMANN U., AUST H.J., STRACK D., 1999. *The endophyte – host interaction: a balanced antagonism?* Mycological Research, 103: 1275-1283.
- SIEBER, T., 1988. *Endophytische Pilze in Nadeln von gesunden und geschädigten Fichten (Picea abies (L.) Karsten)*. Eur. J. For. Pathol., 18: 321-342.
- SIEBER, T., CANAVESI, F. e DORWORTH, C. E. 1991. *Endophytic fungi of red alder (Alnus rubra) leaves and twigs in British Columbia*. Can. J. Bot., 69: 407-411.
- STONE J.K., BACON C.W., WHITE J.W.JR., 2000. *An overview of endophytic microbes: endophytism defined*. In: Bacon C.W., White J.W.Jr. (eds.), Microbial endophytes. M. Dekker, Inc., New York: 3-29.
- SUSKE, J. e ACKER, G., 1990. *Host-endophyte interaction between Lophodermium piceae and Picea abies: cultural, ultrastructural and immunocytochemical studies*. Sydowia, 42: 211-217.
- TROIANI L., ANSELMINI N., 1997. *Moria dei semenzali*. (Damping off in forestal plants). Linea Ecologica, 29, 5, 56-60.
- VANNINI, A. e VALENTINI, R., 1994. *Influence of water relations in Q. cerris – Hypoxylon mediterraneum interaction: a model of drought-induced susceptibility to a weakness parasite*. Tree Physiology, 14: 129-139.
- VANNINI, A., BIOCCA, M. e PAPERATI, B., 1996a. *Contributo alla conoscenza del ciclo biologico di Hypoxylon mediterraneum (De Not.) Mill. su Q. cerris L.* Informatore fitopatologico, 9: 53-55.
- WHITE, J. F. e COLE, G. T., 1985. *Endophyte-host associations in forage grasses*. III. In vitro inhibition of fungi by *Acremonium coenophialum*. Mycologia, 77: 487-489.
- WILLIAMS WOODWARDS J., 2001 - *Simplified fungi identification key*. Cooperative Extension service. College of Agricultural & Environmental Sciences, University of Georgia, Special Bulletin 37, 11 pp.
- WILSON, D. e CARROLL, G. C., 1994. *An endophyte of Oregon white oak: infection studies of Discula quercina*. Mycologia, 86: 635-647.

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo triennio, vorrei innanzi tutto porgere i miei ringraziamenti all'Amministrazione del Comune di Roma, Ente erogatore della mia Borsa di Dottorato, senza il quale questa ricerca non sarebbe stata possibile.

Il mio sincero grazie va all'Istituto di Sperimentazione di Casale Monferrato, nelle persone del Dott. Achille Giorcelli, Cotutore di questa Tesi, del Dott. Massimo Gennaro e, con particolare affetto, del Perito Agrario Giuseppe Deandrea per la loro presenza e l'impagabile esperienza.

Desidero inoltre ringraziare il mio Tutore, Prof. Naldo Anselmi per la sua guida in questo percorso ed il Coordinatore del Dottorato, Prof. Leonardo Varvaro per la sua disponibilità.

Grazie di cuore al Dott. Angelo Mazzaglia e al Dott. Marco Nasini per avermi aiutato nei momenti di difficoltà con consigli e suggerimenti sempre preziosissimi.

Ringrazio il personale dell'Azienda Sperimentale dell'Università della Tuscia ed i Tecnici del Dipartimento di Protezione delle Piante per l'essenziale collaborazione nella costituzione degli impianti e nei lavori in campo.

Un ringraziamento sincero va al Dott. Fulvio Ravaioli e a tutti gli amici del Dipartimento di Protezione delle Piante, per le loro dimostrazioni di amicizia ed affetto e per non avermi fatto mai mancare il loro incoraggiamento.

Grazie, infine, a Luca e alla mia famiglia per la loro indispensabile vicinanza.