



RIPARTIZIONE 32
FORESTE
BOLZANO

PROVINCIA
AUTONOMA
DI BOLZANO
ALTO ADIGE



Indagini su aspetti eziologici di *Sphaeropsis sapinea* in provincia di Bolzano

di Elisabetta Feci



Ripartizione Foreste della Provincia Autonoma di Bolzano-Alto Adige
Serie bibliografica di studi scientifici: Nr.9/2000

Immagine di copertina:

Pineta attaccata da *Cenangium ferruginosum* e *Sphaeropsis sapinea* in località Prissiano (BZ), 1998.

Impressum:

Ripartizione 32. Foreste - Ufficio amministrazione forestale
I-39100 Bolzano • Via Brennero 6
Tel.: 0039/471/415310 - 415311 • Fax . 0039/471/415313
E-Mail: amministrazione.forestale@provincia.bz.it

INDAGINI SU ASPETTI EZIOLOGICI DI
SPHAEROPSIS SAPINEA
IN PROVINCIA DI BOLZANO

di Elisabetta Feci

**Provincia Autonoma di Bolzano - Alto Adige
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie - Sez. Patologia vegetale
forestale, Sez. Entomologia
Unità Operativa Foreste - Istituto di S. Michele all'Adige (TN)**

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. PMESSA | 5 |
| 2. SITUAZIONE DI SPHAEROPSIS SAPINEA IN ITALIA E NEL MONDO | 6 |
| 3. LAVORO SVOLTO | 8 |
| 4. RISULTATI | 14 |
| 4.1 Presenza di <i>Sphaeropsis sapinea</i> e relazione con eventuali insetti vettori | 14 |
| 4.2 Ciclo di <i>Gastrodes grossipes</i> | 15 |
| 4.3 Caratterizzazione di <i>Sphaeropsis sapinea</i> | 16 |
| 5. CONCLUSIONI | 17 |
| 5.1 Presenza di <i>Sphaeropsis sapinea</i> e stato reale e potenziale dell'effetto patogeno | 17 |
| 5.2 Relazioni tra <i>Sphaeropsis sapinea</i>, <i>Gastrodes grossipes</i> e altri insetti | 18 |
| 5.3 Prospettive future | 19 |
| BIBLIOGRAFIA | 21 |

1. Premessa

Nell'ambito del progetto di ricerca *Sphaeropsis sapinea* 2000-2001, concordato tra la Provincia di Bolzano, il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie - Sezioni di Patologia Vegetale e di Entomologia dell'Università degli Studi di Firenze e l'Unità operativa Foreste presso l'Istituto Agrario di S. Michele all'Adige (Trento), è stato affrontato l'aspetto eziologico dei danni da *Sphaeropsis sapinea* su Pino nero e silvestre mediante:

1. Raccolta e osservazione di alcuni campioni di strobili prelevati nelle foreste maggiormente colpite dal patogeno;
2. Isolamento e allevamento del fungo in piastra;
3. Estrazione del DNA genomico dagli isolati e caratterizzazione degli isolati mediante analisi molecolare tramite l'uso di marcatori genetici del tipo RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA).
4. Conteggio e lavaggio degli insetti, reperiti sui pini, possibili disseminatori del fungo, con particolare attenzione alla cimice dei conici *Gastrodes grossipes* (de Geer).
5. Esame microscopico dell'acqua di lavaggio e degli individui allo stadio larvale per l'accertamento della presenza di conidi di *Sphaeropsis sapinea*.

L'indagine è stata rivolta all'individuazione dello stato attuale di diffusione del fungo patogeno e della potenzialità di ulteriori manifestazioni della malattia. In tale contesto le indagini svolte sugli insetti hanno avuto lo scopo di verificare un loro possibile coinvolgimento nella diffusione del patogeno, in particolare per il trasporto di conidi e frammenti di micelio da piante infette a piante sane. Per poter avere un ampio quadro della situazione, si è proceduto a un confronto con varie località situate al di fuori della provincia di Bolzano, e con una serie di isolati della collezione disponibile presso il Dipartimento e l'Unità Operativa Foreste di S. Michele all'Adige.

2. Situazione di *sphaeropsis sapinea* in italia e nel mondo

Il fungo *Sphaeropsis sapinea* (Fr.:Fr.) Dyko e Sutton è uno dei patogeni dannosi alle conifere più comuni e ampiamente distribuiti. Il range di specie ospiti riportato in letteratura comprende più di 30 specie del gen. *Pinus* ed alcune specie dei generi *Abies*, *Cedrus*, *Juniperus*, *Picea* e *Pseudotsuga* (1).

Il patogeno è dotato di una scarsa aggressività, ma diventa pericoloso e mortale se associato ad ambienti e condizioni climatiche particolari (2). Gli ambienti in cui i danni sono più gravi, sono le piantagioni monospecifiche di pino; la siccità, le eccessive concimazioni azotate e altre avversità abiotiche come la grandine (3), sono in molti casi fattori scatenanti la manifestazione della malattia.

I sintomi d'infezione, oltre al disseccamento dei getti e la comparsa di cancri lungo il fusto e i rami colpiti, possono arrivare fino all'azzurramento del fusto (blue stain). In vivaio i semenzali possono morire a causa di marciume radicale, le plantule di 1-3 anni per disseccamento dell'apice vegetativo e carie del colletto. Alla stessa sorte possono andare incontro le piantine poste a dimora dopo lunga permanenza in semenzaio infestato (4).

Il patogeno è noto al mondo scientifico da molto tempo (5); è stato oggetto di studio da parte di vari ricercatori (6), tuttavia alcuni aspetti biologici ed ecologici restano ancora da definire. Negli ultimi anni lo studio delle caratteristiche morfologiche del micelio e dei conidi hanno accertato l'esistenza di una certa variabilità morfologica all'interno della specie (7), presente talvolta anche nella stessa regione geografica (8).

In particolare sono stati individuati due gruppi, designati come morfotipo A e morfotipo B, che differiscono tra loro per morfologia del micelio e dei conidi, tasso di crescita, preferenza di piante ospiti, aggressività. L'esistenza di due ceppi genetici, corrispondenti grosso modo ai morfotipi A e B, è stata confermata successivamente da analisi molecolari attraverso l'uso di marcatori genetici del tipo RAPDs (9).

Il tipo A sembra essere quello più diffuso nel mondo, mentre il tipo B è stato trovato solo recentemente anche al di fuori dell'area geografica in cui è stato individuato per la prima volta (10).

L'uso dell'analisi molecolare per la caratterizzazione di due distinte popolazioni (denominate tipo A e tipo B) di *Sphaeropsis sapinea* si è rivelata più affidabile, dal momento che la variabilità morfologica e biologica del fungo è talmente elevata, da dare luogo a molte forme di transizione, le quali rendono difficile la classificazione e non hanno significato tassonomico (11).

Fino ad oggi l'analisi molecolare con l'uso dei RAPDs è stata condotta su un solo isolato di provenienza italiana (10); l'estensione delle osservazioni su altri isolati risulterebbe invece assai utile per lo studio di *Sphaeropsis sapinea* in Italia.

L'identificazione della presenza di ceppi più o meno aggressivi, infatti, potrebbe aiutare a capire la distribuzione della popolazione di *Sphaeropsis sapinea* e le potenzialità di manifestazione della malattia nel nostro paese.

Anche in Italia, infatti, il patogeno è presente un po' ovunque, prediligendo come piante ospiti il pino nero, il pino domestico e il pino silvestre (12). Manifestazioni epidemiche si sono verificate però solo in determinati siti, come alcuni rimboschimenti di pino nero in provincia di Trento e di Bolzano (13); disseccamenti di chiome di pino nero sono stati segnalati invece in ambiente urbano (14).

Queste gravi manifestazioni si sono verificate in concomitanza, o meglio, a seguito di condizioni di stress idrico per le piante, dovute ad una o più stagioni primaverili ed estive estremamente siccitose; tale circostanza è ampiamente in accordo con quanto riportato in letteratura a proposito dello stress idrico delle piante come uno dei maggiori fattori predisponenti la manifestazione della malattia (15).

Il fungo, come documentato in letteratura (16), presenta un comportamento endofitico asintomatico.

Tale caratteristica e l'enorme carica d'inoculo dovuta alla persistenza di fruttificazioni picnidiche sugli strobili freschi e a terra, rappresentano una minaccia costante di nuove recrudescenze della malattia, nel caso in cui si verificassero nuovamente condizioni di stress per le piante.

Pertanto si ritiene assai utile un'azione di monitoraggio continuo della presenza del patogeno, con i mezzi d'indagine attualmente a disposizione.

3. Lavoro svolto

Le indagini sulla presenza e diffusione di *Sphaeropsis sapinea* su pino e su eventuali insetti vettori, sono state svolte in 5 località, elencate e descritte nella Tab. 1.

Tab. 1: *Elenco e descrizione delle località di campionamento primaverile.*

| Località | Prov. | Altit. (m) | Data | Ospite | Tipo popolamento e localizzazione dei prelievi | Stadio di sviluppo degli alberi campionati | Grado di infestazione da <i>Sphaeropsis sapinea</i> ¹ |
|---|-------|------------|------------|----------------|--|--|--|
| Monte Morello Fonte dei Seppi e bivio Starniano | FI | 620 | 17/05/2000 | Pino nero | Artificiale Margine di bosco e alberi isolati | Alberi adulti, età 40-60 | Alto |
| Terlago Covelo e Ciago | TN | 585 | 31/05/2000 | Pino nero | Artificiale Margine di bosco e alberi isolati | Alberi adulti, età 50-70 | Medio |
| Caldaro | BZ | 550 | 31/05/2000 | Pino silvestre | Naturale Bosco denso e misto | Alberi giovani, età 25-35 | Presenza del fungo non rilevata |
| Varese Ligure Passo di Cento Croci | SP | 910 | 16/06/2000 | Pino nero | Artificiale Margine di bosco e alberi isolati | Alberi adulti, età 40-60 | Basso |
| Opicina Carso Triestino | TS | 320 | 23/06/2000 | Pino nero | Artificiale Margine di bosco e alberi isolati | Alberi giovani e adulti, età 20- 70 | Alto |

1. Il grado d'infestazione è stato stimato su base comparativa tra le località, prendendo come riferimento la presenza di piante morte per attacco del fungo, germogli danneggiati su piante vive e l'infezione degli strobili sull'albero e a terra.

In ciascuna delle suddette località, sono state scelte 10 piante, non contigue fra loro, con un elevato numero di coni aperti nel corso della primavera (cioè al loro terzo anno di sviluppo, denominati per questo Y3) e aventi possibilmente le stesse caratteristiche in relazione alle dimensioni e all'attacco del fungo.

Da ciascuna pianta sono stati prelevati a caso 10 coni, per un totale di 100 coni per località. I coni raccolti sono stati conservati singolarmente, in modo da attribuire gli insetti eventualmente presenti ai rispettivi strobili.

La Tab. 2 mostra le caratteristiche medie degli alberi scelti per ogni località.

Tab. 2: Caratteristiche medie delle piante campionate.

| Località | N. piante | Diametro medio (cm) | | Altezza media (m) | | Numero medio di coni Y3 per albero (stima) | | Alberi con strobili giovaniY | Alberi con strobili vecchiY4 |
|--|-----------|---------------------|----------|-------------------|----------|--|----------|------------------------------|------------------------------|
| | | Media | Dev. st. | Media | Dev. st. | Media | Dev. st. | % | % |
| Monte Morello Fonte de Seppi e bivio Starniano | 10 | 27.1 | 4.1 | 7.6 | 1.0 | 56.1 | 32.0 | 20.0 | 100.0 |
| Terlago, Covelo e Ciago | 10 | 27.8 | 4.6 | 9.4 | 1.0 | 48.0 | 31.9 | 100.0 | 90.0 |
| Caldaro | 10 | 20.3 | 2.9 | 8.8 | 1.03 | 29.4 | 14.4 | 100.0 | 14.3 |
| Varese Ligure P.o Cento Croci | 10 | 32.7 | 5.9 | 7.1 | 1.4 | 97.8 | 63.9 | 30.0 | 40.0 |
| Opicina Carso Triestino | 11 | 19.4 | 8.6 | 5.0 | 1.6 | 39.1 | 27.4 | 90.9 | 63.6 |

Il campionamento è stato effettuato tra la primavera avanzata e l'inizio dell'estate dell'anno 2000, nel momento in cui le fruttificazioni di *Sphaeropsis sapinea* erano già formate e gli insetti erano in piena attività.

In laboratorio gli strobili raccolti sono stati osservati al binoculare per annotare la presenza/assenza di *Sphaeropsis sapinea* e d'insetti, in particolare di *Gastrodes grossipes* (de Geer), un eterottero ligeide noto per frequentare gli strobili di pino (17). Di quest'ultimo veniva annotato anche lo stadio di sviluppo (uovo, larva 1-5 età, adulto).

Gli adulti di *Gastrodes grossipes* e le larve più grandi, di età 4 e 5, sono stati sottoposti a lavaggio, ciascuno in 400 µl di acqua deionizzata e Tween 80 allo 0,3%, all'interno di una provetta di vetro. Dopo aver agitato la provetta a 40 He per 30 secondi, l'individuo è stato tolto dall'acqua e una goccia dell'acqua di lavaggio è stata posta su un vetrino ed osservata al microscopio.

Alla prima osservazione di conidi di *Sphaeropsis sapinea*, l'individuo lavato era considerato come positivo.

Di alcune larve di età 1-3, trovate morte all'interno del cono, è stato possibile fare direttamente un vetrino ed osservare la presenza o meno di conidi sul corpo.

In tarda estate è stata effettuata un'altra raccolta di strobili Y3 in alcune località già campionate e in altre nuove (elencate nella Tab. 3), con l'obiettivo principale di osservare la presenza del fungo, di individui di *Gastrodes grossipes* e di annotare lo stadio di sviluppo di quest'ultimo.

Tab. 3: *Elenco e descrizione delle località di campionamento estivo. I dati delle prime due località sono presentati in Tab. 1.*

| Località | Prov | Altit (m) | Data | Ospite | Tipo popolamento e localizzazione dei prelievi | Stadio di sviluppo degli alberi campionati | Grado d'infestazione da <i>Sphaeropsis sapinea</i> |
|--|------|--------------|------------|-----------|---|---|--|
| Varese Ligure P.so Cento Crocì ¹ | SP | | 05/08/2000 | | | | |
| OpicinaCars o Triestino ¹ | TS | | 08/09/2000 | | | | |
| Naturno, Bivio Senales | BZ | 630 | 06/09/2000 | Pino nero | Artificiale Bosco rado | Alberi adulti, età 80-90 | Basso |
| LacesBivio Silandro | BZ | 810 | 06/09/2000 | Pino nero | Artificiale Bosco rado e misto | Alberi giovani, età 15-40 | Basso |

1. Per i dati mancanti, vedi Tab. 1.

Gli strobili sono stati prelevati in parte sulle piante e in parte a terra e riposti tutti insieme in sacchi per ogni località. In laboratorio i coni sono stati sottoposti allo stesso tipo di osservazioni dei coni del campionamento precedente.

Al fine di sondare il possibile coinvolgimento degli insetti nel trasporto e diffusione del fungo, sono stati sottoposti a lavaggio anche altri insetti, reperiti occasionalmente su piante infette e non, come mostra la tabella seguente:

Tab. 4: *Elenco delle località e degli insetti raccolti per la verifica del trasporto di conidi del fungo.*

| Località | Data raccolta | Nome specie | Ordine | Numero di individui |
|----------------------------|---------------|-----------------------------|--------|---------------------|
| Monte Morello, FI | 08/05/2000 | <i>Haematoloma dorsatum</i> | Hom. | 8 |
| Monte Morello, FI | 20/05/2000 | <i>Lygaeus</i> sp. | Het. | 7 |
| Tregnago, VR | 23/05/2000 | <i>Magdalis</i> sp. | Col. | 3 |
| Terlago, TN | 31/05/2000 | <i>Haematoloma dorsatum</i> | Hom. | 3 |
| Monticolo, BZ ¹ | 01/07/2000 | <i>Dendrolimus pini</i> | Lep. | 3 |
| Monticolo, BZ ¹ | 01/07/2000 | <i>Exoteleia dodecella</i> | | 5 |
| Monticolo, BZ ¹ | 05/07/2000 | <i>Issus coleoptratus</i> | Hom. | 6 |

1. Materiale raccolto e inviato dal Servizio Foreste della Provincia di Bolzano.

La diagnosi della presenza del patogeno sui coni è stata effettuata con l'osservazione, sulle squame, delle fruttificazioni picnidiche, ben visibili, eromponenti e di colore nero.

In caso d'incertezza, è stato fatto ricorso all'esame microscopico dei conidi, prelevati dai picnidi e posti in acqua su vetrino.

L'osservazione dei conidi è stata fatta tenendo conto anche dell'aspetto della parete, considerato utile per la distinzione del tipo A da quello B. Inoltre trenta conidi prelevati da

coni provenienti da località Laces ed altrettanti da Naturno, sono stati misurati in lunghezza e larghezza al microscopio con oculare graduato, per metterli a confronto con le misure riportate in letteratura.

Allo scopo di osservare il micelio durante la crescita, dalle suddette località (Laces e Naturno) sono stati eseguiti alcuni isolamenti monosporici di *Sphaeropsis sapinea*, in piastre Petri su substrato di PDA (Potato Destrose Agar).

Per quanto riguarda l'analisi molecolare, sono stati utilizzati 43 isolati di provenienza italiana e 4 di provenienza nord americana, questi ultimi utilizzati come riferimento per il tipo A e il tipo B.

Tutti gli isolati saggiati sono elencati nella tabella 5.

Tab. 5: isolati di *Sphaeropsis sapinea* sottoposti ad estrazione del DNA e analisi molecolare.

| Sigla | Ospite | Materiale | Località di raccolta, riferimento |
|--------------|--|------------------|---|
| S 1 | <i>Pinus nigra</i> | aghi | S. Michele, FI |
| S 3 | <i>Pinus nigra</i> | strobili | Monte Senario, FI |
| S 4 | <i>Pinus halepensis</i> | aghi | S. Cataldo, LE |
| S 5 | <i>Pinus nigra</i> sbsp. <i>laricio</i> | strobili | Cascine, FI |
| S 6 | <i>Pinus pinea</i> | strobili | M. di Pisticci, MT |
| S 7 | <i>Pinus halepensis</i> | aghi | S. Menaio, FG |
| S 8 | <i>Pinus halepensis</i> | cancri | Mercadante, BA |
| S 9 | <i>Pinus resinosa</i> | aghi | Quebec, Canada |
| S 10 | <i>Pinus pinea</i> | strobili | S. Rossore (Gambogi), PI |
| S 11 | <i>Pinus resinosa</i> | micelio | U.S.A. - Tipo A - G. Stanosz |
| S 12 | <i>Pinus resinosa</i> | micelio | U.S.A. - Tipo A - G. Stanosz |
| S 13 | <i>Pinus banksiana</i> | micelio | U.S.A. - Tipo B - G. Stanosz |
| S 14 | <i>Pinus resinosa</i> | micelio | U.S.A. - Tipo B - G. Stanosz |
| S 15 | <i>Pseudotsuga</i> <i>menziesii</i> | rametto | Grezzano nel Mugello, FI |
| S 16 | <i>Pinus nigra</i> | strobilo | Monte Morello, FI |
| S 17 | <i>Cupressus</i> <i>sempervirens</i> | micelio | Grecia |
| S 18 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Trento - provincia, TN |
| S 19 | <i>Pinus resinosa</i> | aghi | Quebec, Canada |
| S 20 | <i>Pinus pinea</i> | strobili | S. Rossore, PI |
| S 21 | <i>Pinus nigra</i> | strobili | S. Severino Marche, MC |
| S 22 | <i>Pinus halepensis</i> | monosp. | Alassio, SV |
| S 23 | <i>Cupressus</i> <i>sempervirens</i> | tronco | Todi, PG |
| S 27 | <i>Pinus sylvestris</i> | coni | Valternigo, TN - G. Maresi |
| S 28 | <i>Pinus sylvestris</i> | coni | Prissiano, BZ - G. Maresi |
| S 30 | <i>Pinus nigra</i> sbsp. <i>laricio</i> | monosp. | Ferdinanda, VV |
| S 32 | <i>Malus domestica</i> | micelio | Wisconsin, U.S.A. - P. Mc. Manus, G. Stanosz |
| S 34 | <i>Pinus sylvestris</i> | coni | Valternigo, TN - G. Maresi |
| S 36 | <i>Pinus sylvestris</i> | coni | Caerano S. Marco, TV |
| S 38 | <i>Cercis</i> <i>canadensis</i> | micelio | Washington D.C., U.S.A. - K. Jacobs, G. Stanosz |

| Sigla | Ospite | Materiale | Località di raccolta, riferimento |
|--------------|-------------------------|------------------|---|
| S39 | <i>Pinus sp.</i> | micelio | New Brunswick, N.J., U.S.A. - G. Maresi |
| S 40 | <i>Pinus silvestris</i> | micelio | Ospedaletto, Valsugana, TN - G. Maresi |
| S 41 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Terlago, TN - G. Maresi |
| S 42 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Terlago, TN - G. Maresi |
| S 43 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Terlago, TN - G. Maresi |
| S 44 | <i>Pinus sylvestris</i> | micelio | Terlago, TN - G. Maresi |
| S 45 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Strada per Ranzo, Valle dei Laghi, TN - G. Maresi |
| S 46 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Strada per Ranzo, Valle dei Laghi, TN - G. Maresi |
| S47 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Strada per Ranzo, Valle dei Laghi, TN - G. Maresi |
| S 48 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Maso Ariol, Valle dei Laghi, TN - G. Maresi |
| S 49 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Fraveggio, Valle dei Laghi, TN - G. Maresi |
| S 50 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Fraveggio, Valle dei Laghi, TN - G. Maresi |
| S 51 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Lasino, Valle dei Laghi, TN - G. Maresi |
| S 52 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Lasino, Valle dei Laghi, TN - G. Maresi |
| S 53 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | G. d. C., Valle dei Laghi, TN - G. Maresi |
| S 54 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | G. d. C., Valle dei Laghi, TN - G. Maresi |
| S 55 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Vezzano, Valle dei Laghi, TN - G. Maresi |
| S 56 | <i>Pinus nigra</i> | micelio | Calavino, Valle dei Laghi, TN - G. Maresi |

Per la determinazione del morfotipo dei vari isolati raccolti, in laboratorio è stata seguita la seguente procedura:

- Allevamento di ciascun isolato in microprovette su 500 µl di PDB (Potato Destrose Broth) a temperatura ambiente per 5-7 giorni.
- Estrazione del DNA, secondo protocollo ripreso da Stanosz *et al.* (10) leggermente modificato.
- Amplificazione del DNA, mediante la tecnica RAPDs, con l'uso di 3 primers specifici (denominati DS9, DS10 e DS19) che, secondo Stanosz *et al.*, sono sufficienti a distinguere il tipo A dal tipo B.

I primers utilizzati sono stati forniti dalla ditta GIBCO BRL. Le sequenze nucleotidiche sono le seguenti:

- DS9: 5'- GAG ATC TAT GTT GCA CC;
- DS10: 5'- GGA GGA TTT GCT AAC TGA G;
- DS19: 5'- CAG GTC AGC ACC TTT CCA TCC.

Per l'amplificazione è stata usata una macchina per PCR (Programmable Thermal Cycler Delphi 1000, Oracle Biosystems) programmata, in accordo con Smith e Stanosz, 1999 (10), per il seguente profilo di temperatura:

- 2 cicli di 5 min. a 94°C, 5 min. a 40°C e 5 min. a 72°C, per la fase di denaturazione e di appaiamento a basso grado (low stringency annealing)
 - 10 cicli di 1 min. a 94°C, 1 min. a 55°C e 2 min. a 72°C per l'inizio dell'appaiamento ad alto grado (high stringency amplification)
 - dopo l'aggiunta di alcuni reagenti nelle provette, nelle quantità espresse in Smith e Stanosz, 1999 (10), 25 cicli di 1 min. a 94°C, 1 min. a 55°C, 2 min. a 72°C per il completamento dell'amplificazione ad alto grado.
- Separazione degli amplificati per elettroforesi su gel di agarosio allo 0,7%. I frammenti sono stati fotografati alla luce UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

Le fotografie dei gel sono state utilizzate per confrontare i patterns elettroforetici degli isolati italiani coi riferimenti degli isolati nord-americani appartenenti ai morfotipi A e B.

Questi producono frammenti di DNA caratteristici che si riconoscono per il loro peso molecolare, misurato in "paia di basi".

I valori caratteristici per ogni primer utilizzato e per ogni morfotipo sono indicati in Tab. 6.

Tab. 6: Lunghezza, espressa in paia di basi (bp), dei frammenti caratteristici per il tipo A ed il tipo B con l'uso dei primers DS9, DS10, DS19.

| Primer | Frammenti caratteristici TIPO A | Frammenti caratteristici TIPO B |
|--------|------------------------------------|------------------------------------|
| DS 9 | 600 bp | 750 bp |
| DS 10 | 1000 bp, 1600 bp | 700 bp |
| DS 19 | 350 bp | 700 bp |

4. Risultati

4.1 Presenza di *Sphaeropsis sapinea* e relazione con eventuali insetti vettori

I risultati dell'analisi dei conii raccolti nelle varie località e del lavaggio degli insetti rinvenuti negli strobili sono presentati in Tab. 7, separatamente per il campionamento primaverile ed estivo.

Tab. 7: Risultati dell'osservazione al microscopio dei conii campionati nelle varie località e dei lavaggi di insetti trovati

Primavera

| Località | Data raccolta | Ospite | Coni raccolti | Coni con <i>Sphaeropsis sapinea</i> | | Coni con <i>Gastrodes grossipes</i> | | Adulti di <i>Gastrodes grossipes</i> | Adulti di <i>Gg con Ss</i> | Larve con <i>Ss</i> |
|-------------------|---------------|----------------------|---------------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|------|--------------------------------------|----------------------------|---------------------|
| | | | | N | % | N | % | | | |
| Monte Morello, FI | 17/05/2000 | Pino nero, su pianta | 100 | 62 | 62.0 | 67 | 67.0 | 24 | 12 | - |
| Monte Morello, FI | 20/05/2000 | Pino nero, a terra | 30 | 14 | 46.6 | 10 | 33.3 | 1 | 0 | - |
| Terlago, TN | 31/05/2000 | Pino nero | 139 | 54 | 38.8 | 18 | 12.9 | 0 | 0 | 11 |
| Caldaro, BZ | 31/05/2000 | Pino silvestre | 107 | 0 | 0 | 18 | 16.8 | 0 | 0 | 0 |
| Opicina, TS | 23/06/2000 | Pino nero | 109 | 19 | 17.4 | 45 | 41.3 | 69 | 23 | 0 |
| Cento Croci, SP | 16/06/2000 | Pino nero | 98 | 35 | 35.7 | 47 | 47.9 | 0 | 0 | 2 |

Estate

| Località | Data raccolta | Ospite | Coni raccolti | Coni con <i>Sphaeropsis sapinea</i> | | Coni con <i>Gastrodes grossipes</i> | | Adulti di <i>Gastrodes grossipes</i> | Adulti di <i>Gg con Ss</i> | Larve con <i>Ss</i> |
|-----------------|---------------|----------------------|---------------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|------|--------------------------------------|----------------------------|---------------------|
| | | | | N | % | N | % | | | |
| Cento Croci, SP | 05/08/2000 | Pino nero, su pianta | 16 | 3 | 18,7 | 5 | 31,2 | 3 | 0 | 0 |
| Cento Croci, SP | 05/08/2000 | Pino nero, a terra | 14 | 5 | 35,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Opicina, TS | 08/09/2000 | Pino nero, su pianta | 26 | 14 | 51.8 | 21 | 85.2 | 75 | - | - |
| Laces, BZ | 06/09/2000 | Pino nero, su pianta | 81 | 31 | 38,2 | 15 | 18,5 | 19 | 18 | 0 |
| Naturno, BZ | 06/09/2000 | Pino nero, su pianta | 81 | 39 | 48,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Naturno, BZ | 06/09/2000 | Pino nero, a terra | 14 | 2 | 14,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

In linea generale i valori percentuali di conii infetti concordano con l'incidenza di danni sulle chiome dovute ad infestazioni passate e in atto, tuttavia, osservando la Tab. 7, risalta la totale

assenza di *Sphaeropsis sapinea* nel popolamento di pino silvestre; sempre considerevole invece, da un minimo di 17 ad un massimo di 62, la percentuale di conifere infestate da *Sphaeropsis sapinea* sul pino nero.

Riguardo a *Gastrodes grossipes*, la specie è presente in tutte le località campionate, anche se a stadi di sviluppo differenti per le diverse condizioni climatiche locali; la percentuale di conifere frequentate dall'insetto in primavera va da un minimo di 13 ad un massimo di 67. Un certo numero di essi, variabile secondo la località e lo stadio di sviluppo, trasportava conidi sulla superficie corporea. L'unica località in cui nessun individuo è risultato positivo è Caldaro, in cui *Sphaeropsis sapinea* non è stata trovata.

Per quanto riguarda gli altri insetti sottoposti a lavaggio, essi sono risultati sempre negativi, con l'eccezione di *Haematoloma dorsatum* (Tab. 8).

Tab. 8: Risultati dei lavaggi effettuati su insetti diversi da *Gastrodes grossipes*, per la verifica del trasporto di conidi di *Sphaeropsis sapinea*.

| Località | Data raccolta | Nome specie | Numero di individui | Individui con <i>Sphaeropsis sapinea</i> |
|----------------------|---------------|-----------------------------|---------------------|--|
| Monte Morello – FI | 08/05/2000 | <i>Haematoloma dorsatum</i> | 8 | 5 |
| Valle dei Laghi – TN | 31/05/2000 | <i>Haematoloma dorsatum</i> | 3 | 1 |
| Tregnago – VR | 23/05/2000 | <i>Magdalis sp.</i> | 3 | 0 |
| Monticolo – BZ | 01/07/2000 | <i>Dendrolimus pini</i> | 3 | 0 |
| Monticolo – BZ | 05/07/2000 | <i>Issus coleoptratus</i> | 6 | 0 |
| Monticolo – BZ | 01/07/2000 | <i>Exoteleia dodecella</i> | 5 | 0 |
| Monte Morello – FI | 20/05/2000 | <i>Lygaeus sp.</i> | 7 | 0 |

4.2 Ciclo di *Gastrodes grossipes*

Dai dati raccolti nelle varie stagioni e località, sembra lecito concludere che *G. grossipes* svolga una generazione all'anno, con svernamento da adulto e ovideposizione primaverile. La ripresa dell'attività è anticipata in alcune località, dove i nuovi adulti possono essere reperiti già alla fine di giugno (Carso Triestino). L'intero ciclo si compie all'interno dei conifere aperti, che vengono temporaneamente lasciati da larve e adulti nelle ore di oscurità, probabilmente per il reperimento del cibo. Lo spettro alimentare di questa specie rimane ancora largamente sconosciuto.

Se da un lato è stata accertata in laboratorio la possibilità di pungere e succhiare sia aghi di pino sia altri insetti, vivi e morti, mancano dati sull'effettivo comportamento alimentare in campo.

I dati biologici concordano in linea generale con le osservazioni di Nägeli (1934) (17). E' stata anche confermata la presenza in varie località di un microimenottero parassitoide oofago della cimice, identificato da F. Bin come *Telenomus* sp., gruppo *floridanus*, famiglia Scelionidi ed erroneamente identificato in precedenza da Nägeli come *T. gracilis*.

4.3 Caratterizzazione di *Sphaeropsis sapinea*

L'attribuzione di un isolato al morfotipo A o B attraverso l'analisi molecolare è stata fatta solo nel caso in cui tutti e tre i primers avessero prodotto la banda o le bande caratteristiche.

In tutti gli altri casi, gli isolati sono stati considerati di attribuzione incerta e non sono stati inclusi nella presente analisi (Tab. 9).

Tab. 9: Risultati dell'analisi molecolare mediante uso di marcatori genetici del tipo RAPDs

| Sigla ¹ | Ospite | Provenienza | Morfotipo |
|--------------------|---|-----------------------------------|-----------|
| S 1 | <i>Pinus nigra</i> | S. Michele, FI | A |
| S 5 | <i>Pinus nigra</i> sbsp. <i>laricio</i> | Cascine, FI | A |
| S 6 | <i>Pinus pinea</i> | M. di Pisticci, MT | A |
| S 7 | <i>Pinus halepensis</i> | S. Menaio, FG | A |
| S 8 | <i>Pinus halepensis</i> | Mercadante, BA | A |
| S 9 | <i>Pinus resinosa</i> | Quebec, Canada | A |
| S 10 | <i>Pinus pinea</i> | S. Rossore (Gambogi), PI | A |
| S 11 | <i>Pinus resinosa</i> | Usa; testimone tipo A | A |
| S 13 | <i>Pinus banksiana</i> | Usa; testimone tipo B | B |
| S 14 | <i>Pinus resinosa</i> | Usa; testimone tipo B | B |
| S 16 | <i>Pinus nigra</i> | Monte Morello, FI | A |
| S 18 | <i>Pinus nigra</i> | Trentino, TN | A |
| S 19 | <i>Pinus resinosa</i> | Quebec, Canada | A |
| S 20 | <i>Pinus pinea</i> | S. Rossore, PI | A |
| S 21 | <i>Pinus nigra</i> | S. Severino Marche, MC | A |
| S 22 | <i>Pinus halepensis</i> | Alassio, SV | A |
| S 27 | <i>Pinus sylvestris</i> | Valternigo, TN | A |
| S 28 | <i>Pinus sylvestris</i> | Prissiano, BZ | A |
| S 30 | <i>Pinus nigra</i> sbsp. <i>laricio</i> | Ferdinanda, VV | A |
| S 32 | <i>Malus domestica</i> | Wisconsin, U.S.A. | A |
| S 41 | <i>Pinus nigra</i> | Terlago, TN | A |
| S 42 | <i>Pinus nigra</i> | Terlago, TN | A |
| S 43 | <i>Pinus nigra</i> | Terlago, TN | A |
| S 48 | <i>Pinus nigra</i> | Maso Ariol (Valle dei Laghi), TN | A |
| S 49 | <i>Pinus nigra</i> | Fraveggio N (Valle dei Laghi), TN | A |
| S 51 | <i>Pinus nigra</i> | Lasino (Valle dei Laghi), TN | A |
| S 53 | <i>Pinus nigra</i> | G. d. C. (Valle dei Laghi), TN | A |
| S 55 | <i>Pinus nigra</i> | Vezzano (Valle dei Laghi), TN | A |
| S 56 | <i>Pinus nigra</i> | Calavino (Valle dei Laghi), TN | A |

¹ Tra parentesi la sigla del vecchio codice

Nonostante un certo numero di isolati abbia fornito risultati incerti, è evidente che il tipo A è presente in tutta Italia anche in zone geograficamente molto distanti, che vanno dalla Calabria alla zona alpina. E' ragionevole quindi aspettarsi che questo tipo sia diffuso nel resto del territorio italiano.

L'osservazione al microscopio della morfologia del micelio ha rivelato caratteristiche analoghe a quelle descritte in letteratura per il tipo A: il micelio è inizialmente bianco, poi grigio-verde, grigio scuro, infine nero; ha consistenza fioccosa e cresce velocemente in piastra. I conidi sono ovoidali, chiari da giovani, poi marrone scuro, talvolta settati da vecchi.

Tab. 10: Valori di media e deviazione standard delle misure effettuate su un campione di conidi provenienti dalle località sotto elencate

| Località | Numero conidi | Lunghezza μm | | Larghezza μm | |
|-------------|---------------|-------------------------|----------|-------------------------|---------|
| | | Media | Dev. st. | Media | Dev. st |
| Laces, BZ | 31 | 30.0 | 3.8 | 12.0 | 1.3 |
| Naturno, BZ | 30 | 32.7 | 2.2 | 13.7 | 1.2 |

Le dimensioni dei conidi (Tab. 10) sono in accordo con quelle misurate da Palmer *et al.* (1987) (8) per il tipo A; la superficie esterna si presenta liscia oppure picchiettata di piccoli pori. Quest'ultimo carattere non sembra quindi strettamente distintivo tra i due tipi A e B.

5. Conclusioni

5.1 Presenza di *Sphaeropsis sapinea* e stato reale e potenziale dell'effetto patogeno

In Italia sembra essere presente il solo **tipo A**, che dalla letteratura in materia è definito come quello **più aggressivo**.

S. sapinea è d'altronde considerato un debole patogeno capace di colonizzare soltanto piante debilitate da situazioni ambientali sfavorevoli.

E' opportuno quindi intervenire più che altro nella prevenzione, cercando di limitare l'azione dei vari fattori di stress che favoriscono la manifestazione degli attacchi. Nel caso in cui si debba intervenire a posteriori, l'unica strada per evitare il ripetersi degli attacchi in anni

successivi o in posti vicini deve mirare alla diminuzione della carica di inoculo attraverso le ripuliture o in casi estremi con l'abbattimento delle piante gravemente infette.

Dalle osservazioni svolte, *Sphaeropsis sapinea* sembra prediligere alcune specie rispetto ad altre (*Pinus nigra*, *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* rispetto invece a *Pinus sylvestris*). Su quest'ultima specie, nelle località considerate, sembra che il fungo sia meno persistente, almeno per quanto riguarda la presenza di fruttificazioni. Apparentemente in tale contesto il patogeno non costituisce una minaccia, tuttavia non potendo escluderne la presenza in forma latente all'interno dei tessuti della pianta, è opportuno condurre un monitoraggio costante, anche in relazione all'andamento climatico della stazione.

Per quanto riguarda il materiale raccolto da altre specie come *Cupressus* e *Pseudotsuga* è stato osservato che il fungo si presenta diverso sia dal punto di vista morfologico, che all'analisi molecolare. La causa di tale diversità sta nel fatto che probabilmente si tratta di specie affini ma diverse da *S. sapinea*, come hanno cercato di dimostrare alcuni ricercatori (Stanosz *et al.*, 1999) (10).

Ben diversa è la situazione per il pino nero, che in ogni località presa in considerazione si mostra sensibile al patogeno, attraverso una riduzione dell'accrescimento (provocato dal disseccamento degli apici vegetativi) e con la proliferazione di numerosissime fruttificazioni sui suoi tessuti (strobili soprattutto).

*Al di là della fama di parassita di debolezza attribuita a *S. sapinea*, va comunque considerato che anche nelle località meno colpite la carica d'inoculo, rappresentata soprattutto dalle fruttificazioni sui coni aperti sull'albero o a terra è sempre molto elevata. Questo particolare della biologia del fungo, unitamente al fatto che i conidi sono di per sé poco mobili, rende probabile una dispersione ad opera degli insetti che frequentano i coni aperti.*

5.2 Relazioni tra *Sphaeropsis sapinea*, *Gastrodes grossipes* e altri insetti

Dalle indagini svolte è stata rilevata una stretta associazione tra coni di pino e *Gastrodes grossipes*, confermando anche la capacità di trasporto dei conidi da parte dell'insetto (all'osservazione microscopica, i conidi stanno nella parte ventrale, tra le zampe, sul dorso, vedi foto 1 e 2).

Tuttavia non è stata dimostrata l'effettiva capacità di contribuire alla diffusione dell'infestazione, in quanto per questo scopo bisogna impostare una ricerca di tipo diverso,

molto impegnativa dal punto di vista temporale e finanziario, con prove di "lancio" d'insetti infetti su piante sane. Rimane inoltre da chiarire l'abitudine alimentare del *Gastrodes grossipes*, e la condizione preferenziale per lo svernamento. Appare possibile un'associazione mutualistica tra *Sphaeropsis sapinea* e *Gastrodes grossipes*, per il fatto che i coni attaccati dal fungo aprono prima le squame e la cimice può deporvi le uova. Inoltre i coni aperti infetti rimangono appesi ai rami più a lungo dei sani, favorendo quindi il ricovero dell'insetto. E' stata inoltre rilevata una certa capacità di trasporto dei conidi da parte di un noto insetto fitofago dei pini (*Haematoloma dorsatum*), meritevole di eventuali approfondimenti. Altri insetti sono risultati negativi e non sono stati identificati altri possibili candidati al trasporto di *S. sapinea*.

5.3 Prospettive future

Data l'estrema diffusione di *S. sapinea* e la sua potenziale pericolosità, sarebbe assai utile approfondire le ricerche per la messa a punto di una tecnica d'indagine di tipo molecolare adeguata, con marcatori in grado di evidenziare la presenza del fungo allo stato latente, prima che la pianta mostri stati di sofferenza.

L'approfondimento degli studi sull'entomofauna più frequente sui coni di pino, e sulle relazioni che gli insetti instaurano con l'ecosistema circostante può aprire nuove frontiere alla ricerca di un metodo biologico per combattere la malattia. Ad esempio, nel corso del lavoro è stato trovato un microimenottero parassitoide delle uova di *Gastrodes* appartenente al genere *Telenomus* gruppo *floridanus* (identificato dal Prof. Bin dell'Università di Perugia), che potrebbe un domani trovare impiego nel contenimento della popolazione della cimice e di conseguenza della diffusione della malattia.

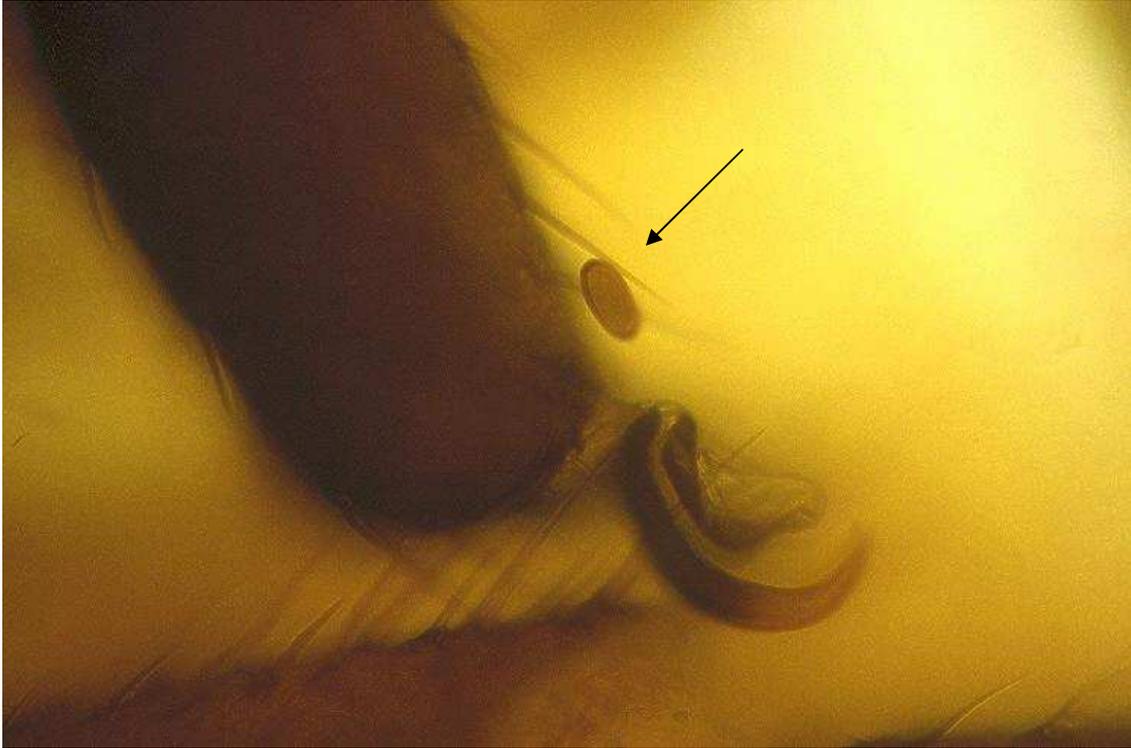


Foto 1: *Zampa di Gastrodes grossipes con conidio di Sphaeropsis sapinea. Ingrandimento a 40x*

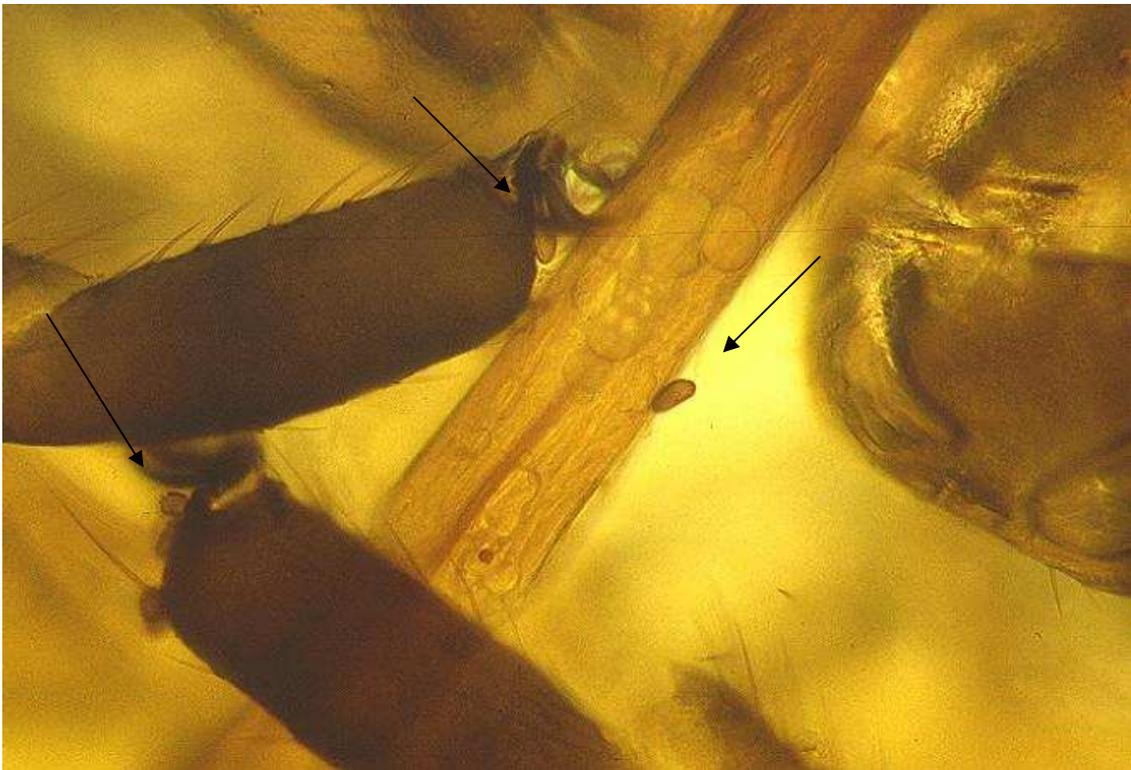


Foto 2: *Conidi di Sphaeropsis sapinea accanto al rostro e tra le zampe di una larva giovane di Gastrodes grossipes reperita su strobili di pino nero altamente infetti. Ingrandimento a 20x*

Bibliografia

1. Swart, W.J., Knox-Davies, P.S., Wingfield, M.J., 1985 - *Sphaeropsis sapinea*, with special reference to its occurrence on *Pinus* spp. in South Africa. - South-African Forestry Journal, 135, 1-8; 81 ref.
2. Swart, W.J.; Wingfield, M.J., 1987 - Factors associated with *Sphaeropsis sapinea* infection of pine trees in South Africa - Phytophylactica, 19:4 505-510.
3. Kam, M. de, Versteegen, C.M., Burg, J. Van den, Werf, D.C. van der, 1991 - Netherlands Journal of Plant Pathology, 97: 265-274.
4. Palmer, M.A., Nicholls, T.H., 1985 - Shoot blight and collar rot of *Pinus resinosa* caused by *Sphaeropsis sapinea* in forest tree nurseries. - Plant Disease, 69: 739-740.
5. Waterman, A.M., 1943 - *Diplodia pinea*, the cause of a disease of hard pines. - Phytopathology, 33: 1018-1031.
6. Swart, W.J., Wingfield, M.J., 1991 - Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. - Plant Disease, 75: 761-766.
7. Wang, C.G., Blanchette R.A., Palmer, M.A., 1986 - Ultrastructural aspects of the conidium cell wall of *Sphaeropsis sapinea*. - Mycologia, 78: 960-963.
8. Palmer, M.A., Stewart. E.L., Nicholls, T.H., 1987 - Variation among isolates of *Sphaeropsis sapinea* in the north central United States - Phytopathology, 77: 944-948.
9. Smith, D.R., Stanosz, G.R., 1995 - Confirmation of two distinct population of *Sphaeropsis sapinea* by in the North Central United States Using RAPDs. - Phytopathology, 85: 699-704.
10. Stanosz, G.R., Swart, W.J., Smith, D.R., 1999 - RAPD marker and isozyme characterization of *Sphaeropsis sapinea* from diverse coniferous hosts and locations. - Mycological Research, 103: 1193-1202.
11. Swart, W.J., Wingfield, M.J., Wyk, P. van, 1993 - Variation in conidial morphology among geographic isolates of *Sphaeropsis sapinea*. - Mycological Research, 97: 832-838
12. Capretti, C., 1956 - *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx agente del disseccamento di varie specie del gen. *Pinus* e di altre conifere. - Annali Accademia Italiana di Scienze Forestali, 1956: 171-202
13. Maresi, G., Ambrosi, P., Confalonieri, M., Capretti, P., 1999 - Disseccamenti da *Cenangium ferruginosum* e *Sphaeropsis sapinea* nelle pinete trentine. - Monti e Boschi, 2: 35-41.
14. Cravero, S., Morone, C., 1995 - Disseccamento del pino nero. - L'Informatore Agrario, 33: 71-73.
15. Blodget, J.T., Kruger, E.L., Stanosz, G.R., 1997 - Effects of moderate water stress on disease development by *Sphaeropsis sapinea* on red pine. - Phytopathology, 87: 422-428.
16. Stanosz, G.R., Smith, D.R., Guthmiller M.A., Stanosz, J.A., 1997 - Persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in asymptomatic shoots of red and jack pines. - Mycologia, 89: 525-530.
17. Nägeli, W., 1934 - Ueber Biologie und Verbreitung der beiden Langwanzen *Gastrodes abietum* Bergr. und *Gastrodes grossipes* De Geer. - Mitt. Schweiz. Aust. Forstl. Vers. 18: 193-280.