



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
FACOLTÀ DI AGRARIA

DOTTORATO DI RICERCA

*Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente
Mediterraneo*

XX Ciclo

**STUDIO SULLE PRINCIPALI MALATTIE
BATTERICHE DEL NOCCIOLO IN SARDEGNA**

Tesi di dottorato di:

Dr.ssa Sabina Viridis

Relatore: Prof. Mario Fiori

Coordinatore: Prof. Antonio Franceschini

Triennio 2005 – 2007

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 DIFFUSIONE DELLA COLTIVAZIONE DEL NOCCIOLO	3
1.1.1 <i>Il nocciolo nel mondo</i>	3
1.1.2 <i>Il nocciolo in Italia</i>	4
1.1.3 <i>Il nocciolo in Sardegna</i>	6
1.2 LO STATO FITOSANITARIO DEL NOCCIOLO NELLE PRINCIPALI AREE DI COLTIVAZIONE:	8
1.2.1 <i>Malattie fungine</i>	8
1.2.2 <i>Malattie batteriche</i>	11
1.2.3 <i>Conoscenze sulle malattie batteriche in Sardegna</i>	14
1.2.4 <i>Difesa fitosanitaria</i>	14
2. SCOPO DEL LAVORO	16
3. MATERIALI E METODI.....	17
3.1 INDAGINI IN PIENO CAMPO	17
3.2 ISOLAMENTO DEGLI AGENTI PATOGENI	17
3.3 IPERSENSIBILITÀ SU TABACCO.....	18
3.4 PROVE DI PATOGENICITÀ.....	18
3.5 CARATTERIZZAZIONE DEGLI AGENTI CAUSALI	20
3.5.1 <i>Caratteri morfologici e colturali</i>	20
3.5.2 <i>Caratteri fisiologici e biochimici</i>	21
3.5.3 <i>Caratterizzazione sierologia</i>	27
3.5.4 <i>Caratterizzazione molecolare</i>	28
3.5.5 <i>Analisi del profilo degli acidi grassi</i>	30
3.6 PROVE DI LOTTA.....	30
3.6.1 <i>Prove in vitro</i>	31
3.6.2 <i>Prove in vivo</i>	31
4. RISULTATI	33
4.1 QUADRI SINTOMATICI	33
4.1.1 <i>Tipo 1</i>	33
4.1.2 <i>Tipo 2</i>	34
4.1.3 <i>Tipo 3</i>	35
4.2 ISOLAMENTO DEGLI AGENTI PATOGENI E CARATTERIZZAZIONE	36
4.2.1 <i>Tipo 1</i>	36
4.2.2 <i>Tipo 2</i>	41
4.2.3 <i>Tipo 3</i>	49
4.3 PROVE DI LOTTA.....	58
4.3.1 <i>Prove in vitro</i>	58
4.3.2 <i>Prove in vivo</i>	59
4.3.2.1 <i>Fitotossicità e patogenicità</i>	59
4.3.2.2 <i>Prove su nocciolo</i>	60
4.3.2.3 <i>Prove su limone</i>	61
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	62
RIASSUNTO.....	67
BIBLIOGRAFIA	68

1. Introduzione

1.1 Diffusione della coltivazione del nocciolo

1.1.1 Il nocciolo nel mondo

Il nocciolo occupa una superficie di circa 496.000 ettari con una produzione di 760.000 t circa (FAO, 2004).

Il maggiore produttore mondiale è la Turchia (70,5 %); seguono Italia (13,4 %), U.S.A. (4,1 %), Spagna (2,8 %), Azerbaijan (2,2 %). La coltura è presente anche in Georgia, Iran e Cina che insieme producono l'1,5 %.

Anche in termini di superficie la Turchia si colloca al primo posto (390.000 ha), seguita da Italia (68.300 ha), Spagna (20.000 ha), Azerbaijan (18.200 ha) e Stati Uniti (11.500 ha)

La Turchia produce oltre 530.000 t. Di questa produzione circa il 12% viene utilizzato per il consumo interno; la restante parte è destinata all'esportazione principalmente verso i paesi dell'UE fra cui Germania (34%) e Italia (13%). Le produzioni sono, per la maggior parte, ottenute da corileti di piccole dimensioni (mediamente 1,5 ha), non irrigui, allevati a cespuglio con alta densità d'impianto (600-700 piante/ha). Le cultivars maggiormente diffuse Tombul (33%), Çakildak (13%), Mincane (12,1%), Karafindik (10,4%), Palaz (10,1%) (Tombesi e Limongelli, 2002) appartengono alla specie *Corylus avellana* var. *pontica* e sono il frutto di selezioni locali. Si tratta di piante con frutto medio-piccolo, idoneo alla trasformazione industriale, che spesso sono commercializzate in miscuglio. L'industria della lavorazione della nocciola è molto sviluppata, esistono infatti 180 aziende di sgusciatura e 40 di trasformazione del prodotto (Bozoglu, 2005)

Gli USA, con una produzione di 25.000 t circa (11.500 ha), sono il terzo paese produttore a livello mondiale. Le aziende americane si caratterizzano per le dimensioni (estensione media 15-30 ha), la densità d'impianto (260-400 piante/ha), la forma di allevamento (monocaula), l'elevato livello di meccanizzazione e per la conduzione con moderne pratiche colturali (Tous, 2001); ciò consente rese ad ettaro molto elevate (2,73 t/ha). Le cultivar maggiormente coltivate sono Barcelona (66%) ed Ennis (13%), destinate principalmente al consumo da tavola. Altre cultivars come Casina, Daviana e Lewis vengono destinate ad usi industriali. Attualmente nei nuovi impianti la cultivar più utilizzata è la Lewis per la sua tolleranza nei confronti di *Anisogramma anomala* agente del "Eastern Filbert Blight". La produzione americana viene destinata per il 14% circa al consumo interno; il 45%,

commercializzata prevalentemente in guscio, è esportato nei paesi europei, la Cina, il Sud America ed il Canada (Mehlenbacher, 2005).

La Spagna, al quarto posto tra i paesi produttori, presenta a partire dagli anni 1980 una forte contrazione della coltura. Attualmente il nocciolo occupa una superficie di circa 20.000 ha e per il 90% è localizzati in Catalogna. Per la maggior parte trattasi di aziende di dimensioni comprese tra 1 e 5 ha, condotte generalmente come attività secondaria. Recentemente la coltura si sta diffondendo nelle zone pianeggianti in prossimità della costa mediterranea. Qui i nocciolieti sono irrigui, vengono condotti con moderne tecniche colturali, sono altamente meccanizzati e si ottengono produzioni di 2,0-2,5 t/ha. La cultivar maggiormente coltivata con l'80% della superficie è Negret; altre cvv utilizzate sono Gironell, Pautet, Culplà, Morell (Tous, 2005). Se si esclude l'ultima cultivar, le altre sono di provenienza locale. Le produzioni spagnole (21.400 t circa) sono destinate, per circa il 45%, all'industria dolciaria locale; la restante parte è esportata principalmente verso la Germania.

1.1.2 Il nocciolo in Italia

L'Italia, con circa 102.000 t, è il secondo produttore di nocciole nel mondo. Tuttavia, nell'ultimo quinquennio le superfici (68.300 ha) risultano in lieve diminuzione (-2,2 %). Campania, Lazio, Sicilia e Piemonte concorrono a fornire oltre il 98% dell'intera produzione nazionale (ISTAT, 2004).

La Campania concorre con oltre il 40%; le province maggiormente interessate sono Avellino, Napoli, Caserta e Salerno. Le cultivars più diffuse, sono Mortarella (38%), S. Giovanni (37 %) e Tonda di Giffoni (12 %). Produzioni elevate, sia in termini di qualità che di resa (si raggiungono anche punte di 4 t/ha), vengono ottenute nella aziende di pianura (rappresentano il 30% del totale) dove viene attuata una migliore organizzazione e applicazione delle tecniche colturali (Me e Valentini, 2006). Nei vecchi impianti invece vi è un insufficiente adeguamento alle nuove tecniche colturali e ciò influisce sia sulle rese sia sulla qualità del prodotto (Piccirillo, 2002). Riguardo alla commercializzazione del prodotto, anche se esiste qualche interessante realtà rappresentata da poche cooperative, essa è poco organizzata; la maggior parte del prodotto viene venduto dalle singole aziende ad intermediari o a commercianti.

Il Lazio, col 32 %, si colloca al secondo posto in Italia. In questa regione la quasi totalità della superficie investita si trova nella provincia di Viterbo (92%) dove la cultivar maggiormente coltivata è la Tonda Gentile Romana (85% della superficie); nella restante

superficie (15%) vengono coltivate le cultivars Nocchione e Tonda di Giffoni. La coltura ha avuto un forte incremento dal 1960 al 1980. Attualmente le superfici investite risultano stabili. Le condizioni pedo-climatiche ottimali, la possibilità di irrigazione e le moderne tecniche colturali fanno sì che le rese siano mediamente di 2,0 t/ha.

Il Piemonte contribuisce per il 12% alla produzione nazionale. Gli impianti sono situati prevalentemente nelle province di Cuneo (74%) ed Asti (23%) ove le superfici investite mostrano, negli ultimi 5 anni, un significativo incremento (+13,1%). La coltura, oltre alle Langhe, area tipiche di produzione del nocciolo, va espandendosi in zone collinari, meno declivi dove il nocciolo va a sostituire, in prevalenza, le colture cerealicole (Valentini e Me, 2002). La cultivar principale, Tonda Gentile delle Langhe (oltre il 90% degli impianti), è nota per le caratteristiche organolettiche e tecnologiche (nel 1993 è stata riconosciuta l'IGP "Nocciola Piemonte") ed è molto richiesta dall'industria dolciaria locale. Punto di forza della commercializzazione del prodotto sono le associazioni che riuniscono i produttori piemontesi, Attraverso due associazioni (Ascopiemonte ed Asprocor) viene commercializzato circa il 70% del prodotto.

In Sicilia la coltivazione del nocciolo ha una tradizione antica di millenni; nell'isola viene prodotto il 14% (circa 15.000 t in 12.000 ha) delle nocciole Italiane, I corileti sono per lo più localizzati nelle province di Messina, Catania e Palermo. Predomina in impianti spesso senescenti e condotti senza alcuna meccanizzazione una cultivar locale denominata "Siciliana" (Alberghina, 2002).

In generale le aziende corilicole italiane non hanno grosse estensioni: si passa da una media di 2 ha della Campania, ai 10-15 ha del Viterbese (Lazio) e alle dimensioni aziendali maggiori delle nuove aree di coltura piemontesi. Oltre a ciò, si possono osservare, nelle province dove è maggiormente valorizzata la corilicoltura, coltivazioni caratterizzate da impianti specializzati che si estendono per molti ettari e rappresentando un elemento fondamentale e caratteristico del paesaggio delle Langhe (Cuneo), dei colli Cimini (Viterbo), dei monti Picentini (Salerno), dell'Avellinese (Avellino), dei monti Nebrodi (Messina) e della Barbagia di Belvì (Nuoro).

Per quanto riguarda le forme di allevamento prevale il cespuglio, ad eccezione del Piemonte e nei nuovi impianti della Campania dove la forma di allevamento monocaule è la più utilizzata (densità d'impianto di 400 piante/ha).

Per ciò che riguarda le tecniche colturali, nel Lazio e in Piemonte i nocciolieti sono spesso irrigui e la migliore giacitura del suolo consente la totale meccanizzazione delle operazioni. Anche in Campania, nei nocciolieti di nuovo impianto, le pratiche colturali

(potatura, concimazione, difesa fitosanitaria) sono effettuate con maggior continuità e in alcuni casi vi è la possibilità di irrigare e la raccolta ed essiccazione sono meccanizzate (Me e Valentini, 2006).

La produzione italiana, ad eccezione di quanto riportato in precedenza, è, in genere, venduta a cooperative ed associazioni di produttori che ne curano i rapporti con le grosse industrie di trasformazione. Esistono, inoltre, piccole ma importanti industrie dolciarie locali che utilizzano le nocciole per produzioni di prodotti di ottima qualità (torroni, dolci, liquori) generalmente venduti *in loco*.

Riguardo ai prezzi delle produzioni italiane, essi non sono sempre soddisfacenti. I prezzi sono fortemente influenzati dal volume di importazioni provenienti annualmente dalla Turchia che, a loro volta, dipendono da decisioni delle autorità governative locali non sempre prevedibili.

Fanno eccezione le produzioni ottenute secondo i metodi biologici che, oltre a spuntare ricavi solitamente superiori del 15-30% rispetto alle nocciole tradizionali, sono premiate da un'elevata stabilità dei prezzi garantita dalle cooperative che acquistano tale prodotto.

Nell'ultimo decennio gli obiettivi perseguiti dagli operatori italiani ed esteri sono rappresentati dall'aumento delle superfici aziendali, dal miglioramento delle tecniche colturali, dall'incremento delle rese per ettaro al fine di ottenere una riduzione dei costi di produzione e di conseguenza un aumento dei redditi. In alcune regioni italiane il miglioramento qualitativo delle produzioni è stato ottenuto mediante la coltivazione di un'unica varietà di pregio (Tonda Gentile delle Langhe in Piemonte, Tonda Gentile romana nel Lazio) e utilizzando più razionali sistemi di raccolta e di lavorazione del prodotto. La coltivazione di un'unica cultivar è da considerarsi una pratica ottimale per l'omogeneità del prodotto, tuttavia espone le coltivazioni a gravi rischi nel caso di comparsa di nuove ed improvvise avversità (Bignami, 2002).

1.1.3 Il nocciolo in Sardegna

In Sardegna la presenza del nocciolo, fino agli anni 1960, era pressoché limitata alla Barbagia di Belvì (NU) ove si rinviene ancora oggi fino ai 1000 m s.l.m., su una superficie di 570 ha circa ed è concentrata soprattutto nel territorio dei comuni di Aritzo, Belvì e Tonara.

A cavallo fra gli anni 1960 e 1970, a seguito di un programma nazionale che finanziava l'impianto "moderno" di nocciuleti, gli ecotipi locali vennero in gran parte

sostituiti da cultivars provenienti da altre aree geografiche, maggiormente apprezzate sul mercato, come la Tonda gentile delle Langhe, Tonda Gentile romana, Trebisonda e la Tonda di Gifoni. A seguito di questo intervento di politica agricola le aree investite a nocciolo raggiunsero i 1000 ha (Schifani, 1971) e la coltura si estese anche alle aree montane dei comuni di Tiana e Laconi. Attualmente, gran parte di questi nuovi investimenti “extrazonali” sono stati completamente abbandonati.

L’aumento delle produzioni concorse allo sviluppo delle industrie dolciarie artigianali locali indirizzate, prevalentemente, alla produzioni di torrone e altri dolci (“Cascheddas”, ecc.). Di recente, nonostante l’aumento delle produzioni dolciarie assai apprezzate sul mercato, si è avuta una contrazione delle produzioni di nocciole locali e le industrie dolciarie per soddisfare le aumentate esigenze importano le nocciole come prodotto sgusciato principalmente dalla Turchia. Nel contempo per qualificare il prodotto le imprese artigiane produttrici di torrone, stanno tentando di ottenere il marchio di certificazione di qualità e di tipicità. Ciò comporterà un inevitabile valorizzazione delle produzioni locali provenienti sia dalle cultivars importate che dagli ecotipi sardi. Questi ultimi sono infatti assai apprezzati per le loro qualità organolettiche. La tipicità delle produzioni è un passo indispensabile per ottenere l’auspicata valorizzazione della filiera nocciole miele. In questo contesto esiste la prospettiva di un aumento delle superfici investite attraverso la realizzazione di nuovi impianti ed il recupero di quelli vecchi. Tuttavia, nonostante le prospettive, lo stato della corilicoltura sarda appare piuttosto preoccupante. Diversi nocciolieti, un tempo accuratamente coltivati, versano in uno stato di abbandono. L’assenza di interventi agronomici li sta portando ad una evoluzione verso il bosco di cui le nocciole sono ormai divenuti prodotti secondari. In quelli ancora attivamente coltivati gli investimenti sono stati ridotti. Gli interventi agronomici sono saltuari, contenuti e limitati alle sole operazioni di pulizia del terreno sotto chioma in prossimità della raccolta. Tutti gli altri interventi, compresi quelli tendenti a limitare il numero di fusti nella ceppaia, vengono, sempre più, protratti nel tempo. Questa situazione sta portando i nocciolieti ad uno stato di deperimento generalizzato al quale concorrono vecchie e nuove malattie, mai indagate in passato. Pertanto, per i potenziali imprenditori, puntare su questa coltura risulta poco allettante e anche rischioso.

1.2 Lo stato fitosanitario del nocciolo nelle principali aree di coltivazione:

1.2.1 Malattie fungine

Tra le malattie fungine che ricoprono maggiore importanza si ricordano:

✓ Mal dello stacco da *Cytospora corylicola* Sacc. ex Fuckel.

Il fungo responsabile è un ascomicete che appartiene all'Ordine dei *Diaporthales*, Famiglia *Valsaceae*, e rappresenta la principale avversità fungina del nocciolo.

La malattia venne riportata per la prima volta in Sicilia (Savastano, 1918) e le venne dato il nome di “disgelatura traumatica”, in quanto attribuita inizialmente all'azione del gelo e del disgelo. In studi successivi (Trotter 1933; 1946) si iniziò ad intravedere il ruolo attivo nella patogenesi svolto dal fungo *C. corylicola*. Non venivano, tuttavia, esclusi interventi di altri fattori ambientali. Altri autori (Pupillo e Canova, 1952; Servazzi, 1950; Graniti, 1957) studiarono la malattia e la attribuirono all'azione di fattori ambientali ed edifici e la *C. corylicola* venne considerato un opportunisto capace di insediarsi nei tessuti debilitati. Solo gli studi epidemiologici di Salerno (1961) chiarirono l'eziologia della malattia dimostrando che *C. corylicola* è un efficiente patogeno da ferita.

La malattia si manifesta inizialmente con la presenza, sulla corteccia dei tronchi e branche, di macchie irregolari di colore bruno con sfumature rossastre. Successivamente passa ai tessuti legnosi e, a seguito dell'azione di un qualsiasi agente atmosferico (es. vento, neve), si ha la caratteristica rottura dei fusti (Varvaro, 1993) che determina la morte delle zone sovrastanti.

In condizioni ambientali particolarmente umide le lesioni si ricoprono di cirri vitrei di colore rosso-rubino, costituiti dai conidi del parassita. La colonizzazione degli organi avviene attraverso ferite, il fungo invade il tessuto legnoso, sotto i tessuti corticali, e si organizza in stromi dai quali hanno origine i picnidi dai quali emergono i cirri.

La malattia è diffusa in tutte le aree di coltivazione del nocciolo, si insedia su piante vecchie e che vegetano stentatamente a causa di cattive condizioni di coltivazione (Scortichini, 2006). In Campania contrariamente alle altre regioni italiane risulta in netto declino (in alcune aree anzi può ritenersi scomparsa), ciò viene attribuito al notevole miglioramento delle tecniche di allevamento (Mazzone e Ragozzino, 2006).

In Sardegna la malattia è piuttosto diffusa ed è grave soprattutto negli impianti che versano in stato di abbandono e le cure colturali sono saltuarie o non vengono eseguite. L'azione parassitaria del micete è influenzata dalle condizioni ambientali caratterizzate da temperature relativamente alte di giorno e basse di notte accompagnate da tassi di umidità

molto elevati. Colpisce in modo particolare le varietà locali “nocciole sarde” mentre le cultivars importate “Tonda Gentile delle Langhe” e “Tonda Gentile Romana” risultano meno colpite.

✓ Mal bianco da *Phyllactinia guttata* (Wallr. ex Fr.) Lev.

La malattia attacca pressoché esclusivamente le foglie. Si manifesta con la presenza sulle pagina superiore di macchie circolari di 2-3 cm di diametro e colore giallo. In corrispondenza di queste, sulla pagina inferiore, emergono, anche se scarsi, gli elementi riproduttivi agamici. In seguito sulle stesse aree si sviluppano i cleistoteci, riuniti in gruppi e visibili ad occhio nudo, di colore prima da giallo a rosso e poi, a maturità, virano al nero. In casi più gravi viene interessata dal giallume l'intera foglia e i cleistoteci, abbondantissimi, si trovano immersi nel micelio fungino. Le foglie colpite si staccano e possono verificarsi defogliazioni anticipate (Granata, 1985; Varvaro, 1993). Il mal bianco non è considerato una malattia dannosa in quanto l'azione della malattia si manifesta, generalmente, in prossimità della raccolta epoca in cui le gemme si sono già differenziate e, pertanto non ha influenza sulla produzione.

✓ Marciume radicale fibroso da *Armillaria mellea* (Vahl. Ex Fr.) Kummel e *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl.

E' causato da due funghi polifagi ed ubiquitari. Le piante attaccate manifestano, inizialmente, vegetazione stentata e foglie che prima ingialliscono e poi disseccano; in genere, non si ha defogliazione in quanto possono rimanere attaccate ai rami (Granata, 1985). Inoltre, sotto la corteccia di radici e colletto si nota un feltro miceliare di colore bianco. Col tempo i tessuti corticali si sfaldano e mostrano i tessuti sottostanti alterati. In autunno alla base delle piante colpite si differenziano gli ascocarpi chiamati “chiodini”. I fattori che favoriscono l'instaurazione e la diffusione della malattia sono rappresentati dalla presenza di ferite, dalla mancata sistemazione dei suoli che determinano ristagni idrici e dall'eccessiva presenza nel suolo di sostanza organica.

✓ Seccume fogliare da *Labrella coryli* (Desm. E Rab.) Sacc. e *Leptothyrium coryli* Fuck. [= *Cylindrothyrium coryli* (Fuck) Ribaldi]

La malattia è caratterizzata dalla presenza nelle foglie, all'inizio dell'estate, di macchie irregolari, rotondeggianti, prima colore verde scuro poi bruno rossastre od ocracee

con contorni scuri ove è possibile osservare la presenza di numerosi punti nerastri rappresentati dai picnidi sub epidermici dei miceti.

La malattia è favorita da temperature ottimali accompagnate da umidità relativa elevata. In caso di forti attacchi le chiome delle piante vanno precocemente incontro a filloptosi che interessa sin'anche il 30% delle foglie (Varvaro, 1993).

✓ Marciume bruno dei frutti da *Monilia fructigena* (Aderh. E Ruhl.) Honey.

Si manifesta sui frutti con la presenza di un imbrunimento dell'involucro esterno e del pericarpo dell'achenio. In genere, la malattia determina la cascola prematura dei frutti, tuttavia, in alcuni casi, essi possono rimanere attaccati alle piante (Granata, 1985). I frutti che permangono attaccati ai rami hanno un'importanza epidemiologica rilevante in quanto, in primavera, sono portatori delle fruttificazioni conidiche. I propagali, trasportati da vettori biotici e abiotici arrivano sui giovani frutticini e, in presenza di ferite, penetrano causando nuove infezioni. Gli attacchi vengono esaltati in annate caratterizzate da andamenti climatici caldo umidi. In questo caso la malattia determina una grave cascola dei frutti e causa danni rilevanti alle produzioni.

✓ Gleosporiosi da *Piggotia coryli* (Desm.).

Causa la necrosi delle gemme, il disseccamento dei rametti, e, più raramente, degli amenti,

Sulle gemme i sintomi compaiono alla ripresa vegetativa. Le squame esterne appaiono imbrunite e, talvolta, sono interessati i nodi in cui sono inserite le gemme. L'attacco può portare a morte le gemme ancora chiuse oppure esse possono dare origine a germogli deboli e di vita breve. Se l'infezione si propaga al nodo, si ha la morte della parte distale del rametto.

Quando il patogeno invade l'asse dei rametti dell'anno esso invade per qualche centimetro l'intero fusto, provoca la necrosi dei tessuti interessati e, come conseguenza, il disseccamento di tutta la parte distale del rametto.

L'infiorescenza maschile può essere colpita in tutto o in parte. Si manifesta con la comparsa, sull'asse principale o sul peduncolo florale, di una colorazione bruna dapprima limitata e poi si estende all'intera infiorescenza causandone la morte. Spesso la necrosi rimane localizzata ad una piccola porzione dell'amento ed allora le parti sane crescono normalmente e possono portare a maturazione il polline.

Le infezioni si instaurano in primavera, possono subire una stasi estiva e, qualora le condizioni favorevoli si manifestino, riprendono in autunno. Trattasi di un fungo appartenente al gruppo gleosporico che necessita per la sua azione della presenza di acqua. In Primavera, i conidi trasportati dall'acqua piovana e da insetti ed acari si insediano nelle gemme di nuova formazione e danno origine ad infezioni latenti che si concretizzeranno nella primavera successiva.

La malattia assume notevole rilevanza in Piemonte, tale da rendere opportuno, in alcune località, il ricorso pressoché abituale all'impiego di fitofarmaci. In Sardegna è presente in forma sporadica (Granata, 1985).

✓ Cancro del nocciolo da *Nectria ditissima* Fr.

Si manifesta in primavera con la presenza sulla corteccia dei rami di depressioni che assumono un colore bruno. In seguito la corteccia si fessura, e si ha la formazione di cancri con la messa a nudo del legno sottostante. Infezioni gravi possono portare a morte il ramo o l'intera pianta. Sugli organi morti in autunno compaiono dei cuscinetti stromatici di colore giallo rappresentati dai periteci del fungo. L'agente patogeno si insedia nei fusti mediante ascospore che penetrano attraverso lesioni causate da grandine, gelo, insetti o potature (Granata, 1985).

1.2.2 Malattie batteriche

Attualmente su nocciolo sono state riscontrate le seguenti malattie batteriche:

- “Moria” del nocciolo da *Pseudomonas avellanae* (Psallidas) Janse *et al.*;
- “Avvizzimento dei rametti e delle branche” da *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall;
- “Moria dei rametti” da *Pseudomonas syringae* pv. *coryli* Scortichini *et al.*, (*sp. nova*)
- “Bacterial blight” o “Bacteriosis of hazel” da *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller *et al.*) Vauterin *et al.*;

✓ “Moria” del nocciolo

Rinvenuta inizialmente nel 1976 (Psallidas, 1979) nella Grecia settentrionale (distretti di Drama, Kavala, Katerini e Kilkis) è stata successivamente trovata anche nel Lazio, in provincia di Viterbo, area dei colli Cimini.

Nell'area dei Colli Cimini, la malattia è apparsa oltre venti anni fa. La fitopatia venne chiamata "moria" (Aloj *et al.*, 1987) per il quadro sintomatico presentato dalle piante colpite; esse manifestavano un deperimento progressivo che, a volte, assumeva proporzioni preoccupanti per la repentinità dell'evoluzione sintomatologica. Per diversi anni la natura eziologica della malattia non è stata accertata (Aloj *et al.*, 1987). Inizialmente essa venne associata a un batterio appartenente al genere *Erwinia* gruppo *amylovora* (Varvaro *et al.*, 1990; Varvaro, 1993) e solo nel 1994 venne isolato e caratterizzato l'agente causale. Esso fu inizialmente inquadrato fra i *Pseudomonas syringae* pv. *avellana* (Scortichini e Tropiano, 1994) e successivamente, in seguito di studi più approfonditi, venne elevato a rango di specie e ascrivito a *Pseudomonas avellanae* (Janse *et al.*, 1996).

I sintomi caratterizzanti la malattia consistono in primavera nella mancata o scarsa fioritura degli amenti cui segue l'avvizzimento e l'appassimento più o meno repentino della pianta, inoltre nei fusti e nelle branche è evidente la presenza di cancri longitudinali. I sintomi si protraggono, con diversa intensità, fino all'inizio dell'autunno. Nelle piante avvizzite in primavera-estate, foglie e frutti restano attaccati ai rami anche dopo la caduta naturale di frutti e foglie sane.

Nelle zone ove è presente la malattia l'infezione avviene in autunno attraverso le cicatrici fogliari rese pervie per la caduta prematura delle foglie oppure dalle ferite su fusti e branche conseguenti agli abbassamenti termici che si verificano a fine inverno. Nel primo caso il batterio viene a trovarsi in una sede privilegiata da dove iniziare l'infezione dei vasi e colonizzare l'intera pianta comprese le radici. Nel secondo caso l'infezione proviene da vecchi cancri formati nell'autunno precedente. L'avvizzimento delle piante totale o parziale può avvenire in un periodo più o meno lungo ed è in dipendenza dell'andamento del processo infettivo.

Oltre agli abbassamenti termici, un'altro fattore che concorre ad aggravare ulteriormente la malattia è rappresentato dall'elevata acidità dei terreni ove viene coltivato il nocciolo. Infatti, nelle zone dove si verificano abbassamenti termici ed il nocciolo è coltivato in terreni acidi il rischio è alto in quanto si è visto che l'incidenza della malattia è elevata (Scortichini *et al.*, 2001).

Nel viterbese risultano colpite dal batterio le cultivar Tonda Gentile Romana, Nocchione e Barrettona. Dal momento del suo rinvenimento la malattia ha interessato circa 1000 ha e 40.000 piante risultano compromesse (Scortichini, 2002).

Per controllare questa batteriosi sono state seguite diverse strategie di intervento. Una tende a ridurre il potenziale d'inoculo attraverso l'espanto dei soggetti infetti; questa è

incoraggiata anche da un intervento legislativo (L. n. 307 del 17.08.1999) e presuppone interventi su ampi territori. Essa va completata nei terreni acidi e nelle zone a rischio gelate con calcitazioni per correggere l'acidità dei suoli e trattamenti con prodotti a base di rame e/o, per contenere le infezioni sistemiche, con un induttore di resistenza come l'acibenzolar-s-metine autorizzato anche su questa coltura.

Per quanto riguarda la Sardegna la situazione riguardo a questa malattia è confortante in quanto, ad oggi, essa risulta non presente.

✓ “Avvizzimento dei rametti e delle branche”

È presente in Campania, Sicilia, basso Lazio e Sardegna (Scortichini *et al.*, 2002a).

L'agente causale, *P. syringae* pv. *syringae*, è un patogeno polifago ed ubiquitario che si caratterizza per provocare avvizzimenti su rami e, in qualche caso, sulle branche; raramente si osserva la morte della pianta colpita. Il contenimento della malattia prevede la rimozione delle parti colpite e trattamenti rameici per contrastarne la diffusione.

In Sardegna la malattia è stata rinvenuta durante il periodo della tesi e, di seguito, ne verranno trattati gli aspetti salienti.

✓ “Moria dei rametti”

Attribuita inizialmente a ceppi simili a *P. syringae* (Scortichini *et al.* 2002a, Fiori *et al.*, 2003), per l'agente causale è stata recentemente proposta la nuova pathovar *P. syringae* pv. *coryli* (Scortichini *et al.*, 2005). La sua presenza è stata accertata inizialmente nelle aree corilicole del Piemonte e della Sardegna.. Di recente la sua presenza è stata accertata in Germania (Poschenrieder *et al.*, 2006) e in Sicilia (province di Catania e Messina) (Cirvilleri *et al.*, 2007).

Le piante malate si caratterizzano per presentare alla ripresa vegetativa necrosi apicale dei germogli, aree necrotiche che evolvono in cancri sui fusticini, necrosi delle nervature principali e secondarie fogliari e cancri longitudinali nei rami e nelle branche.

Di seguito verranno trattati aspetti sintomatici della malattia e la caratterizzazione degli isolati ottenuti nel periodo della presente tesi.

✓ “Bacterial blight” o “Bacteriosis of hazel”

La malattia è stata inizialmente segnalata negli U.S.A.(Oregon) su *Corylus maxima*. In seguito, il batterio è stato trovato in tutte le principali aree di coltivazione del nocciolo: Europa (Francia, Inghilterra, Olanda, Russia, Serbia e Montenegro, Svizzera), Turchia, Algeria, Australia, Canada e Cile (OEPP/EPPO, 2004). Recentemente la malattia è stata segnalata in Germania (Poschenrieder *et al.*, 2006) e in Iran (Kazempour, 2006).

In Italia la malattia è presente in quasi tutte le zone corilicole ed è endemica in Campania e Lazio (Noviello, 1968; Scortichini e Rossi, 1991).

Xanthomonas arboricola pv. *corylina* per l’European and Mediterranean Plant Protection Organization è un organismo da quarantena (OEPP/EPPO, 2004) ed è incluso nella lista A2.

Provoca cancri sui fusti e maculature necrotiche a carico delle foglie, delle bratte e del frutto.

In Sardegna la malattia è stata rinvenuta durante il periodo della tesi e ne verranno in seguito trattati gli aspetti peculiari.

1.2.3 Conoscenze sulle malattie batteriche in Sardegna

Prima dell’inizio del presente studio ben poco si conosceva sulle malattie batteriche del nocciolo. Le uniche conoscenze erano relative ad uno studio effettuato a partire dal 1998 su un’alterazione presente nei noccioli della Barbagia di Belvì (NU), che causava uno stato di sofferenza generalizzata delle piante colpite. Tale alterazione era stata notata inizialmente sulla cultivar Tonda Gentile delle Langhe introdotta dal Piemonte negli anni ’70.

Gli isolati ottenuti venivano ascritti a ceppi di *Pseudomonas* e sorprendentemente gli studi genomici rivelavano una forte somiglianza con ceppi isolati in Piemonte da piante appartenenti alla stessa cultivar (Fiori *et al.*, 2003).

1.2.4 Difesa fitosanitaria

Pur essendo l’Italia il secondo produttore mondiale, la coltura del nocciolo, come nel resto del mondo, è inclusa, tra le colture minori. Per la sua difesa sono ancora necessari trattamenti con prodotti fitosanitari, anche se è possibile, in condizioni normali, l’applicazione dei principi della difesa biologica. Inoltre, se si prendono in considerazione i disciplinari di produzione integrata che prevedono l’utilizzo di molecole chimiche nuove e meno impattanti,

ci si accorge che per il nocciolo le molecole di cui si dispone sono datate e con restrizioni di impiego. Pertanto per la difesa vengono indicati prodotti in discussione a livello comunitario e per i quali non si hanno certezze sulla possibilità di utilizzo in un prossimo futuro (Conte, 2006).

Riguardo al nocciolo, i principi attivi ad azione anticrittogamica autorizzati in Italia e incluse in Annex 1 sono il Carbendazim, il Dinocap, il Thiophanate-methyl e l'Acibenzolar-S-methyl di recente autorizzazione. Altre come il Rame da Carbonato basico, il Rame da Idrossido, il Rame da Ossicloruro, il Rame da Ossido, il Rame da Solfato, il Tebuconazole e lo Zolfo, invece, sono in corso di valutazione a livello europeo e non sono ancora state recepite in Italia (fonte www.Fitorev.com).

Riguardo alla sperimentazione, scarse sono le prove mirate a saggiare l'efficacia di prodotti atti a contenere le batteriosi del nocciolo. Meritano particolare attenzione le prove per il contenimento della "Moria" da *P. avellanae* mediante un induttore di resistenza, Acibenzolar-s-methyl (Bion), e un prodotto di copertura, ossicloruro di rame (Scortichini *et al.*, 2002; Scortichini e Liguori, 2003).

Per quanto riguarda invece i mezzi di lotta biologica non esistono dati in bibliografia.

In Sardegna gli interventi fitosanitari tendenti a controllare le alterazioni di natura crittogamica presenti nelle zone oggetto del presente lavoro sono pressoché assenti. Gli unici interventi comunemente attuati sono quelli indiretti e si limitavano all'applicazione delle tecniche agronomiche che, in alcune circostanze, risultano di notevole efficacia. Per il resto, a parte l'uso sporadico dei composti a base di rame, non si attuano interventi mirati al controllo delle malattie vuoi per la scarsa conoscenza della situazione fitosanitaria o perché ritenuti economicamente poco convenienti.

2. Scopo del lavoro

La ricerca ha avuto come scopo lo studio delle malattie che negli ultimi anni stanno determinando uno stato di deperimento dei noccioli nella Barbagia di Belvì. In particolare si intende approfondire gli studi sulle malattie batteriche riscontrate nell'area di ricerca mediante caratterizzazione degli agenti causali utilizzando sia tecniche tradizionali che genomiche. Infine, poiché in letteratura è stata riscontrata la scarsità di sperimentazione sui prodotti chimici e su quelli ecocompatibili atti a contenere le malattie batteriche sino ad ora riscontrate, verranno saggiati, *in vitro* e *in vivo*, prodotti e microrganismi per il controllo gli agenti delle malattie riportate.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Indagini in pieno campo

Le indagini sono state effettuate in primavera ed in autunno nel triennio dal 2004 al 2006. Sono state visitate le zone ricadenti nei comuni di Aritzo, Belvì, Tiana e Tonara (Barbagia di Belvì, Nuoro) che, in Sardegna, rappresenta la principale area di coltivazione del nocciolo. Durante i sopralluoghi sono state eseguite osservazioni sullo stato fitosanitario dei corileti in aziende dove viene fatta una gestione ordinaria della coltura e in aziende ove le pratiche agronomiche sono saltuarie.

Le indagini hanno riguardato piante chiaramente malate e piante apparentemente sofferenti appartenenti sia ad ecotipi locali, scelti e diffusi dai coltivatori della zona e indicati comunemente come “nocciole sarde”, sia a *cultivars* introdotte in un recente passato in Sardegna come la Tonda gentile delle Langhe, la Tonda gentile romana e la Tonda di Giffoni.

Le osservazioni hanno portato ad individuare tre quadri sintomatici e denominati “Tipo 1”, “Tipo 2” e “Tipo 3”.

Alle osservazioni in campo sono seguiti campionamenti sistematici mediante il prelievo di tessuti vegetali dai quali si è proceduto all’isolamento in laboratorio.

3.2 Isolamento degli agenti patogeni

I tessuti erbacei e legnosi sono stati lavati in acqua corrente e, per eliminare eventuali inquinanti superficiali, sono stati sterilizzati superficialmente mediante rapida immersione in ipoclorito di sodio allo 0,5 %, sciacquati ripetutamente con acqua distillata sterile e asciugati con carta bibula.

Per gli isolamenti i tessuti verdi (foglie, piccioli, frutti verdi e brattee, germogli) sono stati prima ridotti in porzioni di pochi centimetri e poi triturati. Gli isolamenti dai tessuti legnosi, rametti e rami con cancri, sono stati fatti asportando prima l’epidermide esterna e poi prelevando, al confine tra la parte sana e quella malata, piccole porzioni di tessuto legnoso. In entrambi i casi i campioni sono stati triturati in mortai sterili con tampone fosfato (0,5 M, pH 7,2).

Gli isolamenti da porzioni di tessuto con essudati sono stati, invece, eseguiti ponendo i frammenti di tessuto in provette contenenti tampone fosfato.

Per agevolare la fuoriuscita dei batteri dagli spazi intercellulari, i tessuti sono stati lasciati decantare per 30-60 minuti e poi, poltiglie e sospensioni, sono state insemenate su idonei terreni di crescita:

- ✓ gli isolamenti da materiale con sintomi di Tipo 1 in piastre contenenti Nutrient Agar (NA; Oxoid, CM3);
- ✓ gli isolamenti da materiale con sintomi di Tipo 2 e di Tipo 3 in piastre contenenti KB (King *et al.*, 1954).

Le piastre sono state trasferite in termostato alla temperatura di 25° C; le osservazioni tendenti ad accertare l'evolversi della crescita batterica, sono state eseguite giornalmente. Dopo un periodo di 4-6 giorni, per un'ulteriore purificazione, le singole colonie sono state strisciate rispettivamente su NA e KB e conservate su brodo nutritivo (BN; Oxoid, CM 0001).

3.3 Ipersensibilità su tabacco

Preliminarmente, al fine di effettuare un primo *screening*, i singoli isolati sono stati sottoposti al test di ipersensibilità su foglie di tabacco "White burley" (Klement, 1963).

Gli isolati batterici sono stati strisciati su piastre di NA e incubati a 25°C per 24-36 h. La crescita batterica è stata sospesa in acqua sterile fino a raggiungere una concentrazione di circa 10^8 cellule/ml. La sospensione è stata iniettata mediante siringa sterile in una porzione del mesofillo fogliare compreso fra due nervature. Dopo essere state infiltrate, le piante sono state poste in cella climatica alla temperatura di 26-28°C. Come controllo negativo alcune porzioni di lamina fogliare sono state iniettate con acqua distillata sterile.

I risultati sono stati osservati dopo 12, 24 e 48 ore.

3.4 Prove di patogenicità

Gli isolati che hanno dato risposta positiva al test di ipersensibilità su tabacco sono stati prima saggiati su piantine di nocciolo e su altri ospiti erbacei ed arborei.

Per l'esecuzione di questi saggi gli isolati sono stati moltiplicati su piastre contenenti NA e posti in termostato a 25° C. Dopo 48 ore, le colonie sono state sospese in acqua distillata sterile e portate, mediante lettura spettrofotometrica e conta su piastra, ad una concentrazione di circa $10^6 - 10^7$ cellule/ml.

Gli isolati di Tipo 1 sono stati inoculati sperimentalmente su nocciolo, basilico e pomodoro; quelli di Tipo 2 su nocciolo, pero, albicocco, pesco, noce, melo, fagiolo, peperone,

pomodoro, basilico, baccelli di fagiolo, foglie di lillà e frutti limone; quelli di Tipo 3 su nocciolo, pomodoro, lillà, baccelli di fagiolo e frutti di limone.

a) Inoculazioni sperimentali su ospiti arborei (nocciolo, albicocco, melo, noce, pero e pesco)

Per ciascun isolato batterico sono state utilizzate piantine di un anno allevate in fitocelle, quattro per ciascuna specie. In ciascuna pianta sono stati inoculati fusticini erbacei e legnosi, e i piccioli fogliari. Essi sono stati feriti con un bisturi sterile e nebulizzati con le sospensioni batteriche.

Per favorire lo sviluppo e l'evoluzione della malattia, le piantine sono state ricoperte per due giorni con buste di plastica trasparenti, poste in serra per 48 h a 20-22° C e poi in pien'aria.

Come testimone, una piantina per ciascun ceppo in prova è stata inoculata con acqua sterile, seguendo le modalità sopra descritte. Inoltre, per tutto il periodo della prova, altrettante piantine non inoculate, anche queste come testimoni, sono state tenute sotto controllo.

b) Trasmissione su ospiti erbacei (basilico, fagiolo, peperone e pomodoro)

La prova è stata eseguita inoculando cinque piante per isolato. L'inoculazione è stata fatta nebulizzando con le sospensioni batteriche le ferite provocate con un bisturi sterile sui fusticini. Come piante test è stata inclusa una pianta per isolato. Le piante sono state protette, per due giorni, con buste di plastica e poi trasferite in pien'aria. Al fine di seguire l'evoluzione dei sintomi, le osservazioni sono state eseguite giornalmente per 15 giorni.

c) Trasmissione su foglie di lillà

Porzioni del lembo fogliare di lillà ed i rispettivi piccioli sono state infiltrati con le sospensioni batteriche portate ad una concentrazione di circa 10^8 CFU/ml. Per ciascun isolato sono state utilizzate tre foglie ben espanse. Le piante sono state ricoperte per 24 ore con buste di plastica, tenute in laboratorio a temperatura ambiente e osservate per 7 giorni

d) Trasmissione su frutti di limone e baccelli di fagiolo

Prima dell'infezione, i frutti di limone e i baccelli di fagiolo sono stati sterilizzati con ipoclorito di sodio allo 0,5 % e risciacquati con acqua distillata sterile. Per ciascun isolato sono stati utilizzati tre limoni e tre baccelli. In ciascuno di questi sono state causate sei ferite con ago sterile. Su quattro ferite è stata posta una goccia di sospensione batterica mentre le restanti due non sono state infettate e venivano utilizzate per verificare l'evoluzione delle

ferite. Un limone ed un baccello di fagiolo sono stati inoculati con una goccia di acqua distillata sterile sulle ferite e osservati come controlli negativi.

I campioni sono stati posti sotto campana di vetro nella quale veniva creata una camera umida, lasciati in laboratorio a temperatura ambiente e osservati giornalmente per quindici giorni per verificare l'evoluzione dei sintomi.

3.5 Caratterizzazione degli agenti causali

La caratterizzazione è stata effettuata, quando non diversamente specificato, seguendo le metodiche riportate da Lelliot e Stead (1987).

3.5.1 Caratteri morfologici e colturali

a) Morfologia cellulare e inserzione dei flagelli.

Le osservazioni delle forma delle cellule batteriche, la dimensione e la posizione e il numero dei flagelli sono state fatte mediante il microscopio elettronico (Zeiss EM 109, Oberkochen, Germany). Gli isolati sono stati allevati in piastre di NA. La sospensione è stata preparata ponendo un'ansate di crescita batterica in una goccia di soluzione fisiologica e diluendola di 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32. I retini sono stati posti a contatto con le sospensioni e colorati con acido fosfotungstico (1%, pH 7).

b) Reazione di Gram

E' stata eseguita mescolando un'ansata di crescita batterica, prelevata da piastre di NA incubate per 24 ore, con 200 µl di KOH al 3%. I batteri Gram negativi mescolati con la soluzione di idrossido di potassio assumono consistenza gommosa; quelli Gram positivi formano invece una sospensione omogenea.

c) Caratteri colturali

Gli isolati da piante con quadro sintomatico di Tipo 1 sono stati osservati su

- ✓ Yeast extract-dextrose-CaCO₃ - Agar (YDCA): Estratto di lievito, 10 g ; D-glucosio, 20 g; carbonato di calcio, 20 g; Agar, 12 g; acqua distillata 1l.
- ✓ SQ medium (Lee *et al.*, 1992): Acqua distillate sterile, 1l; acido succinico (sale disodico esaidrato), 10g; acido quinic, 5g; K₂HPO₄, 1,5 g; (NH₄)₂SO₄, 1g; Agar, 15 g. Dopo raffreddamento a 50°C il substrato è stato addizionato con 7,5 ml di una soluzione al 20% di MgSO₄ 7 H₂O.

3.5.2 Caratteri fisiologici e biochimici

Tutti gli isolati sono stati sottoposti ai seguenti tests: catalasi, temperatura massima di crescita, riduzione dei nitrati, idrolisi di amido, arbutina, esculina, gelatina e tirosina, produzione di ureasi, lipolisi del tween 80, tolleranza al trifetil tetrazolio cloruro, utilizzazione del latte tornasolato, metabolismo del glucosio, utilizzazione delle fonti di carbonio.

Gli isolati di Tipo 1 sono stati sottoposti anche al test per la produzione di H₂S da peptone e cisterna e di indolo;

Quelli del Tipo 2 sono stati saggiati anche per l'accumulo di poli-β-idrossibutirrato, la degradazione del pectato su Crystal Violet-pectate (CVP).

Infine gli isolati di Tipo 2 e di Tipo 3 sono stati assaggiati per i tests LOPAT e per la tolleranza di NaCl.

✓ Tests LOPAT

a) Produzione levano: è stata osservata su Nutrient Agar (NSA) al 5% di saccarosio (Lelliott *et al.*, 1966);

b) Ossidasi: è stato eseguito secondo il metodo di Kovacs (1956). Sono state utilizzate colture di 24 ore allevate su NA. Un'ansata abbondante è stata strisciata su carta da filtro impregnata con una soluzione acquosa contenente l'1% di NNN,tetrametil-p-fenilendiamina-dicloridrata (preparato fresco). Gli isolati sono stati considerati positivi se, entro 10 secondi, si sviluppava un colore porpora scuro. Dopo 10 secondi, la reazione è stata considerata negativa;

c) Marciume dei tasselli di patata: è stata eseguita la metodica di Lelliott *et al.*, (1966). Da patate lavate in acqua corrente, sterilizzate in una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5% e risciacquate in acqua distillata sterile, sono stati prelevati dei cilindri (diametro 0,7 - 0,8 cm X 1,2 - 1,5 cm di altezza), inoculati per ferite, posti in capsule Petri ove è stata creata una camera umida e trasferiti in termostato a 25° C. La marcescenza del tassello dopo 48 ore era indicativa della positività dell'isolato al test.

d) Idrolisi dell'arginina: è stata determinata nel substrato di Thornley (1960). I tubi contenenti il terreno base [peptone 0,1 g; NaCl 0,5 g; K₂HPO₄ 0,03 g; L (+) arginina HCl 1 g; agar 0,3 g; rosso fenolo 0,001 g; acqua distillata 100 ml] sono stati sterilizzati a 121° C per 15 minuti e, subito dopo è stata aggiunta della paraffina sterile per creare un ambiente anaerobico. La risposta è stata considerata positiva se dopo 3 o dopo 7 giorni il substrato virava dal color arancio al magenta intenso.

e) Ipersensibilità su foglie di tabacco (descritta sopra al paragrafo 3.3)

✓ **Temperatura massima di crescita:** E' stata osservata su brodo YS (Acqua distillata sterile 1l; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5g; K_2HPO_4 0.5g; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g; NaCl 5g; estratto di lievito 5g) (Schaad *et al.*, 2001).

✓ **Test della catalasi**

Un'ansata di crescita batterica è stata diluita in una goccia di acqua ossigenata al 3%. La produzione immediata di bollicine di gas, dopo circa 10 minuti, è indice di positività al test.

✓ **Riduzione dei nitrati**

Il terreno base è così costituito: KNO_3 , 1 g; Peptone, 5 g; estratto di lievito, 3 g; Agar, 3 g; acqua distillata 1l. Per il saggio si è proceduto a insembrare i tubi per infissione. I risultati sono stati osservati dopo 3 e 7 giorni utilizzando il reagente di Follet e Ratcliff che rivela la presenza di nitrito (colorazione rossa). Se dopo l'aggiunta del reagente le provette rimangono incolori si aggiunge un po' di polvere di zinco che mette in evidenza la mancata riduzione dei nitrati a nitrito (colorazione rossa) o l'ulteriore riduzione ad ossido di azoto e/o ad azoto gassoso (nessuna colorazione).

Composizione del reagente di Follet e Ratcliff: acido acetico glaciale 50 ml; acqua distillata 360 ml; acido sulfanilico 0,25 g; α -naftolo 0,2 g; soluzione acquosa al 10% (v/v) di ammonio (0,88) 90 ml. Si aggiunge l'acido acetico all'acqua, si scalda a 50° C e si mette in una bottiglia di vetro scura contenente l'acido solfanilico. Quando è sciolto si aggiunge l' α -naftolo e si lascia sciogliere. Si lascia raffreddare a temperatura ambiente e si aggiunge la soluzione di ammonio. Il reagente deve essere conservato al buio a 4° C.

✓ **Idrolisi dell'arbutina**

Il mezzo utilizzato è composto da: peptone; arbutina 1 g; citrato ferrico in scaglie 0,5 g; agar 12 g; acqua distillata 1 l.

L'utilizzazione dell'arbutina si manifesta, entro 3-4 giorni, mediante un progressivo annerimento del terreno o mediante la scomparsa della fluorescenza osservata sotto luce ultravioletta.

✓ **Idrolisi dell'amido**

Il mezzo utilizzato è composto da: agar nutritivo, 28 g; amido solubile, 2 g; acqua distillata, 1 l. I risultati sono stati osservati dopo 5 giorni versando nelle piastre 10 ml della soluzione di Lugol (iodio 1 g; ioduro di K 2 g; acqua distillata 300 ml). La comparsa di zone chiare intorno alle colonie indica l'avvenuta idrolisi dell'amido.

✓ **Idrolisi dell'esculina**

Il mezzo utilizzato è composto da: peptone; esculina 1 g; citrato ferrico in scaglie 0,5 g; agar 12 g; acqua distillata 1 l. L'utilizzazione dell'esculina si manifesta, entro 3-4 giorni, mediante un progressivo annerimento del terreno o mediante la scomparsa della fluorescenza osservata sotto luce ultravioletta.

✓ **Idrolisi della gelatina**

Il terreno base è costituito da: estratto di lievito, 3 g; peptone, 5 g; gelatina, 120 g; acqua distillata 1 l. I rilievi sono stati fatti dopo 3, 7, 14, 21 e 28 giorni. Prima di rilevare i dati le provette sono state poste per 30 minuti a 5 °C. Sono stati considerati positivi gli isolati capaci di liquefare il terreno. I terreni semisolidi non sono stati presi in considerazione.

✓ **Produzione di ureasi.**

Il mezzo base è composto da: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5 g; KH_2PO_4 , 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; NaCl, 5 g; estratto di lievito, 1 g; rosso cresolo 16 mg; acqua distillata 800 ml. Dopo l'autoclavaggio è stata addizionata la soluzione contenente l'urea sterilizzata per filtrazione (20 g di urea + 180 ml di acqua distillata). Il terreno è stato dispensato in tubi sterili. I tubi sono stati inoculati con la crescita batterica e tenuti in osservazione per 7 giorni. Il viraggio di colore dal giallo al rosso indica la produzione di ureasi.

✓ **Idrolisi della tirosina**

Il terreno utilizzato contiene: glicerolo, 5 ml; idrolisato di caseina, 10 g; K_2HPO_4 , 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g; L-tirosina, 1 g; agar, 15 g; acqua distillata 1000 ml. Le osservazioni sono state eseguite dopo 3 e 7 giorni dall'inseminazione. L'azione della tirosinasi è evidenziata dalla produzione di un pigmento rosa o bruno rossastro intorno alla crescita batterica.

✓ **Lipolisi del tween 80**

Il mezzo base è composto da: peptone, 10 g; NaCl, 5 g; CaCl₂ x 2H₂O, 0,1 g; Agar, 15 g; acqua distillata, 1l. Terreno base e Tween 80 vengono sterilizzati separatamente. Dopo autoclavaggio e raffreddamento a 55° C, il terreno base è stato addizionato con Tween 80 in ragione dell'1%. L'idrolisi del Tween 80 è indicata dalla comparsa di un precipitato bianco latte intorno alle colonie cresciute sulle piastre.

✓ **Tolleranza al trifetil tetrazolio cloruro**

Il nutrient Agar (NA), sterilizzato e lasciato raffreddare fino a 55° C, viene addizionato con una soluzione all'1% di 2-3-5-trifenil-tetrazolio-cloruro (TTC) sterilizzata per filtrazione fino ad ottenere una concentrazione finale dello 0,1%. L'avvenuta crescita dell'isolato nelle piastre contenenti il substrato indica un risultato positivo.

✓ **Metabolismo del glucosio.**

E' stato utilizzato il mezzo di Hugh e Leifson (1953) composto da: peptone, 2 g; NaCl 5 g; K₂HPO₄, 0,3 g; agar, 3 g; blu di bromotimolo, 0,03 g, acqua distillata, 1l. Dopo sterilizzazione raffreddamento del mezzo a 50° C, è stata aggiunta una soluzione acquosa di D-glucosio, sterilizzato mediante filtrazione, sino ad ottenere una concentrazione finale dell'1%. Il terreno è stato dispensato in tubi sterili e nel 50% di essi sono state create le condizioni di anaerobiosi aggiungendo 2 ml di olio di paraffina sterile. La comparsa di un colore giallo nei tubi con o senza paraffina indica il metabolismo dell'isolato. Il metabolismo è ossidativo se i batteri sono capaci di crescere e acido in condizioni aerobiosi, fermentativo se crescono in condizioni di anaerobiosi.

✓ **Produzione di H₂S da peptone e da cisteina**

Come terreno di base è stato utilizzato l'YS agarizzato (Dye, 1968) (Acqua distillata, 1l; NH₄H₂PO₄, 0,5g; K₂HPO₄, 0,5g; MgSO₄ 7H₂O, 0,2g; NaCl, 5g; estratto di lievito, 5 g, agar, 12 g) diviso in due beute, in una di esse è stata addizionata la cisteina (0,1 g/l) e nell'altra il peptone (0,5 g/l). I due terreni sono stati distribuiti in tubi e sterilizzati e, dopo 24 h, i terreni sono stati inoculati per infissione. Una striscia di carta filtro imbevuta di una soluzione satura di acetato di piombo viene fissata a 2 cm di altezza sulla superficie dei tubi contenenti i due substrati. La formazione di H₂S è indicata, già dopo 48 h, dall'imbrunimento della carta.

✓ **Reazione al latte tornasolato**

Il terreno è costituito da latte scremato (0,3 % di grassi) addizionato con lo 0,004% di porpora di bromocresolo. Il terreno è stato distribuito in tubi e sterilizzato per tindalizzazione. Il substrato è stato inoculato con una piccola ansata di crescita batterica e incubato a 27° C. Il viraggio del colore dal bianco-crema al blu indica l'alcalinizzazione del mezzo; il viraggio al rosso indica l'acidificazione.

✓ **Test dell'indolo**

Il terreno base è costituito da: Triptone, 10 g; NaCl, 5 g e acqua distillata messo in tubi e autoclavato. Nel frattempo si preparano delle strisce di carta da filtro e si immergono in una soluzione satura di acido ossalico. Dopo 24 ore il terreno viene inoculato e una striscia di carta filtro viene posta all'interno dei tubi sospesa a circa 3 cm sul terreno. La presenza di indolo è indicata dalla colorazione rosa assunta dalla strisce di carta.

✓ **Accumulo di poli-β-idrossibutirrato (PHB).**

È stata seguita la procedura indicata da Denny e Hayward (2001). Il terreno utilizzato è costituito da Agar Nutriente al quale viene aggiunto in quantità di 5g/l DL- β-idrossibutirrato di sodio. I batteri sono stati fatti crescere per 24-48 h prima di essere testati per l'accumulo del PHB. La procedura per seguita per il test è la seguente: mettere una goccia di sospensione batterica su vetrino, asciugare all'aria e poi fissare col calore. Inondare il vetrino con la soluzione di Sudan Black B (0,3 g in 100 ml di etanolo al 70%) e lasciare agire per 10-15 minuti. Eliminare l'eccesso di soluzione e schiarire il vetrino con xilolo. Risciacquare il vetrino e controcolorare con safranina (soluzione acquosa allo 0,5%) per 5-10 secondi. Lavare con acqua e osservare al microscopio con obiettivo ad immersione. Le cellule che hanno accumulato granuli di PHB presentano dei corpuscoli scuri o blu-neri di forma ovoidale.

✓ **Degradazione del pectato su Crystal Violet-pectate (CVP) medium**

Il substrato di base utilizzato è quello di Ayers *et al.* (1919) costituito da: acqua distillata sterile, 500 ml; soluzione acquosa di cristal violetto allo 0,07% (w/v), 1ml; NaOH 1 N, 4,5 ml; soluzione acquosa di CaCl₂ 2H₂O al 10%, 3 ml; Agar Difco, 2 g; NNO₃, 1g; Sodio polipectato, 9g.

✓ **Tolleranza al NaCl al 4%**

Al brodo nutriente è stato aggiunto il 4% di NaCl. Il substrato è stato distribuito in tubi e sterilizzato. Una piccola ansata di crescita batterica è stata sospesa nel liquido e i tubi sono stati incubati a 25°C per 5 giorni. La torbidità del substrato è indice di crescita e di tolleranza del NaCl.

✓ **Utilizzazione delle fonti di carbonio.**

a) metodo tradizionale

Il substrato di base utilizzato è quello di Ayers, Rupp e Johnson costituito da acqua distillata, 1000 ml; NH₄H₂PO₄, 1 g; KCl, 0,2 g; MgSO₄ x 7H₂O, 0,2 g; agar, 12 g e addizionato dello 0,00016% (w/v) di porpora di bromocresolo. Il substrato è stato sterilizzato a 121°C e dopo raffreddamento a 50°C sono state aggiunte le soluzioni delle fonti di carbonio, sterilizzata per filtrazione, alle concentrazioni dello 0,5% (p/v);

I tests positivi sono stati tenuti sotto osservazione per 7 giorni mentre quelli negativi per 2 settimane.

b) Biolog System

Il test è stato eseguito utilizzando le MicroPlate GN adatte per identificare batteri fitopatogeni Gram-negativi. Si basa sull'utilizzo o meno di 95 fonti di carbonio (alcoli, zuccheri, acidi organici e amminoacidi). L'utilizzazione di una fonte di carbonio è indicata da una reazione colorimetrica data dal tetrazolium violetto che viene utilizzato come colorante redox per visualizzare l'aumento di respirazione dei batteri. La colorazione viene misurata con uno spettrofotometro alle lunghezze d'onda di 590 e 750 nm.

Dall'utilizzo o meno delle differenti fonti di carbonio, si ottiene un *pattern* che viene chiamato "*metabolic fingerprint*" dell'organismo (Jones *et al.*, 1993).

Il "*metabolic fingerprint*" si sviluppa a partire da 4 ore dopo l'inoculo e, a fine prova, l'automazione della tecnica consente, in pochi secondi, la lettura e la registrazione dei risultati. Un software compensa automaticamente per le diverse intensità di colore/torbidità, eliminando il problema della soggettività di interpretazione visuale. Ai fini dell'identificazione finale i profili ottenuti sono comparati con un ampio database (http://www.biolog.com/mID_bacteriaid.htm).

La capacità di interfacciare il sistema micropiastra con un database contenente un gran numero di *patterns* fornisce un grande vantaggio per la velocità nell'identificazione (Jones *et al.*, 1993).

Al fine di poter analizzare anche gli isolati di *P. coryli*, specie non presente nel *database* Biolog GN versione 6.01, è stata eseguita la procedura di aggiornamento. Questo è stato fatto inserendo, replicato per due volte, il profilo di 3 ceppi noti di *P. coryli*. Gli isolati sono stati strisciati su agar BUG ed incubati a 30°C per 24 ore. Trascorso il periodo di incubazione una aliquota di crescita batterica di ciascun isolato è stata disciolta in 20 ml di soluzione fisiologica (Biolog inoculating fluid GN/GP) fino ad ottenere, alla una lunghezza d'onda di 590 nm, una densità ottica di 0,52, corrispondente ad una concentrazione di circa 10^8 u.f.c./ml. La sospensione batterica è stata distribuita nelle piastre GN in quantità di 150 µl per pozzetto ed incubata a 28°C. Il grado di colorazione dei singoli pozzetti è stato determinato ogni 12 ore attraverso scansione spettrofotometrica a 590 nm e 750 nm. Al raggiungimento del punto di utilizzazione finale (end point) le matrici ottenute sono state utilizzate per l'aggiornamento del database.

Per l'identificazione i nostri isolati sono stati incubati su terreno di coltura BUG per 24 ore a 30°C, secondo quanto indicato dalla Biolog per batteri aerobi, Gram negativi, ossidasi negativi e non enterici. Le crescite batteriche sono state prelevate dalle piastre con tamponi di cotone sterili, sospesi in soluzione salina sterile (0,85% NaCl) (fluido di inoculazione GN/GP) fino a raggiungere il livello di torbidità del 52% di trasmittanza misurata con uno spettrofotometro a 590 nm. In ciascun pozzetto delle MicroPlate Biolog sono stati dispensati 150 µl di tale sospensione e le piastre sono state incubate per 20 h (il tempo di incubazione indicato per i nostri scopi era di 16-18 h) a 28°C. Le micropiastre sono state lette alla lunghezza d'onda di 590 e 750 nm utilizzando il Biolog MicroStationTM Reader. Al fine di identificare ciascun isolato, i risultati sono stati confrontati con il database Biolog GN versione 6.01.

Ai fini delle nostre analisi sono state considerate positive le letture pari ad almeno 0,5 di assorbanza.

Per gli isolati del Tipo 3 è stata eseguita un'analisi cluster al fine di confrontare i profili con quello di *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* presente in banca dati. Il dendrogramma è stato realizzato con il metodo cluster "Group Average" utilizzando il software StatistiXL (componente aggiuntiva di Microsoft Excel).

3.5.3 Caratterizzazione sierologia

La caratterizzazione sierologica è stata eseguita per gli isolati del Tipo 2.

Gli isolati sono stati sottoposti all'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) diretta (Clark e Adams, 1977; Clark, 1981) e all'ELISA indiretta seguendo la metodica fornita dalla ditta Phlorilab, Italia.

Nell'ELISA diretta è stato utilizzato un antisiero al *P. syringae* pv. *syringae* van Hall, NCPPB 381; nell'ELISA indiretta è stato utilizzato un antisiero al *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* seguendo la metodica proposta dalla casa fornitrice Phlorilab, Italia.

Come ceppi di confronto sono stati utilizzati: il ceppo tipo *P. s.* pv. *syringae* NCPPB 281, i ceppi di *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* CFBP 1390 e 3634 e di *P. avellanae* ISF 2059.

I valori di assorbanza sono stati letti con un lettore fotometrico (Gio. DE VITA, GDV, Roma, Italia, Mod. DV990BV4). Le letture sono state considerate positive quando il valore dell'assorbanza è stato 2,5 volte più alto rispetto a quello ottenuto con il bianco.

3.5.4 Caratterizzazione molecolare

Ad analisi molecolare sono stati sottoposti gli isolati del Tipo 2 e del Tipo 3.

a) *SyrB* (Sorensen *et al.*, 1998)

Per accertare la presenza del gene *syrB* il DNA degli isolati in esame è stato sottoposto alla metodica di PCR utilizzando la seguente coppia di primers: *syrB1*: 5'-CTT TCC GTG GTC TTG ATG AGG-3' e *syrB2*: 5'-TCG ATT TTG CCG TGA TGA GTC-3' (Eurogentec, Seraing, Belgio). Questi primers permettono l'amplificazione di una regione di 752 bp, corrispondente al gene *syrB*, gene implicato nella produzione della siringomicina fattore di virulenza specifico di *P. s.* pv. *syringae*.

Il saggio è stato realizzato in 100 µl di volume di reazione contenenti i dNTPs (200 µM), i due primers (0.5 µM ciascuno), la Taq DNA Polimerasi (0.025 U/µl), il relativo buffer (1x), MgCl₂ (1.5 mM) e circa 100 ng di DNA ottenuto per bollitura di sospensioni batteriche (*boiling prep*). Il *boiling prep* è stato ottenuto sottoponendo le sospensioni batteriche a bollitura per 10 minuti; i campioni sono stati posti in ghiaccio per 5 minuti; centrifugati a 12000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente; da ciascuna provetta sono stati recuperati 100 µl del surnatante e come template della PCR sono stati utilizzati 3 µl del surnatante mentre il restante DNA è stato conservato a -20°C).

Il programma di amplificazione è stato eseguito come segue:

un ciclo di denaturazione (94°C per 5'); 35 cicli di denaturazione (94°C per 1' 30''), *annealing* (60°C per 1' 30'') ed *elongation* (72°C per 3'); un ciclo finale di *elongation* (72°C per 10').

Gli ampliconi sono stati visualizzati e valutati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio.

b) Rep-PCR

Come templatato è stato utilizzato il DNA “*boiling prep*” ottenuto per bollitura delle sospensioni batteriche come sopra descritto.

Il mix di reazione è stato preparato in un volume finale di 25 µl. Le concentrazioni finali dei componenti del mix di reazione sono le seguenti:

- Taq DNA Polimeasi: 1 U
- Buffer: 1 x
- MgCl₂: 2 mM
- dNTPs: 200 µM
- Primers: 60 pmoli (2.4 µM)

A questa mix di reazione sono stati aggiunti 3 µl di templatato (DNA estratto per bollitura) e H₂O distillata sterile fino al volume finale di 25 µl.

Per la BOX-PCR è stato usato il seguente primer:

BOXA1R: 5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3' (Eurogentec, Belgio)

Il ciclo di reazione utilizzato è il seguente:

5'	95 °C	
1'	94 °C	
1'	53 °C (BOX) oppure 52 °C (ERIC)	} x 30
8'	65 °C	
15'	65 °C	

Come confronto sono stati utilizzati: il ceppo tipo di *P. avellanae*, BPIC 631, il ceppo laziale di *P. avellanae* ISF 2056, due ceppi di *P. s. pv. syringae* ISF AC 11 e AC 12, isolati da *Actinidia deliciosa* nel Lazio, il ceppo tipo *P. s. pv. syringae* CFBP 700, il ceppo tipo di *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* CFBP 1390 ed il ceppo CFBP 3634.

I risultati dell'amplificazione (sia per il *SyrB* che per la Rep-PCR) sono stati osservati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.5% in TAE 0,5x a 5 V/cm costanti per 2 h (Wide mini-sub cell gt Biorad).

Come marker è stato utilizzato il 100 bp ladder (Invitrogen) (0.5 µg/lane).

Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato immerso per 30' in una soluzione di bromuro di etidio (0,5 mg/ml), quindi osservato al transilluminatore e fotografato mediante sistema di acquisizione digitale (GelDoc 2000-Biorad).

Le bande visibili chiaramente sono state segnate e registrate. Le analisi statistiche per stimare la distanza genetica sono state eseguite utilizzando il software TREECON Windows (Van de Peer e De Wachter, 1994). I dendrogrammi sono stati creati utilizzando il metodo UPGMA *cluster*. Per validare il metodo è stato eseguito un bootstrap sui loci (1000 ripetizioni con reimmissione), per ottenere la percentuale di consistenza di ciascun nodo.

3.5.5 Analisi del profilo degli acidi grassi

L'analisi del profilo degli acidi grassi è stata eseguita presso il Central Science Laboratory del National Central of Plant Pathogenic Laboratory, Sand Hutton, York, United Kingdom. L'identificazione è stata fatta mediante confronto con la libreria TSBA40 contenente 860 profili di batteri aerobi di importanza ecologica, industriale, agricola e medica.

3.6 Prove di lotta

Sono state eseguite prove di lotta *in vivo* e *in vitro* nei confronti di alcuni degli agenti patogeni oggetto del presente studio.

E' stata saggiata la capacità di controllo di nove oli essenziali estratti da piante di *Artemisia arborescens*, *Bupleurum fruticosum*, *Foeniculum vulgare*, *Lavandula stoechas*, *Mentha pulegium*, *Myrtus communis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia desoleana* e *Thymus capitatus* coltivate in Sardegna e messi a disposizione dai "Produttori Sardi delle Piante Aromatiche ed Officinali delle Aree Rurali aderenti al Consorzio Officinerbe Sardinia", e cinque ceppi antagonisti (DPPSS T1, DPPSS T2, DPPSS T3, DPPSS T4 e DPPSS T5) isolati da radici di piante di timo.

La capacità di controllo degli oli essenziali e ceppi antagonisti è stata saggiata nei confronti di otto ceppi batterici: due del Tipo 1 (DPP 54I e DPP 51IIa), uno del Tipo 2 (DPPSS 48), quattro del tipo 3 (DPPSS 78, DPPSS 79, DPPSS 80, DPPSS 90) ed uno di *P. s. pv. coryli* ISPaVe 592 gentilmente fornito dal Dott. Scortichini del Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura (CRA, Roma).

Per l'identificazione gli antagonisti sono stati saggiati per la reazione di Gram, la formazione di endospore, l'ossidasi e l'analisi dei profili nutrizionali con il sistema computerizzato Biolog.

3.6.1 Prove *in vitro*

Preliminarmente, i nove oli essenziali sono stati saggiati su piastre di Nutrient Agar (NA) con il metodo della diffusione in agar. I ceppi batterici fitopatogeni sono stati strisciati su piastre di NA e posti in termostato a 25°C. Dopo 48 ore sono state preparate le sospensioni batteriche, contenenti 10^7 /cfu per ml circa, che servivano per insemnare il mezzo di coltura (100 µl per piastra) tenuto in bagno termostatico a 47°C. Dopo solidificazione, al centro di ciascuna piastra è stato posto un dischetto di carta bibula sterile (0,6 cm di diametro) saturato con l'olio da saggiare. Nei testimoni i dischetti sono stati imbevuti con acqua distillata sterile. Le piastre sono state trasferite in termostato a 25°C e, dopo 48 ore, è stato misurato il diametro dell'alone di inibizione formatosi. Ciascun ceppo è stato replicato cinque volte.

Analogamente si procedeva con i ceppi antagonisti. Al centro delle piastre, insemnate con 100 µl di sospensione batterica, è stato posto un dischetto di 0,6 cm di diametro prelevato con un fora tappi da una piastra di NA lasciata incubare per 48 ore con l'antagonista da saggiare.

Per valutare, per ciascun ceppo, la minima concentrazione batteriostatica ed eventualmente battericida, gli oli essenziali capaci di formare aloni di inibizione nelle prove preliminari, sono stati saggiati a concentrazioni crescenti (50, 100, 200, 400, 600 e 800 ppm). Essi, addizionati con 0,5% di Tween 20, sono stati aggiunti a provette (16 x 160) contenenti 5 ml di Nutrient Broth (NB) sterile. Ciascun tubo, addizionato di 100 µl delle sospensioni batteriche preparate come in precedenza, è stato incubato a 25°C. I testimoni erano costituiti da tubi contenenti NB e NB addizionati con 0,5% di Tween 20. La presenza o meno di crescita batterica nei tubi è stata esaminata dopo 48 ore. Per verificare la natura batteriostatica o battericida degli oli essenziali, dai tubi ove non era visibile sviluppo alcuno, sono stati prelevati 100 µl di NB e strisciati su piastre di NA. L'eventuale sviluppo è stato registrato dopo 72 ore.

3.6.2 Prove *in vivo*

La fitotossicità degli oli essenziali più efficaci (Finocchio, Menta, Mirto e Timo) è stata saggiata alla concentrazione di 800 ppm addizionati dell'1% di Tween 20 v/v su piantine di nocciolo, piantine di pomodoro e frutti di limone. Questi ultimi, prima di essere inoculati, sono stati disinfettati con una soluzione acquosa di varechina commerciale al 3% e ripetutamente risciacquati con acqua distillata sterile. Piantine e frutti inoculati mediante nebulizzazione sono stati protetti per 48 ore con buste di plastica e tenuti in laboratorio a

temperatura ambiente. Osservazioni giornaliere hanno permesso di registrare le eventuali reazioni di fitotossicità. I controlli (quattro piantine di nocciolo, quattro di pomodoro e quattro frutti di limone) sono stati inoculati per metà con acqua distillata sterile + Tween 20 all'1% v/v e per metà con sola acqua distillata sterile.

Gli antagonisti sono stati saggiati per la reazione di ipersensibilità su tabacco e per la patogenicità su piantine di nocciolo, pomodoro e frutti di limone seguendo le modalità su riportate. Per la prova di patogenicità, essi sono stati allevati su piastre di NA per 48 ore a 25°C, sospesi in acqua distillata sterile, portati ad una concentrazione di circa 10^7 cfu/ml e inoculati, mediante nebulizzazione, su piantine di nocciolo, di pomodoro e frutti di limone.

La capacità di controllo in infezioni sperimentali degli otto ceppi batterici da parte di oli e antagonisti è stata valutata *in vivo* su piantine di nocciolo allevate in vaso. Su frutti di limone è stata saggiata invece la capacità di controllo di quattro ceppi del Tipo 3.

Foglie e fusti erbacei di piantine di nocciolo (cinque per prova) sono state lesionate con un ago sterile e i siti feriti sono stati nebulizzati con:

- a) Controllo positivo - Sospensione batterica contenente circa 10^7 cfu/ml;
- b) Olio essenziale o l'antagonista cui seguiva il ceppo batterico;
- c) Controllo negativo - Olio essenziale + Tween 20 all'1% o il solo antagonista come controllo;
- d) Controllo negativo - acqua sterile + Tween 20 all'1% o sola acqua sterile.

Anche i frutti di limone (cinque per prova), sterilizzati come su riportato, sono stati lesionati con un ago sterile (per ciascun frutto sono state fatte otto ferite) e inoculati secondo lo schema su riportato con la variante che nei punti feriti sono state poste le gocce contenenti: a) la sospensione batterica; b) l'olio essenziale o l'antagonista cui seguiva la sospensione batterica; c) l'olio essenziale + Tween 20 all'1% o l'antagonista; d) l'acqua sterile + Tween 20 o acqua distillata sterile.

I reisolamenti sono stati effettuati su NA + 5% di saccarosio (NSA) e su KB dalle piante di nocciolo inoculate secondo le modalità a), b), c) e d) a tre mesi dalle inoculazioni.

4. Risultati

4.1 Quadri sintomatici

4.1.1 Tipo 1

La malattia presenta un quadro sintomatico caratterizzato, alla ripresa vegetativa, dalla mancata schiusa delle gemme e dalla presenza di cancri sui rami di un anno (Fig. 1a); i giovani germogli mostrano tacche brune e apici avvizziti (Fig. 1b); le bratte e il pericarpo dei giovani frutti presenta macchie ellittiche iperidriche tendenti al bruno, che in seguito necrotizzano (Fig. 1c e 1d); i lembi delle giovani foglie macchie angolari iperidriche (Fig. 1e) a volte circondate da un alone clorotico; i piccioli fogliari possono necrotizzare e la loro morte può causare filloptosi; Infine, sui rami e sul tronco si osserva la presenza di cancri (Fig. 1f).

Sintomi come quelli descritti sono stati osservati sia nelle cultivars importate, “Tonda gentile delle Langhe” e “Tonda gentile romana”, che nelle varietà locali “nocciole sarde”.



Figura 1. Quadro sintomatico Tipo 1. **a**, cancro su ramo di un anno; **b**, germoglio avvizzito; **c**, lesioni necrotiche sulle bratte; **d**, macchie necrotiche su giovane frutto **e**, macchie angolari iperidriche su foglia; **f**, cancro sul tronco.

4.1.2 Tipo 2

Alla ripresa vegetativa le piante mostrano necrosi apicale dei germogli; nei fusticini sono presenti aree allungate, depresse, colore marrone che evolvono in cancreti (Fig. 2a e 2b). Con la lignificazione dei fusti, si ha la cicatrizzazione dei tessuti e la chiusura delle lesioni (Fig. 2c e 2d). Sezioni longitudinali (Fig. 2e) dei fusti sintomatici mettono in evidenza un imbrunimento del legno sottostante. Sulle foglie i sintomi interessano le nervature principali e secondarie (Fig. 2f). Esse sono prima marrone chiaro e poi imbruniscono. L'esame al microscopio stereoscopico evidenziava la presenza di spaccature longitudinali. Occasionalmente è stato osservato un sintomo aspecifico: branche e fusti appaiono bagnati per la presenza di essudati (Fig. 2g).

Il quadro sintomatico è stato osservato prevalentemente sulla cultivar importata dal Piemonte "Tonda gentile delle Langhe" mentre sembra che le cultivars locali non siano particolarmente sensibili alla malattia.

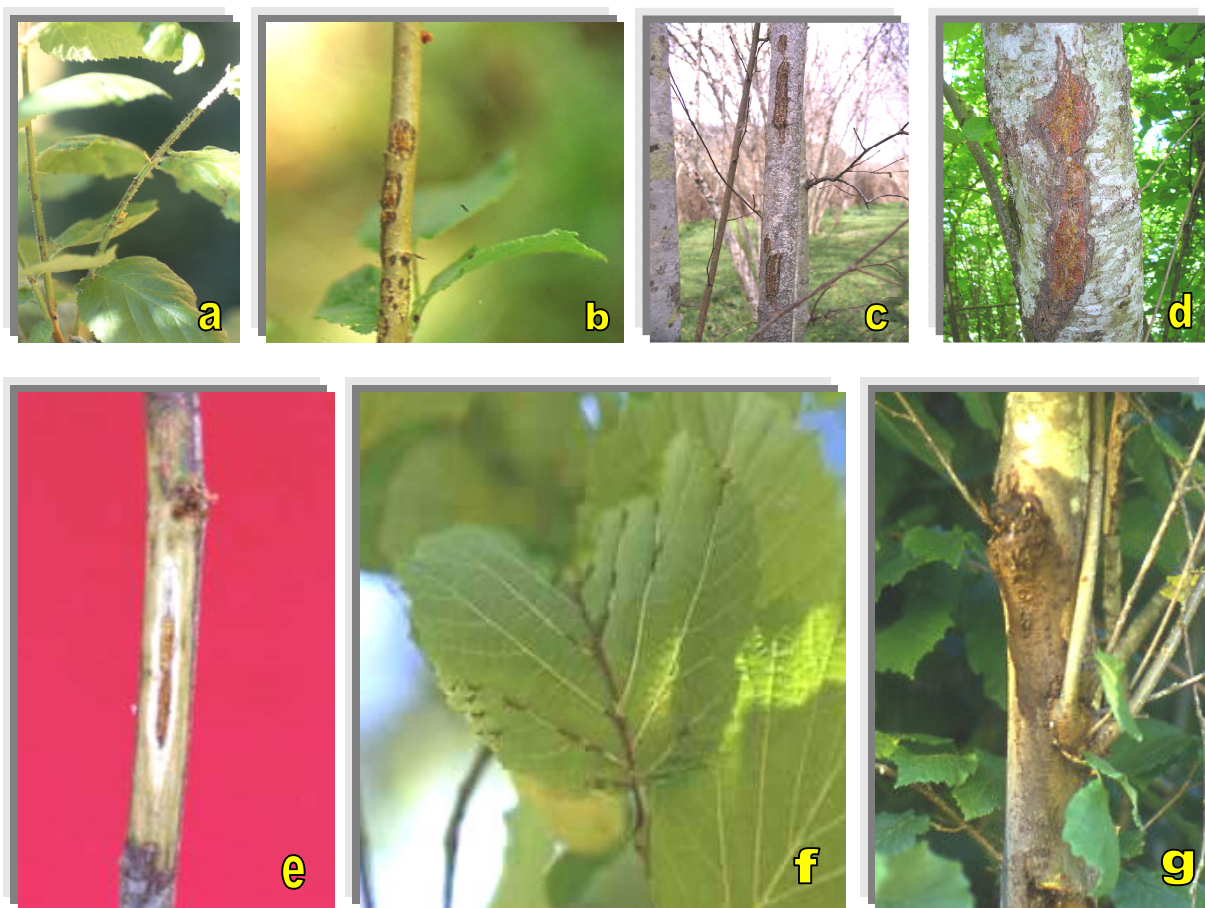


Figura 2. Quadro sintomatico Tipo 2. **a**, tacche brune su giovane germoglio; **b**, cancreti sui rametti; **c** ed **d**, cancri sui fusti; **e**, sezione longitudinale del fusto; **f**, necrosi delle nervature fogliari; **g**, essudati sul fusto.

4.1.3 Tipo 3

Alla ripresa vegetativa, le piante mostrano, inizialmente, la mancata schiusa delle gemme; quelle che si schiudono danno origine a germogli a sviluppo stentato (Fig. 3a) che, in breve tempo, prima avvizziscono (Fig. 3b) e poi necrotizzano (Fig. 3c). Le foglie dei germogli infetti hanno, inizialmente, uno sviluppo normale, poi improvvisamente avvizziscono e infine si ha la loro morte. Ciò viene evidenziato dal cambiamento di colore che da verde diventava marrone. Tale aspetto sintomatico contrasta con il verde presentato dagli organi sani. Inoltre, le foglie morte rimangono attaccate ai rami sino all'autunno. L'avvizzimento e la necrosi interessa anche rami e branche: essi, inizialmente, avvizziscono poi necrotizzano ed il seccume finisce per interessare l'intero organo (Fig. 3d)

Il quadro sintomatico sopra descritto è stato osservato sia sulla cultivar "Tonda gentile delle Langhe" ove, in qualche caso, il batterio risulta letale, sia sulle cultivars "Tonda gentile romana", "Tonda di Giffoni" e nelle varietà locali.



Figura 3. Quadro sintomatico Tipo 3. **a**, sviluppo stentato dei germogli; **b**, germoglio avvizzito; **c**, germoglio necrotizzato; **d**, avvizzimento di rami e branche.

4.2 Isolamento degli agenti patogeni e caratterizzazione

4.2.1 Tipo 1

a) Isolamento

Gli isolamenti effettuati su NA dal materiale vegetale prelevato durante i sopralluoghi, hanno prodotto, dopo tre giorni, numerose colonie giallastre.

Complessivamente sono stati isolati 11 ceppi. Infiltrati su foglie di tabacco, nove (Tab. 1) sono stati capaci di indurre, dopo 24 ore, la tipica reazione di ipersensibilità. Questi ultimi sono stati ulteriormente purificati mediante successivi passaggi su NA e conservate in tubi di Brodo Nutriente (Oxoid, CM0001) a 4°C per i successivi saggi di caratterizzazione.

Isolato	Comune	Località	Sintomo
DPP 54 I	Tonara	Fontana 'e cresia	Germoglio avvizzito
DPP 51 II a	Tonara	Illazzò	Cancretti su germoglio di 1 anno
DPP 58 a	Tonara	Fontana 'e cresia	Cancretti su ramo di 1 anno
DPP 51 I	Tonara	Illazzò	Cancretti su germoglio
DPP 55	Tonara	Fontana 'e cresia	Cancretti su germoglio
DPP 16	Tiana	Tinozzo	Giovane getto avvizzito
DPP G1	Belvì	Campo Giorgi	Cancretti su ramo di 1 anno
DPP G2	Belvì	Campo Giorgi	Cancretti su picciolo fogliare
DPP G4	Belvì	Campo Giorgi	Maculture angolari iperidriche su foglie

b) Prove di patogenicità

I nove isolati sono risultati patogeni su nocciolo, basilico e pomodoro. In particolare sulle piantine di nocciolo inoculate per ferita si aveva inizialmente, intorno al punto d'inoculo, la comparsa di un'area bruna. In breve tempo essa si approfondiva e, dopo circa 20 giorni, si fendeva e metteva a nudo il tessuto legnoso sottostante (Fig 4a). Su basilico e pomodoro i tessuti intorno al punto d'inoculo viravano al marrone; successivamente i batteri si approfondivano e colonizzavano i vasi determinando un loro imbrunimento (Figg. 4b e 4c). Su frutti di limone gli isolati non sono risultati patogeni (Fig. 4d).

Le piante testimoni, sia quelle inoculate con acqua distillata sterile che quelle non inoculate, non hanno mostrato alcun sintomo.

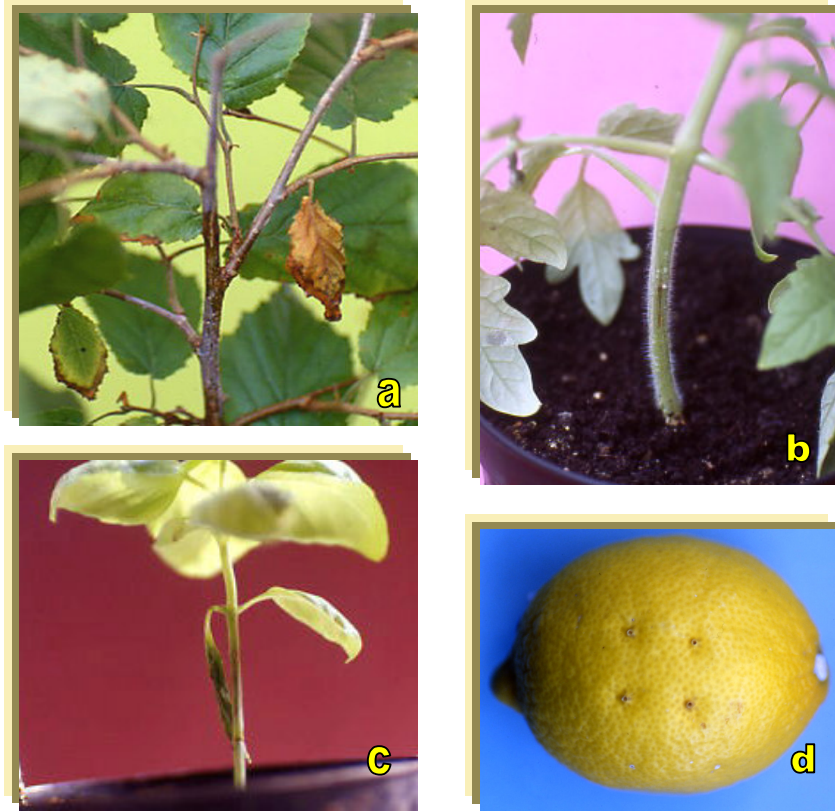


Figura 4. Infezioni sperimentali. **a**, nocciolo; **b**, pomodoro; **c**, basilico; **d**, limone.

c) Aspetti morfologici

Su NA dopo tre giorni le colonie appaiono, a margine intero, mucoidi, gialle del diametro medio di 2-3 mm.

Su YDC, dopo due giorni, le colonie si presentavano di forma circolare, consistenza mucoida, a margine intero, leggermente rilevate con superficie liscia, di colore giallo-arancio intenso e di diametro medio di 3-4 mm (Fig. 5a).

Su terreno SQ si osserva attorno alla crescita batterica la tipica diffusione di pigmento verde scuro (Fig. 5b).

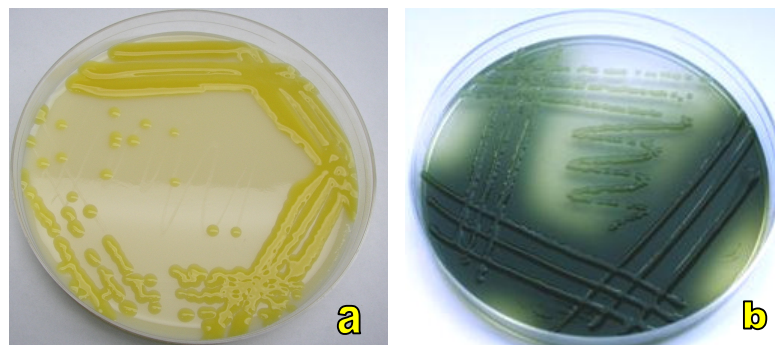


Figura 5. Crescita delle colonie del Tipo 1 su YDC (a) e SQ (b).

Al microscopio elettronico le cellule degli isolati si presentano di forma bastoncellare con estremità arrotondate, generalmente isolate, mobili per la presenza di 1 flagello polare (Fig. 6) e di dimensioni medie di circa 1,46 x 0,6 µm.

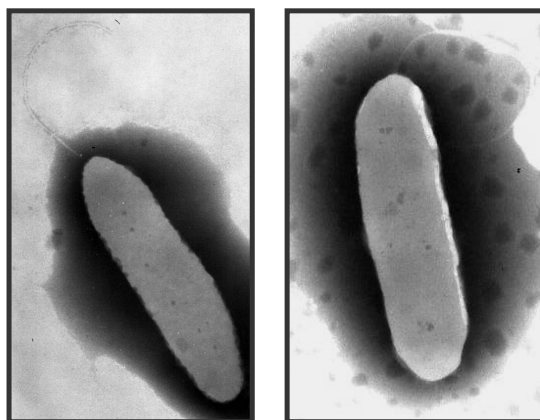


Figura 6. Cellule batteriche del Tipo 1.

d) Caratteri fisiologici e biochimici

I 9 isolati sono Gram-negativi e catalasi positivi; i risultati dei principali saggi fisiologici e biochimici e di quelli relativi all'utilizzazione delle fonti di carbonio su terreno di Ayers *et al.* (1919) sono riportati nelle tabelle 2 e 3.

Tabella 2. Caratteristiche degli isolati del Tipo 1 a confronto con <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> (X.a.c.).										
Test	ISOLATI									
	54 I	51 II a	58 a	51 I	16	55	G1	G2	G4	X. a. c.
Ossidasi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ²
Catalasi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ¹
Arginina deidrolasi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Nd
Idrolisi di :										
amido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ²
arbutina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	Nd
esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ²
gelatina	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+ ¹
tirosina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ¹
Lipolisi del tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ⁴
Riduzione dei nitrati	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ¹
Tolleranza TTC 0,1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ³
Produzione H ₂ S da peptone	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ¹
Produzione di H ₂ S da cisteina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ¹
Metabolismo del glucosio	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox ³
Latte tornasolato	alc	alc	alc	alc	alc	alc	alc	alc	alc	alc ¹
Produzione di indolo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ¹
Produzione di ureasi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ⁴
Temperatura massima di crescita	37° C	37° C	37° C	37° C	37° C	37° C	37° C	37° C	37° C	37° C

¹dati Bradbury (1987); ²dati OEPP/EPPO (2004); ³dati Lelliott e Stead (1987); ⁴dati Scortichini e Rossi (1991).
+ = esito positivo; - = esito negativo; ox = metabolismo ossidativi; Nd = non determinato; alc=alcalinizzazione.

Tabella 3. Utilizzazione di fonti di carbonio degli isolati del Tipo 1 a confronto con <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> (X.a.c.).										
Fonte di carbonio	ISOLATI									
	54 I	51 II a	58 a	51 I	16	55	G1	G2	G4	X. a. c.
Adonitolo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ¹
Glicerolo	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A ¹
D-Mannitolo	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A ¹
D-Sorbitolo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ¹
Sodio lattato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ¹
L(+) tartrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ¹
l-Arabinosio	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A ¹
Fruttosio	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A ¹
Galattosio	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A ¹
Glucosio	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A ¹
Maltosio	A	A	A	A	+	A	A	A	A	A ¹
Trealosio	A	A	A	A	A	A	A	A	A	+ ²
α -metil-D-glucoside	+	+	+	+	+	+	A	+	+	+ ¹
Inulina	+	+	+	+	+	+	A	+	+	+ ¹
Salicina	+	+	+	+	+	+	A	+	+	+ ¹

¹ dati Bradbury (1987); ² dati OEPP/EPPO (2004).
A = cresce e acidifica; + = cresce ma non acidifica; - = non cresce.

In base ai risultati ottenuti gli isolati del Tipo 1 sono stati ascritti a *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*.

Anche i risultati dell'analisi effettuata col sistema computerizzato Biolog ha confermato l'identificazione dei nostri isolati (Tab. 4 e Fig. 7). Di seguito vengono riportate le fonti di carbonio utilizzate dagli isolati del Tipo 1 su micropiastre Biolog e la percentuale di isolati che ha utilizzato ciascuna fonte.

Tabella 4. Utilizzazione delle fonti di carbonio su micropiastre Biolog			
Fonte di carbonio	% isolati	Fonte di carbonio	% isolati
Acido metil estere piruvico	100,00	Acido Succinico	55,56
D-Fruttosio	88,89	Acido L-Glutamico	55,56
α -D-Glucosio	88,89	D-Cellobiosio	44,44
D-Mannosio	88,89	D-Trealosio	44,44
Saccarosio	88,89	L-Alaninamide	44,44
Acido α -Keto Glutarico	88,89	Glicogeno	33,33
Acido mono metil estere succinico	77,78	D-Galattosio	33,33
Acido Bromosuccinico	77,78	Acido Cis-Aconitico	22,22
Destrina	66,67	Glicerolo	22,22
N-Acetil-D-Glucosamina	55,56	Maltosio	11,11

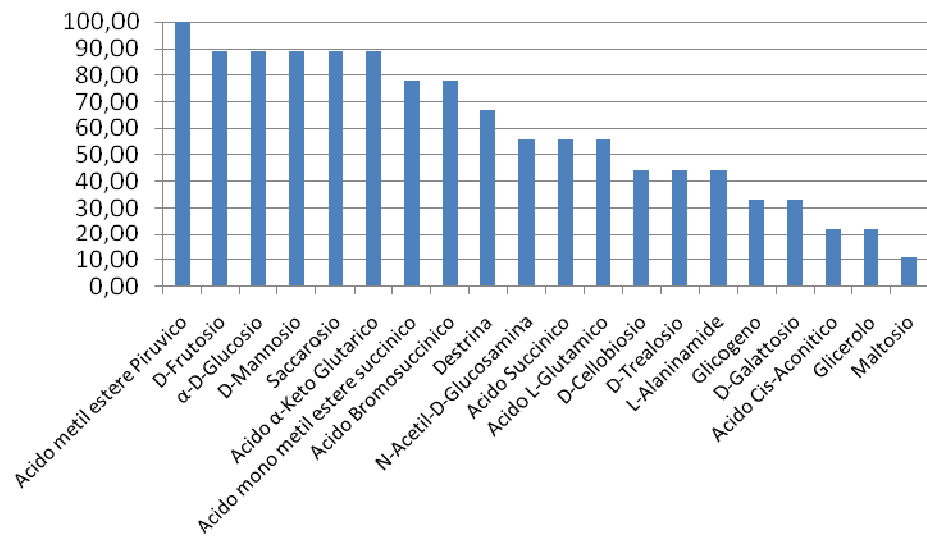


Figura 7. Istogramma delle fonti di carbonio utilizzate dagli isolati del Tipo 1 su micropiastre Biolog.

4.2.2 Tipo 2

a) Isolamenti

Dopo tre giorni di incubazione gli isolamenti effettuati hanno prodotto su KB numerose colonie verdastre che, sotto luce ultravioletta, appaiono fluorescenti.

In base a questa caratteristica e alla capacità di provocare la reazione di ipersensibilità su foglie di tabacco, nel triennio 2004-2006 sono stati selezionati 21 isolati (Tab. 5). Essi, dopo un'ulteriore passaggio su NA, sono stati conservati su BN (Oxoid CM0001) a 4°C per i saggi di caratterizzazione.

Tabella 5. Isolati batterici da materiale sintomatico del Tipo 2.		
Isolato	Isolato	Isolato
DPP48	DPP75	DPP83
DPP51	DPP77	DPP84
DPP52e	DPP63 ₁₋₂	DPP91
DPP38 ₁	DPP63 ₂	DPP92
DPP49	DPP66 ₇	DPP93
DPP67	DPP 66 ₈	DPP94
DPP73	DPP81	DPP95

b) Prove di patogenicità

In base ai risultati ottenuti i 21 isolati sono risultati patogeni su piantine di nocciolo, pero, fagiolo, peperone, pomodoro (Fig. 8d), basilico (Fig. 8c) e zucchini. In particolare, sui fusticini di nocciolo sono comparse intorno ai punti lesi aree inizialmente brune; tali aree si sono estese, in seguito, sopra e sotto le lesioni; infine esse si allargavano a formare i cancri (Fig. 8a). Sotto i tessuti corticali i vasi apparivano anneriti in senso longitudinale. Col tempo, la necrosi si estendeva e i rametti progressivamente avvizzivano (Fig. 8b). Le osservazioni si sono protratte per un anno e hanno messo in evidenza il lento progredire della malattia.

Su baccelli di fagiolo (Fig. 8e) e foglie di lillà, invece, gli isolati hanno prodotto una tipica reazione di ipersensibilità.

La reazione di patogenicità era negativa su albicocco, pesco, noce, melo e frutti limone. In particolare sui frutti di limone gli isolati hanno determinato dopo 4-5 giorni, intorno ai punti d'inoculo, aree brune di estensione limitata (Fig. 8f). Nei giorni successivi il sintomo si bloccava e l'asportazione della buccia indicava che l'imbrunimento era solo superficiale segno che i batteri erano incapaci di approfondirsi nei tessuti.

Le piante testimoni, sia quelle inoculate con acqua distillata sterile o che quelle non inoculate, non hanno mostrato alcun sintomo.

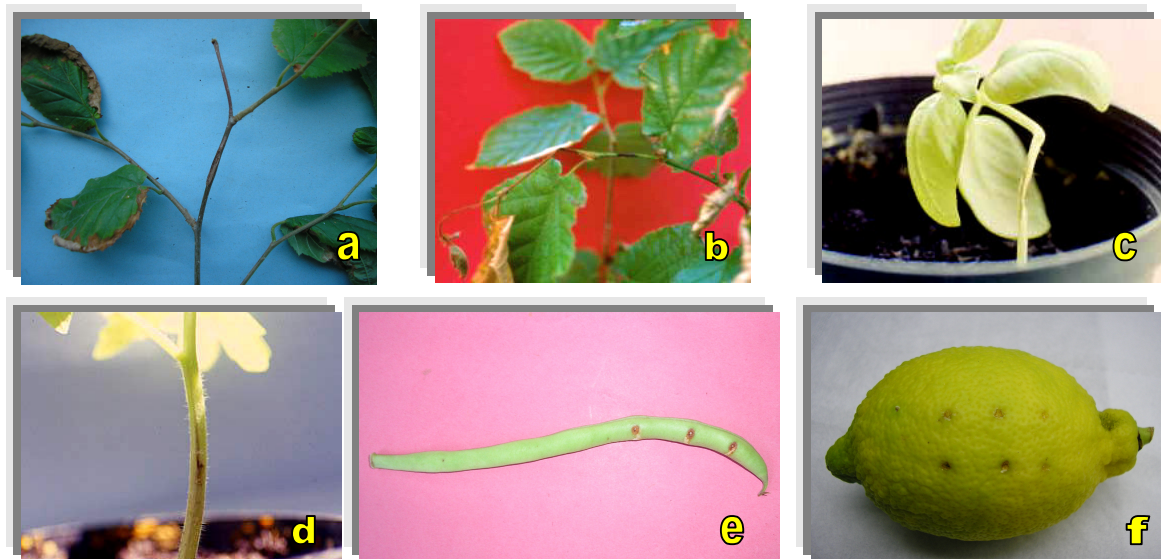


Figura 8. Infezioni sperimentali su: **a e b**, nocciolo; **c**, basilico; **d**, pomodoro; **e**, baccello di fagiolo; **f**, frutto di limone.

c) Aspetti morfologici

Al microscopio elettronico le cellule batteriche sono bastoncellari, con estremità arrotondate, generalmente isolate, esternamente sono avvolte da un caratteristico strato polisaccaridico, mobili per la presenza di 1-3 flagelli polari (Fig. 9) e di dimensioni medie di $1,6 \times 0,8 \mu\text{m}$.

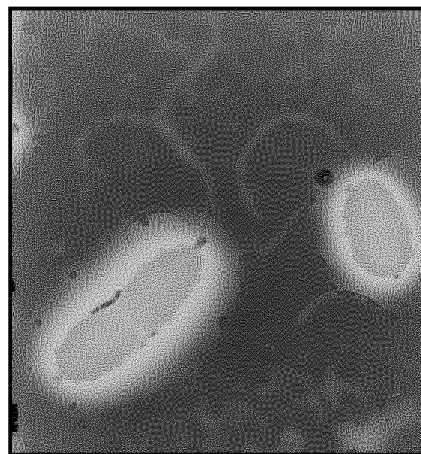


Figura 9. Cellule batteriche del Tipo 2 osservate al microscopio elettronico.

d) Caratteri fisiologici e biochimici

I batteri sono Gram negativi e catalasi positivi. I risultati dei saggi fisiologici e biochimici sono riportati in tabelle 6.

	Tipo 2	<i>Ps. s. pv. coryli</i> ¹		Tipo 2	<i>Ps. s. pv. coryli</i> ¹
Levano su NSA	+	+	Produzione di acido da saccarosio	+	N.D.
Ossidasi	-	-	Reazione al latte tornasolato	+	N.D.
Marciume su patata	-	-	Idrolisi di : amido	-	-
Arginina deidrolasi	-	-	arbutina	+	+
Ipersensibilità su tabacco	+	+	esculina	+	+
Test della catalasi	+	N.D.	Metabolismo del glucosio	ox	ox
Fluorescenza su mezzo KB	+	+	Tolleranza NaCl 4%	+	N.D.
Poli-β-idrossibutirrato	-	-	Tolleranza TTC 0,1%	+	+
Liquefazione del pectato (CVP)	-	-	Tolleranza TTC 0,02%	+	N.D.
Ureasi	+	N.D.	Temperatura massima di crescita (°C)	35	35

¹Dati Scortichini *et al.*, 2005
 + = esito positivo; - = esito negativo; ox = metabolismo ossidativo; N.D. = non determinato

In base ai risultati dei saggi LOPAT (+ - - +) essi appartengono al gruppo Ia *sensu* Lelliott *et al* (1966). In tabella 7 viene riportata la variabilità degli isolati in test secondari.

Isolati	Riduzione nitrati	2-chetogluconato	Tween 80	gelatina	tirosina
DPP81	-	+	+	-	-
DPP83	-	+	+	+	+
DPP84	-	-	+	+	+
DPP91	-	+	+	+	+
DPP92	N.D.	+	+	-	+/-
DPP93	-	N.D.	+	-	+
DPP94	-	+	+	+	-
DPP95	Riduce a NO ₂	N.D.	-	-	+
DPP 38 ₁	-	-	-	-	+/-
DPP 49	-	-	-	+	+/-
DPP 63 _{1,2}	-	+	-	-	-
DPP 63 ₂	-	+	-	-	-
DPP66 ₇	Riduce a N	-	-	-	-
DPP 66 ₈	-	-	-	+	+/-
DPP 67	-	-	-	+	+/-
DPP 73	-	-	-	-	+/-
DPP 75	-	+	-	+	+/-
DPP 77	Riduce a NO ₂	+	-	+	+/-
<i>P. s. pv. coryli</i> ¹	-	+	-	-	+

¹Dati Scortichini *et al.*, 2005
 + = esito positivo; - = esito negativo; +/- = esito incerto; ox = metabolismo ossidativo; N.D. = non determinato

La tabella 8 riporta l'utilizzazioni delle fonti di carbonio sul mezzo di Ayers *et al.* (1919) a confronto con le utilizzazioni di *P. s. pv. coryli*.

Tabella 8. Utilizzazione delle fonti di carbonio degli isolati del Tipo 2					
Fonti di C	Tipo 2	<i>P. s. pv. coryli</i> ¹	Fonti di C	Tipo 2	<i>P. s. pv. coryli</i> ¹
Adenina	-	n.d.	Eritritolo	+	-
Amigdalina	-	n.d.	Glicerolo	+	n.d.
Arbutina	-	n.d.	Inositolo	+	n.d.
Salicina	-	n.d.	D-Mannitolo	+	+
Treonina	-	n.d.	Meso eritritolo	+	n.d.
D-arabinosio	-	n.d.	Myo-inositolo	+	+
Cellobiosio	-	n.d.	Sorbitolo	+	+
D-Lattosio	-	n.d.	Ac citrico	+	n.d.
D-Raffinosio	-	n.d.	Ac. fumarico	+	n.d.
L-Ramnosio	-	n.d.	Ac. Succinico	+	n.d.
Sorbosio	-	n.d.	Sodio gluconato	+	n.d.
Adonitolo	-	-	Ac.Malonico	+	n.d.
L-Arabitolo	-	n.d.	Alanina	V	n.d.
Ac. salicinic	-	n.d.	Glicina	V	n.d.
Ac adipico	-	n.d.	Inulina	V	n.d.
Ac. nicotinico	-	n.d.	Maltosio	V	n.d.
Ac. Benzoico	-	n.d.	Melibiosio	V	n.d.
Ac. L-tartarico	-	-	Palatinosio	V	n.d.
Ac. DL- tartarico	-	-	Trealosio	V	n.d.
Arginina	+	n.d.	Dulcitol	V	n.d.
Istidina	+	n.d.	Ac. malico	V	n.d.
Tirosina	+	n.d.	Ac. maleico	V	n.d.
Glutammina	+	n.d.	Sodio molibdato	V	n.d.
D-Fruuttosio	+	n.d.	Glicollato	V	n.d.
D-Galattosio	+	n.d.	Ac.levulinico	V	n.d.
D-Glucosio	+	n.d.	Ac.ossalico	V	n.d.
D-Mannosio	+	n.d.	Tartrato di sodio	V	n.d.
D-Xilosio	+	n.d.	Propionato di Na	V	n.d.
L-Arabinosio	+	n.d.	Sodio lattato	V	n.d.
Saccarosio	+	n.d.			

¹ Dati Scortichini *et al.*, 2005
+ = esito positivo; - = esito negativo; V= variabilità tra gli isolati; N.D. = non determinato

Per 8 isolati in studio, l'utilizzazione delle fonti di carbonio è stata valutata anche con il sistema computerizzato Biolog. A confronto con i profili contenuti nel database Biolog GN versione 6.01, in seguito al nostro aggiornamento, tutti gli isolati sono stati identificati come *P. s. pv. coryli* (Tab. 9).

Isolato	ID	Probabilità	Similarità
DPP 81	<i>P. syringae pv. coryli</i>	85%	0,609
DPP 83	<i>P. syringae pv. coryli</i>	99%	0,998
DPP 84	<i>P. syringae pv. coryli</i>	-	0,42
DPP 91	<i>P. syringae pv. coryli</i>	99%	0,96
DPP 92	<i>P. syringae pv. coryli</i>	99%	0,688
DPP 93	<i>P. syringae pv. coryli</i>	79%	0,693
DPP 94	<i>P. syringae pv. coryli</i>	95%	0,686
DPP 95	<i>P. syringae pv. coryli</i>	-	0,492

Risultati dell'utilizzazione delle fonti di carbonio nel test Biolog sono riportati in Tabella 10.

Fonte di carbonio	% isolati	Fonte di carbonio	% isolati
L-Arabinosio	100	Acido D-glucosaminico	62,5
L-Asparagina	100	Acido Piruvico Metil Estere	62,5
L-Acido Aspartico	100	Acido lattone D-galattanico	62,5
Acido citrico	100	L-Prolina	50
Acido L-glutamico	100	Inosina	50
α -D-Glucosio	87,5	D-Alanina	50
Acido Cis-asconitico	87,5	D-Fruuttosio	37,5
Acido succinico	87,5	Acido Bromosuccinic	25
D-Galattosio	87,5	i-Eritritolo	25
Acido D-gluconico	87,5	Uridine	12,5
Glicerolo	87,5	Acido Succinico Mono-Metil-Estere	12,5
D-Mannitolo	87,5	Acido itaconico	12,5
Acido γ -Amino Butirrico	87,5	acido formico	12,5
Acido quinic	87,5	L-Alaninamide	12,5
Acido D-galatturonico	75	Acido β -idrossibutirrico	12,5
Acido D-gluconico	75	Destrina	12,5
Acido D-saccarico	75	N-Acetil-D-glucosamina	12,5
Acido α -cheto Glutarico	75	D-Cellobiosio	12,5
m-Inositolo	75	Gentiobiosio	12,5
D-Mannosio	75	D-Psicosio	12,5
D-Sorbitolo	75	D-Trealosio	12,5
Saccarosio	75	Turanosio	12,5
L-Serina	75	Timidine	12,5
Acido malonico	75	Putrescina	12,5
D-Arabitolo	62,5	2,3-Butanediolo	12,5

La rappresentazione grafica dei risultati è riportata in figura 10.

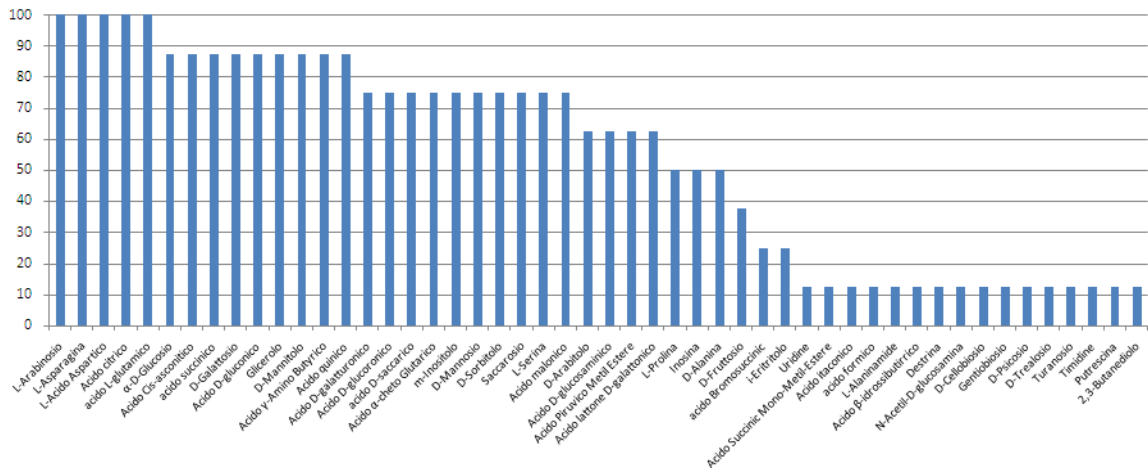


Figura 10. Grafico dell'utilizzazione delle fonti di carbonio da parte degli isolati del Tipo 2.

e) Caratterizzazione sierologica

Con l'ELISA diretta, impiegando l'antisiero al *P. s. pv. syringae* NCPPB 281, sono stati ottenuti i seguenti valori medi di assorbanza: bianco 0,03-0,04; ceppo omologo *P. s. pv. syringae* NCPPB 281 risultato massimo 1,8; ceppi *P. avellanae* ISF 2059 e *P. s. pv. phaseolicola* CFBP 1390 e CFBP 3634, valori da 0,300 a 0,240. Per gli isolati in studio il valore di assorbanza di cinque di essi DPP 38₁, DPP 49, DPP 63₂, DPP66₇, DPP 75 oscillava fra 0,205 e 0,395; con l'isolato DPP 77 è stato ottenuto il valore massimo 1,361; i restanti DPP 63₁₋₂, DPP 67, DPP 66₈, DPP 73, i risultati erano deboli e la reazione è stata considerata negativa.

Con l'ELISA indiretta, utilizzando l'anti *P. s. pv. phaseolicola*, sono stati ottenuti i seguenti valori medi di assorbanza: bianco 0,03-0,04; *P. s. pv. phaseolicola* CFBP 1390 e CFBP 3634, valori da 0,27 a 0,29; *P. s. pv. syringae* NCPPB 281 e *P. avellanae* ISF 2059 i risultati erano deboli e la reazione è stata considerata negativa; isolati DPP 38₁, DPP 49, DPP 63₂, DPP66₇, DPP 75 valori da 0,237 a 0,263; i risultati ottenuti con i restanti cinque DPP 63₁₋₂, DPP 67, DPP 66₈, DPP 73 e DPP 77 sono stati considerati negativi.

f) Caratterizzazione molecolare

✓ SyrB

Dai risultati ottenuti è emerso che gli isolati del Tipo 2 non possiedono il gene *syrB* codificante per la produzione di siringomicina, caratteristico di *P. s. pv. syringae*.

✓ Rep-PCR

Sottoposti alla Rep-PCR utilizzando i primers BOX gli isolati del tipo 2 hanno prodotto profili simili ai ceppi di *P. s. pv. syringae* usati come confronto.

Nella figura 11 si riporta il confronto tra due nostri isolati (DPP 73 e DPP 77) e i ceppi di *P. avellanae* BPIC 631 e ISF 2056 e *P. s. pv. syringae* ISF AC 11 e AC 12. Si può vedere come essi mostrano maggiore affinità a confronto con *P. s. pv. syringae* ISF AC 11 e ISF AC 12 piuttosto che con *P. avellanae* BPIC 631 e ISF 2056.

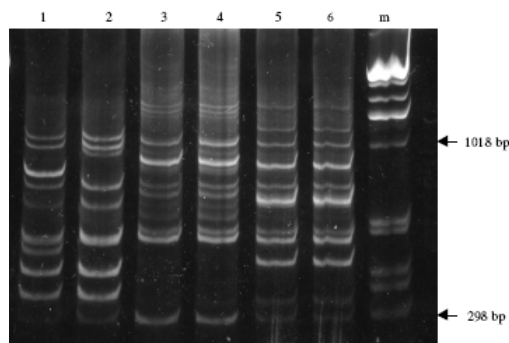


Figura 11. Profili Rep-PCR ottenuti utilizzando primers BOX. *P. avellanae* BPIC 631 (linea 1), *P. avellanae* ISF 2056 (linea 2), isolati DPP73 e DPP77 (linea 3 e 4), *P. s. pv. syringae* ISF AC 11 (linea 5) e *P. s. pv. syringae* ISF AC 12 (linea 6). M=marker 1Kb ladder (Gibco BRL, Carlsbad, USA)

L'analisi cluster ha permesso di rappresentare le relazioni filogenetiche tra i nostri isolati e quelli di confronto (Fig. 12).

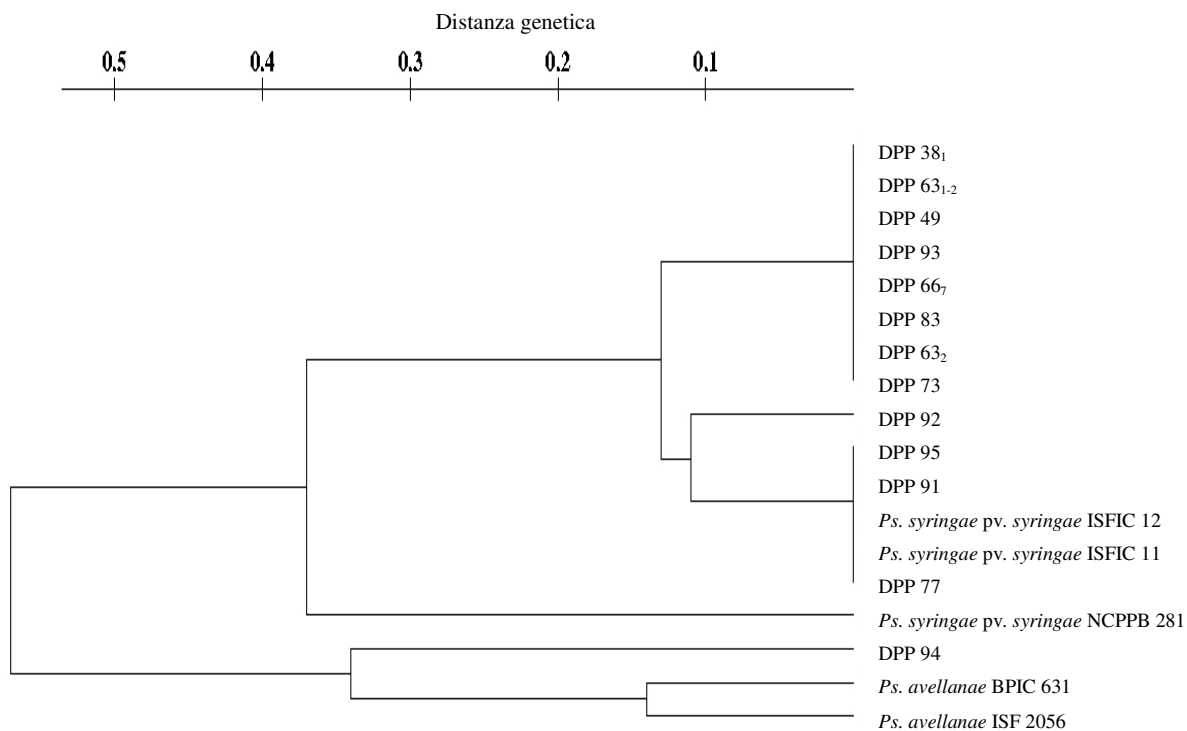


Figura 12. Dendrogramma delle distanze genetiche calcolate con il metodo di analisi cluster UPGMA.

Anche in questo caso i nostri isolati tendono a raggruppare insieme e mostrano maggiore affinità con i ceppi di *Ps. s. pv. syringae* piuttosto che con quelli di *P. avellanae*.

✓ Analisi del profilo degli acidi grassi

I risultati identificativi dell'analisi del profilo degli acidi grassi (Central Science Laboratory of Plant Pathogenic Bacteria, Sand Hutton, York, United Kingdom) hanno evidenziato che i nostri isolati, a confronto con i profili della banca dati TSBA40, si avvicinano a *P. coronofaciens* (indice di similarità 0,852) e a *P. s. pv. syringae* (indice di similarità 0,851) e mostra anche una significativa similarità con altre pseudomonadi quali il *P. s. pv. tomato* (I.S. 0,829) e *P. s. pv. atrofaciens* (I.S. 0,795).

Nella tabella 11 sono riportate le medie percentuali di acidi grassi riscontrate in cinque isolati del Tipo 2 a confronto con isolati piemontesi di *P. s. pv. coryli* e isolati greci e italiani di *P. avellanae*. Si evidenzia che nei nostri isolati e negli isolati piemontesi di *P. s. pv. coryli* sono presenti gli acidi 17:0 e iso 17:0, non presenti invece in *P. avellanae*. Inoltre, l'acido cyclo 18:1 w7c è presente in percentuale notevolmente superiore rispetto al *P. avellanae*. Si evidenzia infine che solo negli isolati sardi è presente una significativa quantità dell'acido grasso 12:0 non riportato né in *P. s. pv. coryli* né in *P. avellanae*. Per contro solo negli isolati piemontesi è stato rilevato l'acido 19:0 cyclo w8c mentre il 19:0 cyclo w10c è presente anche in *P. avellanae*.

Tabella 11. Acidi grassi riscontrati negli isolati del Tipo 2 a confronto con <i>P. syringae</i> pv. <i>coryli</i> isolati in Piemonte e <i>P. avellanae</i>			
Acidi grassi	Media percentuale		
	Tipo 2	<i>P. s. pv. coryli</i> *	<i>P. avellanae</i> *
12:0	4,2	----	----
14:0	0,27	0.2	0.4
15:0	0,16	0.2	0.2
16:0	26,65	27.5	32.8
17:0	0,32	0.4	0.3
18:0	0,98	1.2	0.7
17:0 iso	0,69	0.4	0
16:1 w7c	39,53	33.1	43.3
18:1 w7c	14,67	15.1	8.2
10:0 3OH	2,26	2.7	2.6
12:0 2OH	2,8	3.0	3.0
12:0 3OH	3,76	4.4	3.9
17:0 cyclo	1,25	4.8	0
19:0 cyclo w8c	0	0.2	0
19:0 cyclo w10c	0	1.4	0.3

* Dati Scortichini *et al.*, 2005
Sono riportato solo gli acidi grassi presenti in percentuale maggiore dello 0,15%

4.2.3 Tipo 3

a) Isolamenti

Gli isolamenti effettuati su mezzo B di King hanno prodotto, dopo tre giorni, numerose colonie verdastre che, osservate sotto luce ultravioletta, appaiono fluorescenti. Sulla base di questa caratteristica e della reazione di ipersensibilità su tabacco nel triennio 2004-2006, sono stati selezionati 22 isolati (Tab. 12). Essi sono stati strisciati su piastre contenenti NA, trasferiti su BN (Oxoid, CM0001) e posti a 4°C per i successivi tests di caratterizzazione.

Isolato	Comune	Località	Sintomo
DPP78	Belvi	Campo Sperimentale Vacca	Macchie necrotiche su picciolo fogliare
DPP79	Tonara	Fontana 'e cresia	Porzione di ramo avvizzito
DPP80	Belvi	Campo Arangino	Macchie necrotiche su nervature fogliari
DPP102	Tonara	Illazzò	Margine fogliare appassito
DPP101	Tonara	Illazzò	Germoglio avvizzito
DPP 97	Tonara	Illazzò	Margine fogliare appassito
DPP98	Tonara	Fontana 'e cresia	Cancri su rametto
DPP96	Tonara	Illazzò	Germoglio avvizzito
DPP99	Tonara	Illazzò	Germoglio avvizzito
DPP104	Belvi	Campo Arangino	Necrosi picciolo fogliare
DPP100	tonara	Illazzò	Cancro su rametto erbaceo
DPP103	Belvi	Campo Arangino	Porzione di ramo avvizzito
DPP82	Tiana	Mòlinu	Cancro su rametto
DPP85	Belvi	Campo Arangino	Macchie necrotiche su nervature fogliari
DPP86	Belvi	Campo Arangino	Macchie necrotiche su nervature fogliari
DPP87	Belvi	Campo Arangino	Porzione di ramo avvizzito
DPP88	Belvi	Campo Arangino	Macchie necrotiche su calice florale
DPP89	Belvi	Campo Arangino	Macchie necrotiche su nervature fogliari
DPP90	Tonara	Fontana 'e cresia	Macchie necrotiche su nervature fogliari
DPP 105	Tonara	Illazzò	Cancri su rametto
DPP 106	Tiana	Mòlinu	Margine fogliare appassito
DPP 107	Tiana	Mòlinu	Cancri su giovani getti

b) Prove di patogenicità

Su piantine di nocciolo gli isolati causano, inizialmente, necrosi nei punti d'inoculo; segue la formazione di cancreti e, successivamente, si ha la morte dei fusticini inoculati. Dopo circa un anno alcune piante finivano per soccombere (Figg. 13a, 13b e 13c).

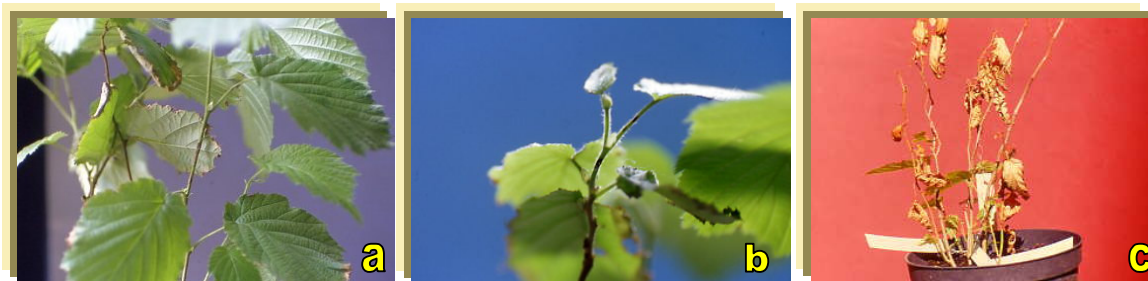


Figura 13. Infezioni sperimentali degli isolati del tipo 3 su nocciolo.

Su frutti di limone gli isolati sono risultati patogeni (Fig.14). Già dopo quattro giorni si ha necrosi a partire dal punto d'inoculo e nel contempo la lesione, a partire dal centro, si approfondisce. In seguito le macchie divengono più scure indicando che anche le cellule dell'albedo vengono interessate da necrosi.

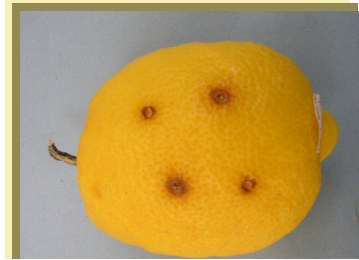


Figura 14. Sintomi su frutto di limone a quattro giorni dall'inoculo.

Su pomodoro (Fig. 15a) e lillà gli isolati causano rispettivamente necrosi dei fusticini e delle foglie mentre su baccello di fagiolo (Fig. 15b) si ha una tipica reazione di ipersensibilità.

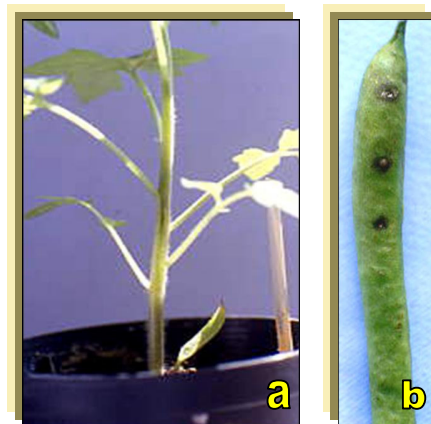


Figura 15. Infezioni sperimentali su pomodoro (a) e baccelli di fagiolo (b) con gli isolati del tipo 3.

c) Aspetti morfologici

Al microscopio elettronico le cellule batteriche sono bastoncellari, con estremità arrotondate, mobili per la presenza di 1-3 flagelli polari (Fig. 16) di dimensioni medie di 1,6 x 0,8 μm .

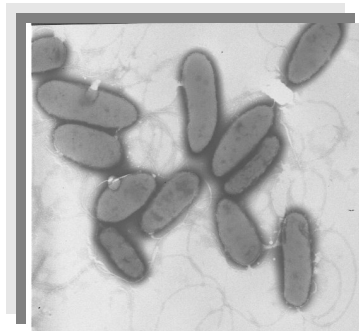


Figura 16. Cellule batteriche del Tipo 3 osservata al microscopio elettronico

d) Caratteri fisiologici e biochimici

Tutti gli isolati sono Gram negativi e catalasi positivi. Ai saggi LOPAT hanno prodotto il profilo tipico (+---+) di *Pseudomonas syringae sensu* Lelliot *et al.*

Differenze riscontrate con altri tests biochimici e fisiologici ed evidenziate in tabella 13, hanno permesso di dividere i 22 isolati in due gruppi rispettivamente di 15 e 7 isolati.

Gli isolati del gruppo 1 mostrano maggiore affinità col ceppo tipo *P. s. pv. syringae* NCPPB 281 rispetto a quelli del gruppo 2 (Tab. 13).

Tabella 13. Caratteristiche fenotipiche degli isolati del Gruppo 1 e 2 a confronto con il ceppo tipo di <i>P. s. pv. syringae</i> (NCPPB 281)			
Caratteristiche	Gruppo 1	Gruppo 2	<i>P. s. pv. syringae</i> NCPPB 281
	DPP78, DPP79, DPP80, DPP96, DPP97, DPP98, DPP99, DPP100 DPP101, DPP102, DPP103, DPP104, DPP 105, DPP 106, DPP 107	DPP82, DPP85, DPP86, DPP87, DPP88, DPP89, DPP90	
Fluorescenza su KB	+	Deb +	+
Riduzione dei nitrati	-	-	-
Lipolisi del Tween 80	+	-	+
Idrolisi di: amido	-	-	-
arbutina	+	+	+
esculina	+	+	+
gelatina	+	V	+
tirosina	V	V	+
Ureasi	+	+	+
Acidità da saccarosio	+	+	+
Metabolismo del Glucosio:	Ossidativo	Ossidativo	Ossidativo
Tolleranza Tetrazolio 0.1%	+	+	N.D
Max T° crescita (°C)	36	36	36
Utilizzazione.: L-arabinosio	c.a.	c.a.	+
trealosio	c	c	N.D.
adonitolo	n.c.	c.a.	N.D.
eritritolo	c.a.	n.c.	c.a.
D-mannitolo	c.a.	c.a.	c.a.
D-sorbitolo	c.a.	c.a.	c.a.
DL-lattato	c.a.	c	c.a.
L-tartrato	n.c.	n.c.	n.c.

+ = esito positivo; - = esito negativo; V = variabilità tra gli isolati; c.a. = cresce e acidifica; c = cresce ma non acidifica; n.c.= non cresce; N.D. = non determinato..

In tabella 14 sono riportati i dati dell'identificazione ottenuti mediante confronto con il database Biolog (GN 6.01). Per alcuni il software indica più risultati di identificazione con il relativo valore di probabilità.

Per valori di similarità (SIM) inferiori a 0,5 il software non indica il valore percentuale di probabilità ma produce, comunque, il risultato identificativo che più si avvicina.

ISOLATO	ID	PROB	SIM
DPP80	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	98%	0,959
DPP97	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	84%	0,716
DPP96	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	78%	0,700
DPP102	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	55%	0,511
DPP 98	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	-	0,377
DPP 99	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	-	0,422
DPP 103	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	75%	0,764
DPP79 -----	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	70%	0,647
	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	30%	0,272
DPP101 -----	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	77%	0,651
	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	12%	0,098
DPP 100 ---	<i>Ps. syringae</i> pv <i>pisi</i>	91%	0,791
	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	5%	0,040
DPP78	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>aceris</i>	89%	0,839
DPP88	<i>Ps. fluorescens</i> biotipo A	-	0,120
DPP 104	<i>Ps syringae</i> pv <i>tagetis</i>	78%	0,656
DPP86	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	-	0,378
DPP85	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	-	0,434
DPP89	<i>Ps. tolaasii</i>	-	0,346
DPP87	<i>Ps. tolaasii</i>	99%	0,686
DPP82	<i>Ps. caricapapayae</i>	90%	0,826
DPP 90, DPP 105, DPP 106 e DPP 107 non determinati.			

In figura 17 e in tabella 15, si riporta la percentuale di isolati che ha utilizzato ciascuna fonte di carbonio su micropiastre Biolog.

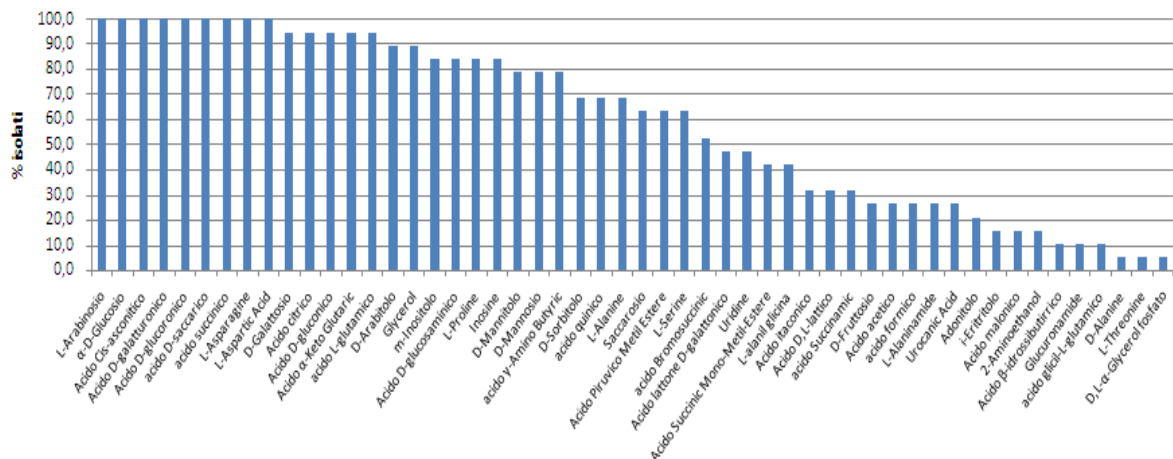


Figura 17. Istogramma delle fonti di carbonio utilizzate dagli isolati del Tipo 3 su micropiastre Biolog

Tabella 15. Percentuale di isolati che ha utilizzato ciascuna fonte di carbonio					
Fonte di carbonio	% isolati	Fonte di carbonio	% isolati	Fonte di carbonio	% isolati
L-Arabinosio	100,0	L-Proline	84,2	Acido D,L-lattico	31,6
α -D-Glucosio	100,0	Inosine	84,2	acido Succinamic	31,6
Acido Cis-asconitico	100,0	D-Mannitolo	78,9	D-Fruttosio	26,3
Acido D-galatturonico	100,0	D-Mannosio	78,9	Acido acetico	26,3
Acido D-glucoronico	100,0	acido γ -Amino Butyric	78,9	acido formico	26,3
acido D-saccarico	100,0	D-Sorbitolo	68,4	L-Alaninamide	26,3
acido succinico	100,0	acido quinico	68,4	Urocanic Acid	26,3
L-Asparagine	100,0	L-Alanine	68,4	Adonitolo	21,1
L-Aspartic Acid	100,0	Saccarosio	63,2	i-Eritritolo	15,8
D-Galattosio	94,7	Acido Piruvico Metil Estere	63,2	Acido malonico	15,8
Acido citrico	94,7	L-Serine	63,2	2-Aminoethanol	15,8
Acido D-gluconico	94,7	acido Bromosuccinic	52,6	Acido β -idrossibutirrico	10,5
Acido α -Keto Glutaric	94,7	Acido lattone D-galattunico	47,4	Glucuronamide	10,5
acido L-glutamico	94,7	Uridine	47,4	acido glicil-L-glutamico	10,5
D-Arabitolo	89,5	Acido Succinic Mono-Metil-Estere	42,1	D-Alanine	5,3
Glycerol	89,5	L-alanil glicina	42,1	L-Threonine	5,3
m-Inositolo	84,2	Acido itaconico	31,6	D,L- α -Glycerol fosfato	5,3
Acido D-glucosaminico	84,2				

L'analisi cluster eseguita con in software StatistiXL, componente aggiuntiva di Excel (Microsoft), in base alle utilizzazioni delle fonti di carbonio sulle micropiastre Biolog, conferma, analogamente ai dati dei saggi fisiologici e biochimici convenzionali, la distinzione in due gruppi (Fig. 18).

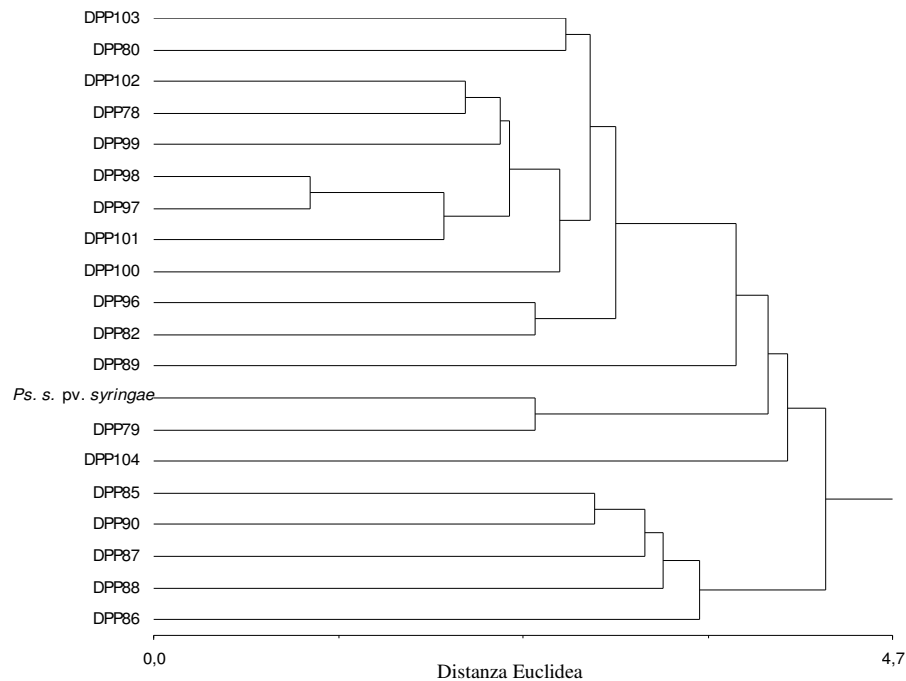


Figura 18. Dendrogramma ottenuto in base alle utilizzazioni delle fonti di carbonio su Micropiastre Biolog. Metodo cluster "Group average".

Dall'analisi delle singole utilizzazioni Biolog di ciascun ceppo sono emerse alcune differenze sostanziali tra i due gruppi (Tab. 16). Gli isolati che raggruppano con *P. s. pv. syringae* (Gruppo 1) non utilizzano l'adonitolo, raramente utilizzano l'acido itaconico e L-alaninamide, per contro, quelli del Gruppo 2 non utilizzano D-sorbitolo, saccarosio, acido quinico ed L-serina.

Tabella 16. Confronto delle utilizzazioni delle fonti di carbonio su micropiastre Biolog tra gli isolati del gruppo 1 (comprendente *P. s. pv. syringae*) e quelli del gruppo 2.

	Adonitolo	D-Sorbitolo	Saccarosio	Acido quinico	Acido itaconico	L-Alaninamide	L-Serina
% isolati gruppo 1	0	93,3	86,6	86,6	6,6	6,6	86,6
% isolati gruppo 2	80	0	0	0	100	100	0
Differenza %	80	93,3	86,6	86,6	93,3	93,3	86,6

d) Caratterizzazione molecolare

L'analisi PCR tendente ad accertare la presenza del gene *syrB* ha permesso di rilevare che 14 isolati hanno prodotto la tipica banda di 752 bp. Per i rimanenti 8 il risultato è stato negativo (Fig. 19).

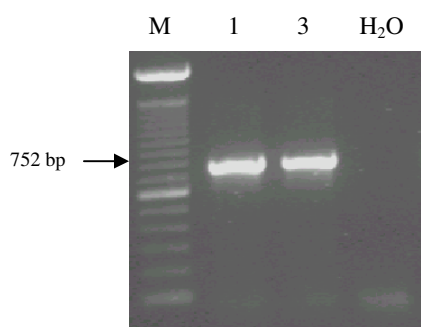


Figura 19. Esito dell'amplificazione PCR per rilevare la presenza del gene *SyrB* sugli isoalti del Tipo 3 in studio. M=Marker 1 kb Plus (*Invitrogen*). Linea 1 = ceppo tipo di *P. s. pv. syringae* NCPPB 281; linea 2 = DPP 78;

In base alla presenza o meno del gene *SyrB* gli isolati saggiati sono stati distinti in due gruppi (Tab. 17).

Tabella 17. Raggruppamento degli isolati in base alla presenza del gene *syrB* a confronto con il ceppo tipo di *P. s. pv. syringae* NCPPB 281

	Gruppo 1	Gruppo 2	<i>P. s. pv. syringae</i> NCPPB 281
	DPP78, DPP79, DPP80, DPP97, DPP98, DPP99, DPP100 DPP101, DPP102, DPP103, DPP104, DPP105, DPP106, DPP107	DPP82, DPP85, DPP86, DPP87, DPP88, DPP89, DPP90, DPP96	
Presenza gene <i>SyrB</i>	+	-	+

I risultati della Rep-PCR hanno consentito di individuare fra i 22 isolati testati due gruppi con profilo simile tra loro (ciascuno raggruppa 9 isolati) e col ceppo di *P. s. pv. syringae* CFBP 700, mentre i restanti 4 hanno prodotto profili differenti (Fig.20).

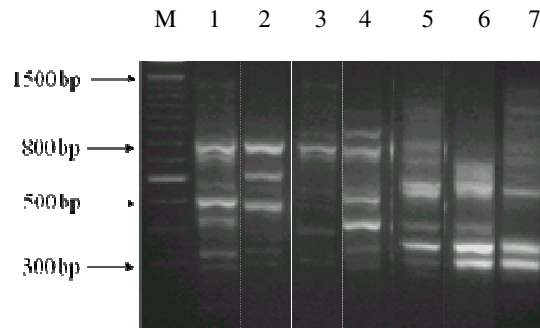


Figura 20. Profili ottenuti con la Rep-PCR utilizzando il *primer* BOXA1R. Gli isolati DPP 88, DPP 82, DPP78, DPP99, DPP106, DPP90 DPP 89, DPP 96 e DPP100 (corsia 1) mostrano lo stesso profilo. Gli isolati DPP 79, DPP102, DPP101, DPP 103, DPP 104, DPP97, DPP98, DPP105, DPP107 (corsie 2) hanno un profilo simile al ceppo di *P. s. pv. syringae* CFBP 700 (corsia 3) e si differenziano dai precedenti per una banda di 600 bp. Gli isolati DPP87, DPP 85, DPP86, DPP80, (corsie 4, 5 6 e 7) mostrano profili differenti rispetto a tutti gli altri ceppi.- M=Indicatore di peso molecolare 100bp ladder (*Invitrogen*).

Infine, dei cinque isolati saggiati per il profilo degli acidi grassi, i due positivi per la presenza del gene *SyrB* (DPP 78 e DPP 79) sono stati identificati come *Ps. s. Pv. Syringae* dalla banca dati TSBA40; i restanti tre sono stati identificati come altre patovars di *Ps. syringae* (Tab. 18).

Tabella 18. Identificazione mediante analisi del profilo degli acidi grassi.	
Isolato	ID TSBA40
DPP78	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
DPP79	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
DPP82	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>papulans</i>
DPP85	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>pisi</i>
DPP87	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>papulans</i>
DPP88	<i>Ps. syringae</i> pv. <i>papulans</i>

Nella tabella 19 sono riportate le percentuali di acidi grassi riscontrate negli isolati del Tipo 3 a confronto con *P. avellanae*, *P. syringae* pv. *coryli* isolati in Piemonte e i nostri isolati del Tipo 2. Si mette in evidenza l'assenza degli acidi 15:0, 17: 0, 17:0 iso, 17:0 cyclo, 19:0 cyclo w8c, 19:0 cyclo w10c; si evidenzia, invece, la presenza dell'acido 12:0 non presente né in *P. avellanae* né in *P. syringae* pv. *coryli* ma presente anche nei nostri isolati del Tipo 2.

Tabella 19. Acidi grassi riscontrati in 6 isolati del Tipo 3 a confronto con gli isolati del Tipo 2, <i>P. syringae</i> pv. <i>coryli</i> isolati in Piemonte e con <i>P. avellanae</i>									
Acidi grassi	Tipo 3						Media percentuale		
	DPP78	DPP79	DPP82	DPP85	DPP87	DPP88	Tipo 2	<i>P. avellanae</i> *	<i>P. s. pv. coryli</i> *
12:0	4,67	4,79	4,44	3,97	4,45	4,3	4,20	----	
14:0	0	0,31	0	0	0	0,39	0,27	0.4	0.2
15:0	0	0	0	0	0	0	0,16	0.2	0.2
16:0	27,34	26,4	29,86	30,02	31,9	31,28	26,65	32,8	27,5
17:0	0	0	0	0	0	0	0,32	0.3	0.4
18:0	1,07	0,82	0,6	0,81	0,63	0	0,98	0,7	1,2
17:0 iso	0	0	0	0	0	0	0,69	----	0.4
16:1 w7c	38,58	38,7	38,77	38,88	39,83	40,54	39,53	43,3	33,1
18:1 w7c	16,33	18,58	15,3	16,99	13,54	13,94	14,67	8,2	15,1
10:0 3OH	2,85	2,71	3,29	2,4	2,57	2,72	2,26	2,6	
12:0 2OH	3,38	2,99	3,31	2,84	2,87	2,81	2,80	3,0	3,0
12:0 3OH	4,7	4,3	4,43	4,08	4,21	4,03	3,76	3,9	4,4
17:0 cyclo	0	0	0	0	0	0	1,25	----	4.8
19:0 cyclo w8c	0	0	0	0	0	0	0	----	0.2
19:0 cyclo w10c	0	0	0	0	0	0	0	0.3	1.4

* Dati Scortichini *et al.*, 2005
Sono riportati solo gli acidi grassi presenti in percentuale maggiore dello 0,15 %

In tabella 20 sono riportati i dati riassuntivi dei raggruppamenti ottenuti in base alle caratteristiche degli isolati del Tipo 3.

Tabella 20. Dati riassuntivi relativi alle caratteristiche dei 22 isolati della Tipologia 3 a confronto con <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> NCPPB 281.				
	Gruppo Saggi biochimici e fisiologici	Gruppo Biolog system	Gruppo <i>SyrB</i>	Gruppo Rep-PCR
DPP78	1*	1	1	1
DPP79	1	1	1	1
DPP80	1	1	1	0
DPP82	0	1	0	1
DPP85	0	0	0	1
DPP86	0	0	0	1
DPP87	0	0	0	1
DPP88	0	0	0	1
DPP89	0	1	0	1
DPP90	0	0	0	1
DPP 97	1	1	1	1
DPP98	1	1	1	1
DPP96	1	1	0	1
DPP99	1	1	1	0
DPP100	1	1	1	0
DPP101	1	1	1	0
DPP102	1	1	1	1
DPP103	1	1	1	1
DPP104	1	1	1	1
DPP 105	1	1	1	1
DPP 106	1	1	1	1
DPP 107	1	1	1	1
<i>P. s. syringae</i> NCPPB 281	1	1	1	1

* È stato attribuito valore 1 al gruppo con caratteristiche uguali a *P. syringae* pv. *syringae* e valore 0 al gruppo con caratteristiche differenti.

In base a queste caratteristiche è stata calcolata la distanza Euclidea tra gli isolati in esame e il ceppo tipo di *P. s. pv. syringae* NCPPB 281, ed eseguita l'analisi cluster con il metodo "Group Average". I risultati (Fig. 21) dimostrano che alcuni isolati hanno una perfetta analogia con *P. s. pv. syringae* (distanza pari a 0) mentre altri si differenziano da esso per qualcuna delle caratteristiche sopra descritte.

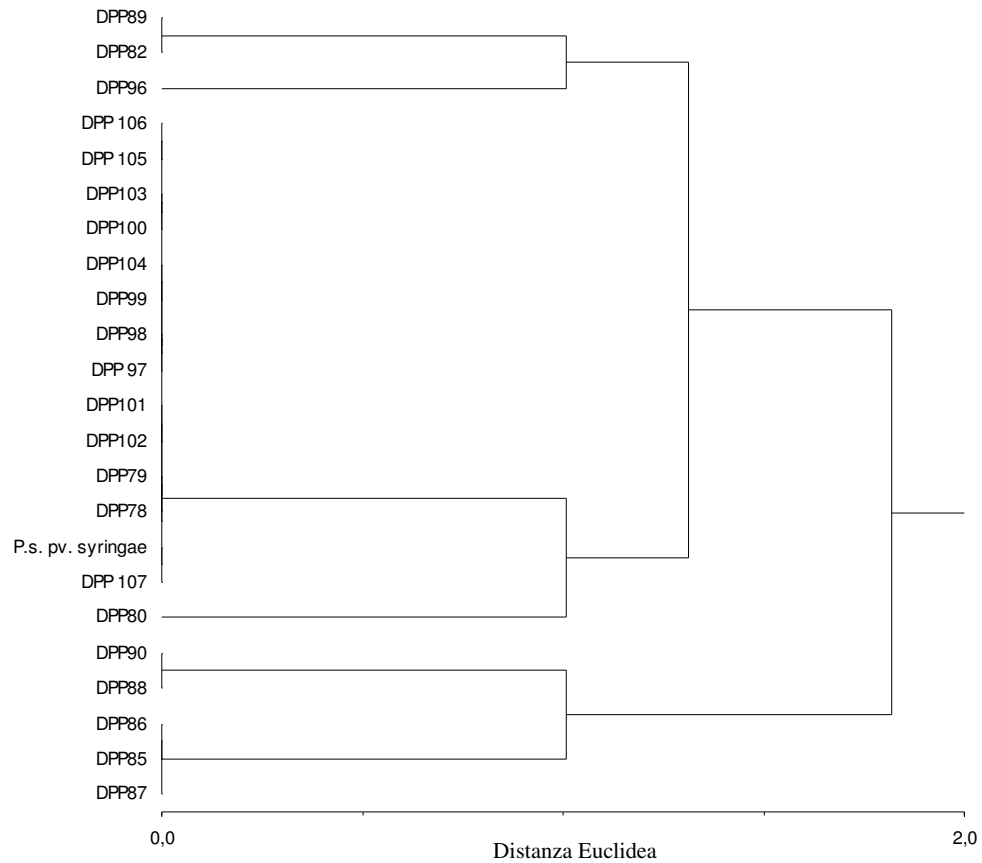


Figura 21. Dendrogramma ottenuto con il metodo cluster "Group average" in base alle caratteristiche fenotipiche e molecolari degli isolati del Tipo 3.

4.3 Prove di lotta

4.3.1 Prove in vitro

I cinque isolati da timo utilizzati nelle prove sono risultati positivi alla reazione di Gram e alla formazione di endospore e negativi all'ossidasi; saggiati con il test computerizzato Biolog sono stati identificati come *Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) Priest *et al.*

Nella tabella 21 vengono riportati i risultati delle prove *in vitro* relativi all'efficacia di nove oli essenziali nei confronti dei ceppi batterici.

Tutti gli oli essenziali sono risultati efficaci, anche se in misura differente, nei confronti dei ceppi di *X. a. pv. corylina*.

Timo, Menta, Mirto e Finocchio si sono mostrati efficaci nei confronti dei ceppi del Tipo 2 e del Tipo 3. Contro i ceppi del Tipo 3 anche il Rosmarino ha mostrato una certa efficacia. Nei confronti del ceppo tipo *Ps. s. pv. coryli* ISPaVe 592, solo Timo e Salvia hanno mostrato una discreta azione inibente.

Tabella 21. Aloni di inibizione (in cm) riferiti alle nove essenze saggiate nelle prove preliminari. Ciascun dato rappresenta la media di cinque prove.

Oli essenziali	Ceppi batterici								Media
	Tipo 1		Tipo 2	Tipo 3				<i>Ps.s. pv. coryli</i> ISPaVe 592	
	DPP 54I	DPP 51IIa	DPP 48	DPP 78	DPP 79	DPP 80	DPP 90		
<i>A. arborescens</i>	0,8	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,24
<i>B. fruticosum</i>	0,7	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,15
<i>F. vulgare</i>	1,0	2,2	0,7	0,0	0,7	1,0	0,0	0,0	0,70
<i>L. stoechas</i>	1,1	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,24
<i>M. pulegium</i>	1,3	1,8	1,0	0,0	1,0	1,0	1,1	0,0	0,90
<i>M. communis</i>	0,8	0,7	1,1	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,58
<i>R. officinalis</i>	2,0	1,0	0,0	0,7	0,0	0,7	1,3	0,0	0,71
<i>S. desoleana</i>	0,7	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,21
<i>T. capitatus</i>	4,0	3,4	1,2	1,4	1,0	1,1	2,1	1,0	1,90

I risultati ottenuti con gli oli di Timo, Finocchio, Menta, Mirto e Rosmarino testati a diverse concentrazioni, hanno confermato, sia pure in misura diversa, la loro tossicità nei confronti dei ceppi saggiati. Ancora una volta il più efficace si è confermato il Timo con un'azione inibente e letale alla concentrazione di 400 ppm; seguivano Finocchio, Menta e Mirto (600 ppm); mentre per il Rosmarino la concentrazione minima inibitoria era superiore a 800 ppm.

In base a questi risultati nelle prove *in vivo* sono stati utilizzati gli oli essenziali di Finocchio, Menta, Mirto e Timo.

I risultati delle prove *in vitro* relativi all'efficacia dei cinque ceppi batterici isolati da piante di timo sono riportati in tabella 22. L'antagonista maggiormente efficace è stato l'isolato DPPSS T3 seguito dagli isolati DPPSS T2 e DPPSS T5.

Tabella 22. Aloni di inibizione (in cm) riferiti ai cinque antagonisti saggiati nelle prove preliminari. Ciascun dato rappresenta la media di cinque prove.									
Antagonisti	Ceppi batterici								MEDIA
	Tipo 1		Tipo 2	<i>Ps.s.pv.coryli</i>	Tipo 3				
	DPPXac1	DPPXac2	DPP48	ISPaVe 592	DPP78	DPP79	DPP80	DPP90	
DPPSS T1	1,4	2,0	3,1	2,4	2,3	2,3	2,6	2,1	2,275
DPPSS T2	3,5	3,1	4,6	2,3	3,5	3,5	5,0	4,5	3,75
DPPSS T3	5,1	3,2	4,8	5,0	4,1	2,6	3,5	4,5	4,1
DPPSS T4	1,2	2,4	2,5	1,4	2,0	1,8	2,2	2,0	1,9375
DPPSS T5	2,4	2,9	4,3	3,0	3,0	3,4	3,0	2,2	3,025

4.3.2 Prove in vivo

4.3.2.1 Fitotossicità e patogenicità

I risultati relativi alle prove di fitotossicità e patogenicità sono riportati in tabella 23. Essi hanno messo in evidenza che gli oli essenziali di Finocchio ed in minor misura quello di Menta mostravano effetto fitotossico sulle foglie di nocciolo lesionate. L'olio essenziale di Timo è risultato fitotossico sulle piantine di pomodoro integre e lesionate.

Gli isolati batterici utilizzati nelle prove *in vivo* non hanno provocato alcuna reazione di ipersensibilità sulle foglie di tabacco.

Tabella 23. Risultati delle prove di fitotossicità (oli) e patogenicità (ceppi batterici).				
		Nocciolo	Pomodoro	Frutti di limone
fitotossicità	Finocchio (<i>F. vulgare</i>)	++	-	-
	Menta (<i>M. pulegium</i>)	+	-	-
	Timo (<i>T. capitatus</i>)	-	+	-
	Mirto (<i>M. communis</i>)	-	-	-
Patogenicità	DPPSS T2	-	-	-
	DPPSS T3	-	-	-
	DPPSS T5	-	-	-

4.3.2.2 Prove su nocciolo

In base ai risultati sopra riportati, per le successive prove *in vivo* sono stati utilizzati gli oli di Mirto e Timo e i ceppi batterici DPPSS T2 e T3.

Le osservazioni relative all'efficacia di oli e antagonisti sugli otto ceppi fitopatogeni inoculati sperimentalmente su nocciolo, hanno evidenziato per tutti i ceppi, a tre mesi dall'inoculazione, una buona azione di contenimento (Figg. 22a, 22b; Figg. 23a; e 23b).

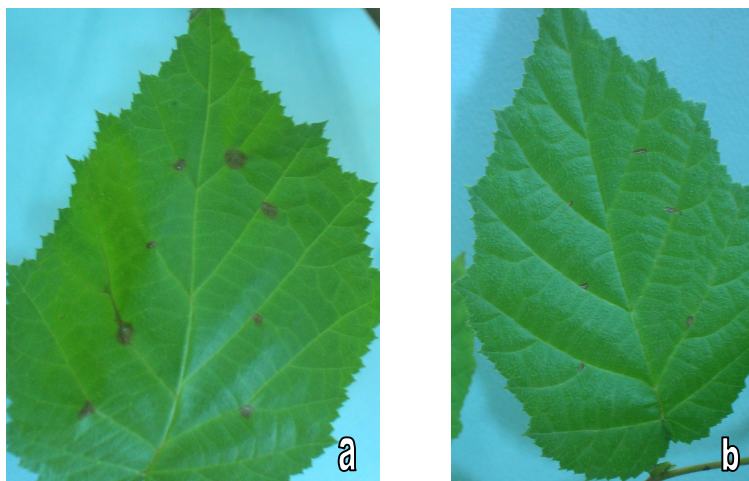


Figura 22. Foglie di nocciolo infettate sperimentalmente col ceppo DPP78. **a**, sintomi causati dal batterio; **b**, inibizione dell'infezione a seguito del trattamento con olio essenziale di Mirto.

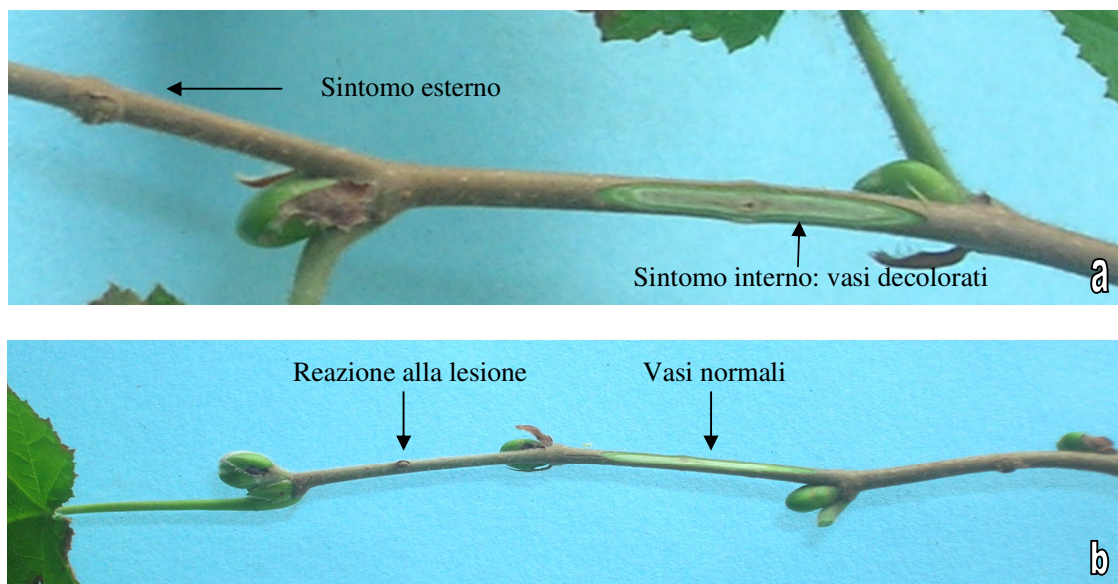


Figura 23. **a**, esito dell'infezione sperimentalmente col ceppo DPP 80 su rametti erbacei di nocciolo; **b**, azione inibente del ceppo sardo di *B. amiloliuefaciens* DPPSS T2 in rametti erbacei di nocciolo infettati sperimentalmente col ceppo DPP 80. L'antagonista *B. amiloliuefaciens* DPPSS T2 è stato inoculato prima del ceppo DPPSS 80.

I reisolamenti effettuati su NSA e sul mezzo B di King hanno permesso di confermare la presenza degli agenti patogeni nei tessuti delle piante infettate sperimentalmente e utilizzate come controllo positivo: dal materiale inoculato col ceppo del Tipo 2 e 3 sono state reisolate colonie leviformi e fluorescenti; dal materiale inoculato coi ceppi del Tipo 1, colonie mucoidi, giallastre, non fluorescenti.

Dal materiale inoculato come descritto ai punti b) e c) del paragrafo 3.2.2, sono stati isolati solo i ceppi antagonisti (DPPSS T2 e DPPSS T3); dai controlli negativi di cui al punto d) del paragrafo 3.2.2, gli isolamenti hanno dato esito negativo.

4.3.2.3 Prove su limone

Dopo sette giorni, nei punti inoculati con i ceppi del Tipo 3, compariva una tipica reazione di necrosi (Figg. 24a, 24b). Negli altri siti, trattati con l'olio essenziale o con l'antagonista prima e con i patogeni poi, così come anche nei relativi controlli, non compariva nessun segno d'infezione (Figg. 24a, 24b).

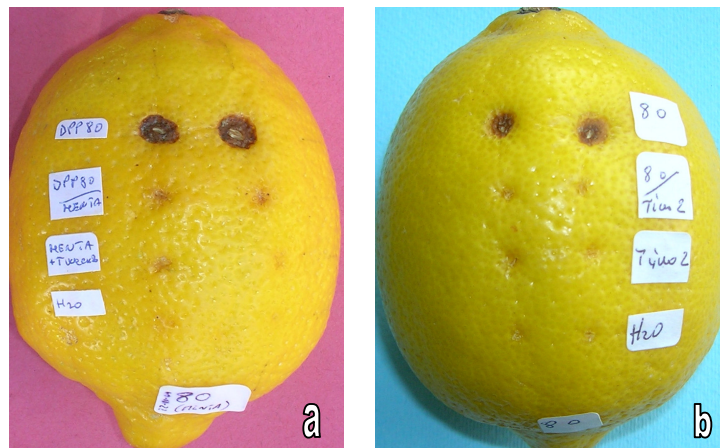


Figura 24. Azione inibente esercitata dal trattamento con l'olio essenziale di Menta (a) e con il ceppo sardo di *B. amiloliquefaciens* DPPSS T2 (b) su limoni infettati sperimentalmente col ceppo della Tipo 3 DPP 80. Dall'alto verso il basso: (a) DPP 80, olio essenziale di menta, olio essenziale di menta + Tween 20 all'1%, acqua sterile + Tween 20 all'1%; (b) DPP 80, *B. amiloliquefaciens* DPPSS T2 seguito dal ceppo DPP 80, *B. amiloliquefaciens* DPPSS T2, acqua sterile.

5. Discussione e conclusioni

Il quadro sintomatico del Tipo 1 è quello tipico del “Bacterial Blight” o “Bacteriosis of hazel” (Gardan e Devaux, 1987; Bradbury, 1987).

I test di patogenicità hanno permesso di accertare la natura fitopatogena degli otto isolati testati e indicano che essi sono responsabili dell’alterazione osservata sui noccioli sardi.

I risultati dei caratteri morfologici (osservazioni al microscopio elettronico; crescita su YDC ed SQ) hanno permesso un primo inquadramento dei nostri isolati nel genere *Xanthomonas*. Inoltre, la caratteristica produzione di pigmenti verde scuro sul terreno SQ ci permette di inquadrali tra le xanthomonadi del gruppo 6, che comprende ceppi omologhi in base all’ibridazione DNA-DNA. Tale gruppo, come riportato da Lee *et al.* (1992), oltre alla pv. *corylina* comprende anche le pathovars *celebensis*, *pruni*, *juglandis* di *X. campestris*.

I risultati dei saggi fisiologici e biochimici, unitamente ai dati sopra riportati, ci consentono di ascrivere gli otto isolati del Tipo 1 a *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller *et al.*) Vauterin *et al.* Gli isolati mostrano caratteristiche analoghe a quelle descritte in letteratura, ad eccezione della capacità di liquefare la gelatina (Tabella 2) che in quattro dei nostri isolati (DPP54I, DPP51IIa, DPPG1 e DPPG2) è risultata negativa. Tale dato atipico, trova riscontro in letteratura per il ceppo NCPPB 935 (Scortichini *et al.*, 2002).

L’analisi Biolog conferma l’identificazione dei quattro isolati gelatina positivi; mentre per quelli negativi l’identificazione è incompleta per quanto riguarda la pv.: due sono stati ascritti alla pv. *pelargonii*, uno alla pv. *phaseoli* e uno alla pv. *malvacearum*. Infine l’identificazione dei ceppi utilizzati nella presente tesi è stata confermata anche mediante rep-PCR e analisi AFLP in un lavoro eseguito in collaborazione con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Fitosanitarie dell’Università di Catania nel quale viene segnalata la presenza della malattia in Sardegna e Sicilia (Cirvilleri *et al.*, 2006).

Xanthomonas arboricola pv. *corylina* è un batterio da quarantena incluso nella lista A2 (OEPP/EPPO, 2004). L’averlo ritrovato in Sardegna ha notevole significato patologico ed epidemiologico in quanto si riteneva non fosse presente.

Il quadro sintomatico del Tipo 2 è tipico della “Moria dei rametti” causata da *P. syringae* pv. *coryli*, una nuova pathovar recente proposta da Scortichini *et al.* (2005).

I risultati dei saggi LOPAT (+ - - +) consentono di inquadrare gli isolati di Tipo 2 fra i *Pseudomonas syringae* gruppo Ia, *sensu* Lelliott *et al.* (1966) ma non sono sufficienti per

individuare la pathovar di appartenenza. Una individuazione preliminare della pathovar è possibile in base alle risposte ad alcuni test microbiologici (adonitolo, eritritolo, L-lattato e gelatina). I risultati ottenuti con i nostri isolati ci consentono di ascriverli alla *pv. coryli* (Tabb.6 e 7).

C'è, tuttavia, da sottolineare che i nostri isolati mostrano variabilità in alcuni saggi quali la riduzione nitrati, il 2-ketogluconato, la lipolisi del Tween 80 e l'idrolisi di gelatina e tirosina (Tabella 6) differenziandosi perciò parzialmente da *Pseudomonas syringae pv. coryli*. Interessante appare il risultato del test della gelatina in quanto esso viene considerato caratterizzante per la *pv. coryli* (Scortichini *et al.*, 2005). In generale possiamo affermare che la variabilità che abbiamo riscontrato nei nostri isolati è una caratteristica peculiare dei ceppi sardi.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti col sistema Biolog essi hanno confermato (Tab. 9) l'identificazione degli isolati del Tipo 2 come *P. syringae pv. coryli*.

I risultati dei tests sierologici ELISA (diretta e indiretta) hanno messo in evidenza che gli isolati del Tipo 2 non sono sierologicamente affini a *P. s. pv. syringae* e a *P. s. pv. phaseolicola* in quanto incapaci di reagire significativamente con gli antisieri specifici.

Per quanto riguarda le caratteristiche genomiche si sottolinea, nei ceppi di *P. syringae pv. coryli* analizzati, l'assenza del gene *syrB*, la cui presenza è, invece, caratteristica di *P. syringae pv. syringae*.

Il profilo di amplificazione ottenuto mediante Rep-PCR dei nostri isolati a confronto con *P. avellanae* e *P. s. pv. syringae*, indica una maggiore affinità con questi ultimi. Tale dato viene messo in evidenza dall'analisi cluster (Figura 12) dove si vede chiaramente che i nostri isolati raggruppano insieme e sono più vicini ai ceppi di *P. s. pv. syringae* usati come confronto. Questi dati sono in analogia con quanto riportato da Scortichini *et al.* (2005). Tra l'altro, come riportato dai predetti autori, i risultati dell'amplificazione e sequenziamento di una sezione di 448-bp del 16S rDNA (posizione da 409 a 856) di nostri isolati (DPP48 e DPP51) e isolati piemontesi di *P. syringae pv. coryli*, un isolato di *P. avellanae* e uno di *P. syringae pv. phaseolicola*, ha messo in evidenza che essi raggruppano insieme e differiscono da *P. avellanae* e *P. s. pv. phaseolicola*. Inoltre, differenze intraspecifiche sono state messe in evidenza tra isolati di *P. syringae pv. coryli* piemontesi e sardi mediante sequenziamento parziale del gene *hrpL*.

I risultati del profilo degli acidi grassi (Tab. 11) ha messo in evidenza l'analogia nella composizione tra i nostri isolati e i ceppi di *P. s. pv. coryli*; anche in questo caso si

evidenziano alcune differenze quali la presenza dell'acido grasso 12:0 e l'assenza degli acidi 19:0 cyclo w8c e 19:0 cyclo w10c.

Le differenze riscontrate nelle risposte alle analisi fenotipiche e genomiche, confermano la specificità degli isolati sardi e sono in accordo con quanto riportato da Scortichini *et al.* (2005): le differenze intraspecifiche rispetto agli isolati piemontesi può rappresentare un adattamento del patogeno al nuovo ambiente. Infatti, in Sardegna la Tonda Gentile delle Langhe, cultivar sulla quale è stata rinvenuta la “moria dei rametti”, è stata introdotta dal Piemonte negli anni '70.

Il quadro sintomatico del Tipo 3 è tipico della “Avvizzimento dei rametti e delle branche” causata da *P. s. pv. syringae*.

I risultati relativi alle caratteristiche fisiologiche e biochimiche hanno evidenziato variabilità nella risposta ad alcuni saggi. Ciò ha consentito di dividere gli isolati in due gruppi. In particolare il primo raggruppa isolati capaci di idrolizzare la gelatina, provocare la lipolisi del Tween 80 e utilizzare e acidificare eritritolo e DL-lattato, caratteristiche tipiche del ceppo tipo di *P. s. pv. syringae* NCPPB 281, utilizzato come confronto. Il secondo gruppo non provoca la lipolisi del Tween 80, è variabile per l'idrolisi della gelatina, non utilizza l'eritritolo e cresce ma non acidifica su terreno contenente DL-lattato.

Anche i risultati delle utilizzazioni delle fonti di carbonio su micropiastre Biolog e rilevate dall'analisi computerizzata, hanno identificato come *P. s. pv. syringae* (SIM 0,636) un gruppo degli isolati saggiati. Mentre i restanti isolati vengono identificati in modo non univoco come altre pathovars di *P. syringae* (Tabella 14). Anche l'analisi cluster, eseguita in base alle utilizzazioni Biolog, mette in evidenza la distinzione degli isolati del Tipo 3 in due gruppi (Fig. 18). Dall'analisi delle singole utilizzazioni di ciascun ceppo sono emerse alcune differenze sostanziali tra i due gruppi (Tab. 16). Gli isolati che raggruppano con *P. s. pv. syringae* non utilizzano Adonitolo, raramente utilizzano Acido itaconico ed L-alaninamide, per contro, quelli del Gruppo 2 non utilizzano D-sorbitolo, Saccarosio, Acido quinic ed L-serina.

L'analisi genomica, tesa a ricercare il gene *syrB*, caratteristico di *P. s. pv. syringae*, ha prodotto anch'essa la distinzione in due gruppi (Tab. 17): il gruppo 1 analogamente al ceppo *P. s. pv. syringae* NCPPB 281 produce la caratteristica banda di 752 bp.

Anche la rep-PCR (Fig. 20) ha consentito di individuare fra i 22 isolati testati due gruppi, il primo presenta profilo simile al ceppo tipo di *P. s. pv. syringae*, il secondo presenta profili nettamente differenti.

L'identificazione mediante il profilo degli acidi grassi (Tab. 18) ha confermato ulteriormente la distinzione dei due gruppi. Gli isolati DPP78 e DPP79, *syrB* positivi e analoghi a *P. s. pv. syringae* per tutte le altre caratteristiche, sono stati identificati in maniera univoca. La diversa composizione degli acidi grassi degli isolati del Tipo 2 e 3 e di *P. avellanae*, *P. syringae* pv. *coryli* isolati in Piemonte (Tab. 19) mette in evidenza ulteriori differenze fra gruppi e ceppi analizzati.

L'analisi cluster (Fig. 21) effettuata combinando le caratteristiche degli isolati del Tipo 3 (Tab. 20) ci consente di affermare che 13 di essi (DPP78, DPP 79, DPP97, DPP99, DPP 100, DPP101, DPP102, DPP 103, DPP 104, DPP105, DPP106, DPP107, DPP98) appartengono a *P. syringae* pv. *syringae*, mentre i restanti 9 (DPP80, DPP82, DPP 85, DPP86, DPP87, DPP 88, DPP89, DPP 90, DPP96) sono pseudomonadi fluorescenti che si differenziano da *P. syringae* pv. *syringae* per alcune caratteristiche peculiari. Ciò suggerisce che in Sardegna, come in altre aree corilicole italiane, è presente una popolazione composta la cui caratterizzazione necessita di ulteriori studi (Scortichini, 2002a).

I risultati ottenute con le prove di lotta *in vitro* e *vivo* rappresentano un primo contributo sull'argomento.

I risultati ottenuti *in vitro* se da un lato confermano l'efficacia antibatterica di alcuni degli oli testati, al tempo stesso mettono in evidenza l'inefficacia di alcuni di essi come ad esempio Artemisia, Bupleurum, Lavanda e Salvia nei confronti di alcuni dei ceppi testati. L'azione letale degli oli di Mirto e Timo, in concomitanza con l'assenza di fenomeni di fitotossicità su nocciolo, rappresenta un risultato stimolante circa l'eventualità che, attraverso ulteriori studi, si arrivi ad un loro impiego più razionale e, al tempo stesso, possano essere utilizzati anche nella lotta contro altre malattie crittogamiche riscontrate su nocciolo.

Per quanto riguarda l'azione fitotossica di due dei quattro oli saggiate essa rappresenta uno dei limiti che ne frenano l'impiego. In questo campo potranno essere di aiuto la messa a punto di formulati che ne attenuano tale azione.

Nelle prove *in vivo* le osservazioni e gli isolamenti, seppure preliminari, hanno indicato un comportamento simile per oli e antagonisti testati. Particolarmente interessanti appaiono i risultati ottenuti con i ceppi di *B. amyloliquefaciens* isolati da timo in Sardegna sia *in vitro* che su piantine di nocciolo e frutti di limone. Trattasi delle prime prove sul controllo degli agenti delle malattie del nocciolo mediante antagonisti batterici. Ceppi di *B. amyloliquefaciens* sono stati utilizzati, prevalentemente, nel controllo di agenti di malattie fungine (Mari *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2007); essi sono, tuttavia, attivi anche nei confronti di batteri fitopatogeni (Yoshida *et al.*, 2001). A seguito delle prove

effettuate *in vivo* con i due ceppi di *B. amiloliquefaciens* sardi emergono due aspetti di particolare interesse. L'antagonismo è stato esercitato quando le piantine di nocciolo e i frutti di limone sono stati inoculati prima dei batteri fitopatogeni (*P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. coryli*, *X. a. pv. corylina*) evidenziando un'azione di tipo preventivo. Quando, invece, i due ceppi antagonisti sono stati inoculati dopo o contemporaneamente con i batteri fitopatogeni essi non si sono dimostrati capaci di arrestare il processo infettivo (dati non riportati). I ceppi antagonisti di *B. amiloliquefaciens* sardi hanno mostrato la medesima efficacia anche se i batteri fitopatogeni bersaglio appartenevano a generi diversi (*Pseudomonas* e *Xanthomonas*). Entrambi i comportamenti trovano riscontro in letteratura anche se riferito al controllo biologico di funghi fitopatogeni: nel controllo dell'agente dell'antracnosi del gelso, *Colletotrichum dematium*, *B. amiloliquefaciens* era attivo solo quando il filtrato colturale è stato applicato prima dell'inoculazione del fungo fitopatogeno denotando che l'azione del batterio era di tipo preventivo (Yoshida *et al.*, 2001). L'antagonismo di *B. amiloliquefaciens* è dovuto alla sua capacità di produrre sostanze antimicrobiche attive nei confronti di funghi e batteri fitopatogeni *in vitro* e *in vivo* (Yoshida *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2007); tuttavia, non sono da escludere altri meccanismi di azione come ad esempio la competizione per sostanze nutritive essenziali (Mari *et al.*, 1996).

RIASSUNTO

Indagini condotte in Sardegna, nel triennio 2005-2007, in coltivazioni di nocciolo deperienti, hanno permesso di osservare tre quadri sintomatici. Gli isolamenti hanno prodotto 52 isolati batterici. Le analisi fenotipiche, molecolari e il profilo degli acidi grassi hanno consentito di ascrivere nove isolati (Tipo 1), che si caratterizzano per la produzione di pigmento verde sul mezzo SQ, a *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, agente causale del “Bacterial blight” del nocciolo. Ventuno isolati (Tipo 2), agenti di moria dei rametti, sono stati ascritti a *Pseudomonas syringae* pv. *coryli*. Questi si caratterizzano per l’assenza del gene *syrB* e differiscono da isolati piemontesi per alcune caratteristiche biochimiche e composizione di acidi grassi. Ventidue isolati, agenti di avvizzimenti di rametti e branche (Tipo 3), sono stati distinti in due gruppi: il primo è costituito da tredici isolati *syrB* positivi e simili a *P. s.* pv. *syringae*; il secondo, costituito da nove isolati, differisce per l’assenza del gene *syrB* e altre caratteristiche fenotipiche.

Preliminarmente, *in vitro*, sono stati saggiati nove oli essenziali (Artemisia, Bupleurum, Finocchio, Lavanda, Menta, Mirto, Rosmarino, Salvia e Timo) e cinque ceppi di *Bacillus amyloliquefaciens* nei confronti di due ceppi di *X. a.* pv. *corylina*, due di *P. s.* pv. *coryli* e quattro di *P. syringae*. I risultati delle prove *in vivo* hanno evidenziato l’efficacia degli oli di mirto e timo e di due isolati di *B. amyloliquefaciens* nel contenere le infezioni su nocciolo e frutti di limone.

BIBLIOGRAFIA

- ✓ Alberghina O., 2002. La coltura del nocciolo in Sicilia. Atti II convegno nazionale sul nocciolo: le frontiere della corilicoltura italiana, Giffoni Valle Piana (SA). 141-145.
- ✓ Aloj B., F. Bartoletti, U. Caporossi, F.P. D'Errico, F. Di Dato, C. Grande, M. Olmi, B. Paparatti, A. Tombesi e L. Varvaro, 1987. Una "moria" del nocciolo di natura ignota nel Viterbese. *L'Informatore Agrario*, 26, 55-57
- ✓ Ayers S.H., P. Rupp e W.T. Johnson, 1919. A study of the alkali forming bacteria in milk. *Bulletin U.S. Dept. Agric.*, 782.
- ✓ Bignami C., 2002. Attualità e problematiche della nocciolicoltura del Lazio. Atti II convegno nazionale sul nocciolo: le frontiere della corilicoltura italiana, Giffoni Valle Piana (SA). 122-132.
- ✓ Biolog. http://www.biolog.com/mID_bacteriaid.htm
- ✓ Bozoglu M., 2005. The situation of the hazelnut sector in Turkey. *Acta Horticulturae*, 686, 641-648.
- ✓ Cirvilleri G., M. Fiori, A. Bonaccorsi, G. Scuderi, S. Viridis and M. Scortichini, 2006. Occurrence of *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* in hazelnut orchards in Sardinia and Sicily. *Journal of Plant Pathology*, 88:3, 340.
- ✓ Cirvilleri G., G. Scuderi, A. Bonaccorsi e M. Scortichini, 2007. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *coryli* on hazelnut orchards in Sicily, Italy and characterization by fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism. *Journal of Phytopathology*, 155, 397-402
- ✓ Clark M.F. e A.N. Adams, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34, 475-483.
- ✓ Clark M.F., 1981. Immunosorbent assay in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopath.*, 19, 83-106.
- ✓ Conte E., 2006. Il nocciolo come coltura minore: problematiche relative alla difesa fitosanitaria. In: Scortichini M. (Eds) *Le avversità del nocciolo in Italia*. PETRIA, 16:1, 149-158
- ✓ Denny T.P. e A. C. Hayward, 2001. Gram-negative bacteria. In Schaad N.W., J.B. Jones e W. Chun (eds.), *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Terza edizione. St. Paul, Minnesota, USA. 151-1754.
- ✓ Dye D.W., 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. "The amylovora" group. *New Zealand Journal of Science*, 11, 590-607.
- ✓ FAO. <http://faostat.fao.org>
- ✓ Fiori M., L. Cicconi e M. Scortichini, 2003. Bacterial canker of hazelnut (*Corylus avellana* L.) in Sardinia (Italy): occurrence of *Pseudomonas syringae* strains. In: N.S. Iacobellis, A. Collmer, S.W. Hutcheson, J.W. Mansfield, C.E. Morris, J. Murillo, N.W. Schaad, D.E. Stead, G. Surico e M.S. Ullrich (Eds) *Pseudomonas syringae and related pathogens*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 617-625.
- ✓ Fitorev. <http://www.fitorev.com>
- ✓ Granata G., 1985. Le principali malattie del nocciolo in Italia. *Informatore Fitopatologico*, 35, 19-24.

- ✓ Graniti A., 1957. Risultati di inoculazioni artificiali con ceppi di *Cytospora corylicola* Sacc., isolati da Noccioli colpiti da *Mal dello stacco* in Sicilia. *L'Italia Forestale e Montana*, 12, 93-98.
- ✓ ISTAT. <http://www.istat.it>
- ✓ Janse, J.D., M.P. Rossi, L. Angelucci, M. Scortichini, J.H.J. Derks, A.D.L. Akkermans, R. De Vrijer, e P.G. Psallidas, 1996. Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. nov.), the bacterium causing canker of hazelnut (*Corylus avellana*) L. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 589-595.
- ✓ Jones J.B., A.R. Chase e G.K. Harris, 1993. Evaluation of the Biolog GN MicroPlate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. *Plant Disease*, 77:6, 553-558.
- ✓ Kazempour M.N., 2006. First report of bacterial blight of hazelnut caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 88:3, 341.
- ✓ King E.O., M.K. Ward e D.E. Raney, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44, 301-307.
- ✓ Klement Z., 1963. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature*, 199, 299-300.
- ✓ Kovacs N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178, 703.
- ✓ Lee Y.A., D.C. Hildebrand e M.N. Schroth, 1992. Use of quinate metabolism as a phenotypic property identify members of *Xanthomonas campestris* DNA homology group 6. *Phytopathology*, 82:9, 971-973.
- ✓ Lelliott R.A. e D.E. Stead, 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Preece T.F. Editor, 216 pp.
- ✓ Lelliott R.A., E. Billing e A.C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 29, 470-489.
- ✓ Mari M., M. Guizzardi, G.C. Pratella, 1996. Biological Control of Gray Mold in Pears by Antagonistic Bacteria. *Biological Control*, 7, 30-37.
- ✓ Mazzone P. e A. Ragazzino, 2006. Le principali avversità del nocciolo in Campania. In: Scortichini M. (Eds) *Le avversità del nocciolo in Italia*. PETRIA, 16:1, 19-30.
- ✓ Me G. e N. Valentini, 2006. La corilicoltura in Italia e nel mondo. Atti del Convegno: "Le avversità del nocciolo in Italia", Roma, Italia, 8 Novembre 2005. PETRIA, 16:1, 7-18.
- ✓ Mehlenbacher S.A., 2005. The hazelnut situation in Oregon. *Acta Horticulturae*, 686, 665-668.
- ✓ Noviello C., 1968. Osservazioni sulle malattie parassitarie del Nocciolo con particolare riferimento alla Campania. *Annali della Facoltà di Scienze Agrarie dell'Università di Napoli - Portici*, Serie IV: III, 3-31.
- ✓ OEPP/EPPO, 2004. Diagnostic protocols for regulated pests *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*. *OEPP/EPPO Bulletin*, 179-181.

- ✓ Piccirillo P., 2002. Attualità e problematiche della coltura del nocciolo in Campania. *Atti II° convegno nazionale sul nocciolo: le frontiere della corilicoltura italiana*, Giffoni Valle Piana (SA), 113-121.
- ✓ Poschenrieder G., I. Czech, M. Friedrich-Zorn, B. Huber, S. Theil, J.D. Janse e E. Moltmann, 2006. Ester nachweis von *Pseudomonas syringae* pv. *coryli* (pv. nov.) und *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* an *Corylus avellana* (Haselnuss) in Deutschland. *Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft-Insitut für Pflanzenschutz. Jahresbericht 2005*, 32-33.
- ✓ Psallidas P.G. e C.G. Panagopoulos, 1979. A bacterial canker of filbert in Greece. *Phytopathologische Zeitschrift*, 94, 103-111.
- ✓ Pupillo M. e A. Canova, 1952. Contributo alla conoscenza del «Mal dello stacco» dei Noccioli in Sicilia. *Annali della Sperimentazione in Agricoltura*, n.s., 6. 4, 895-906.
- ✓ Salerno M., 1961. *Cytospora corylicola* Sacc. e patogenesi del «Mal dello stacco» del nocciolo (*Corylus avellana* L.) in Sicilia. *Rivista di Patologia vegetale* S.III, 1, 38-64.
- ✓ Savastano L., 1918. Note di Patologia arborea: La disgelatura traumatica nei noccioli di Piazza Armerina. *Annali della Regia Stazione Sperimentale di Agrumicoltura e frutticoltura di Acireale*, 4, 194-199.
- ✓ Schaad N.W., J.B. Jones e W. Chun, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Terza edizione. 373 pp.
- ✓ Schifani C., 1971. Il nocciolo in Italia. *In: L'economia del nocciolo*. Istituto nazionale di Economia agraria, Roma, 1-52.
- ✓ Scortichini M., 2002. The problem caused by *Pseudomonas avellanae* on hazelnut in Italy. *Acta Horticulturae*, 556, 509-512.
- ✓ Scortichini, M., 2002a. Bacterial canker and decline of European hazelnut. *Plant Disease*. 86,704-709.
- ✓ Scortichini M., 2006. Le principali avversità del nocciolo nel Lazio. *In: Scortichini M. (Eds) Le avversità del nocciolo in Italia*. PETRIA, 16:1, 31-44.
- ✓ Scortichini M. e R. Liguori, 2003. Integrated management of bacterial decline of hazelnut, by using Bion as an activator of systemic acquired resistance (SAR). *In: N.S. Iacobellis e A. Collmer, S.W. Hutcheson, J.W. Mansfield, C.E. Morris, J. Murillo, N.W. Schaad, D.E. Stead, G. Surico, M.S. Ullrich (Eds) Pseudomonas syringae and related pathogens*. Kluwer Academic Publishers The Netherlands. 483-487.
- ✓ Scortichini M., R. Liguori, M. Nobile, D. Moretti, B. Valentini, M. Egitto, e A. Leonelli, 2000. Moria del nocciolo: un triennio di prove di campo con acibenzolar-S-methyl, induttore di resistenza sistemica acquisita. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 379-384.
- ✓ Scortichini M., U. Marchesi, M.P. Rossi e P. Di Prospero, 2002a. Bacteria associated with hazelnut (*Corylus avellanae* L.) decline are of two groups: *Pseudomonas avellanae* and strains resembling *P. syringae* pv. *syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 476-484.
- ✓ Scortichini M. e M.P. Rossi, 1991. Presenza endemica di *Xanthomonas campestris* pv. *corylina* in noccioli del Lazio centrale. *Informatore Fitopatologico*, 41, 51-56.
- ✓ Scortichini M., M.P. Rossi, S. Loreti, A. Bosco, M. Fiori, R. W. Jackson, D. E. Stead, A. Aspin, U. Marchesi, M. Zini, e J. D. Janse, 2005. *Pseudomonas syringae* pv. *coryli*,

the causal agent of bacterial twig dieback of *Corylus avellana*. *Phytopathology*, 95, 1316-1324.

- ✓ Scortichini M., M. Sbaraglia, P. Di Prospero, L. Angelucci, P. Petricca, R. Tromboni, T. Mazzuca, E. Lucci, D. Moretti, B. Cirica e L. Trucca, 2001. Moria del nocciolo nel Viterbese e terreni acidi. *L'Informatore Agrario*, LVII:21, 358-363.
- ✓ Servazzi O., 1950. Brevi notizie sulla «Moria» o «Seccume» del Nocciolo gentile delle Langhe. *Nuovo Giornale Botanico Italiano*, n.s., 57, 679-682.
- ✓ Sorensen K.N., K.-H Kim e J.Y. Takemoto, 1998. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 226-230.
- ✓ Thornley M.J., 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal applied Bacteriology*, 23, 37-52.
- ✓ Tombesi A, e F. Limongelli, 2002. Varietà e miglioramento genetico del nocciolo. *Atti II° convegno nazionale sul nocciolo: le frontiere della corilicoltura italiana*, Giffoni Valle Piana (SA), 11-27.
- ✓ Tous J., 2001. World hazelnut production. *Proc. Ninth Australasian Conference on Trees and Nut Crops*. Perth, Western Australia, Aprile, 13-20.
- ✓ Tous J., 2005. Hazelnut production in Spain. *Acta Horticulturae*, 686, 659-664.
- ✓ Trotter A., 1946. Rassegna delle consultazioni e delle attività della Sez. di Patologia vegetale dell'Osservatorio di Portici (Ist. di ricerca e sperim. scient. per la fitopatologia) a tutto il 1942. *Ricerche, osservazioni e divulgazione fitopatologica per la Campania e il Mezzogiorno*, 10, 1-64.
- ✓ Trotter A., 1933. Contributi alla patologia del Nocciolo. I - Il seccume dei fusti da *Cytospora*. *Ricerche, osservazioni e divulgazione fitopatologica per la Campania e il Mezzogiorno*, 2, 17-27.
- ✓ Valentini N. e G. Me, 2002. Attualità e problematiche della coltura del nocciolo in Italia: la situazione piemontese. *Atti II° convegno nazionale sul nocciolo: le frontiere della corilicoltura italiana*, Giffoni Valle Piana (SA), 133-140.
- ✓ Van de Peer Y. e R. De Wachter, 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10, 569-570.
- ✓ Varvaro L., 1993. Le fitopatie del nocciolo nell'Alto Lazio: un triennio di osservazioni e di strategie di lotta. *Informatore Fitopatologico*, 2, 54-58.
- ✓ Varvaro L., A. Costa e G.M. Balestra, 1990. A new bacterial disease of *Corylus avellana*. *8th Int. Congr. Mediterranean Phytop. Union*. Agadir Marocco 28 oct . 3 nov. 1990. 469 . 471. Janse J.D., Rossi M.P., Angelucci L., Scortichini M., Derks J.H.J., Akkermans A.D.L., De Vrijer R., Psallidas P.G. (1996). Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. Nov.), the bacterium causing canker of hazelnut (*Corilus avellana* L.). *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 589-595.
- ✓ Vauterin L., J. Swings, K. Kersters, M. Gillis, T.W. Mew, M.N. Schroth, N.J. Palleroni, D.C. Hildebrand, D.E. Stead, E.L. Civerolo, A.C. Hayward, H. Maraite, R.E. Stall, A.K. Vidaver e J.F. Bradbury, 1990. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40, 312-316.

- ✓ Wu W.S., H.C. Wu, Y.L. Li, 2007. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for Control of *Alternaria cosmosa* and *A. patula* of *Cosmos sulfurous* (Yellow Cosmos) and *Tagetes patula* (French Marigold). *Journal of Phytopathology*, 155, 670–675.
- ✓ Yoshida S., S. Hiradate, T. Tsukamoto, K. Hatakeda, A. Shirata, 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 91, 181–187.