



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA UBALDO MONTELATICI

DOTTORATO IN BIOTECNOLOGIE MICROBICHE AGRARIE
CICLO XXIII

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie – Sez. Protezione delle piante
Settore scientifico disciplinare AGR 012

**RELAZIONI FRA VARIABILI CLIMATICO-AMBIENTALI E
STATO FITOSANITARIO DI CERRO E PINO NERO IN TOSCANA
ORGANIZZATE IN UN SIT
(SISTEMA INFORMATIVO TERRITORIALE)**

Coordinatore del Dottorato: Ch.mo Prof. Paolo Capretti

Tutore : Ch.mo Prof. Paolo Capretti

Dottorando : Matteo Feducci

30 Dicembre 2010

Ai miei genitori,
prezioso sostegno nella mia vita.

Declaration

I hereby declare that this submission is my own work and that, to the best of my knowledge and belief, it contains no material previously published or written by another person nor material which to a substantial extent has been accepted for the award of any other degree or diploma of the university or other institute of higher learning, except where due acknowledgment has been made in the text.

Matteo Feducci - 30/12/2010

A copy of the thesis will be available at <http://www.diba.unifi.it/>

Dichiarazione

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale che è stato utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'Università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

Matteo Feducci - 30/12/2010

Una copia della tesi sarà disponibile presso DiBA, sez. Protezione delle piante,
<http://www.diba.unifi.it/>

Feducci M., 2010. Relazioni fra variabili climatico-ambientali e stato fitosanitario di Cerro e Pino nero in Toscana organizzate in un SIT (Sistema Informativo Territoriale).

Riassunto

Scopo: Lo scopo del presente studio è stato quello di analizzare il ruolo di alcuni fattori climatici e pedologici coinvolti nel deperimento dei soprassuoli di Cerro e Pino nero dovuti all'azione di due patogeni opportunisti (*Biscogniauxia mediterranea*, *Diplodia pinea*) in Toscana.

Metodi e Risultati: Lo studio è stato realizzato utilizzando strumenti GIS, tecniche di biologia molecolare e dati raccolti in campo nella campagna di monitoraggio in popolamenti forestali della Toscana. I danni relativi alla chioma delle piante di Cerro e Pino nero raccolti durante la campagna di monitoraggio sono stati messi in relazione con dati pedo-climatici ottenuti da strati informativi digitali gestiti con strumenti GIS. La presenza dei due patogeni opportunisti su piante apparentemente asintomatiche individuate nei siti di monitoraggio è stata valutata mediante l'utilizzo di tecniche di diagnosi tradizionale e molecolare (Real-time PCR). I risultati ottenuti mostrano che i siti dove i fattori climatici (piogge e temperature) pedologici (quantità di sabbia, argilla, calcare, sostanza organica nel suolo) e del popolamento (diametro, altezza, posizione sociale, compressione della chioma, trasparenza del fogliame) non sono idonei per la specie vegetale considerata, le piante presentano condizioni della chioma peggiori, per alterazioni cromatiche, microfillia, perdita precoce di fogliame, disseccamenti dei rami e le quantità di DNA del patogeno opportunisto considerato ottenute dai tessuti asintomatici dell'ospite sono più elevate.

Conclusioni: I dati raccolti mostrano che nei prossimi anni in Toscana i popolamenti di Cerro e Pini nero potranno essere maggiormente attaccati dai relativi patogeni opportunisti e la sopravvivenza di alcune consociazioni o formazioni forestali potrà essere minacciata. Il cambiamento climatico causato dal surriscaldamento globale probabilmente produrrà effetti negativi sulla salute delle piante che diventeranno in futuro maggiormente suscettibili all'azione dei patogeni opportunisti.

Importanza e Utilità del presente studio: I risultati mostrano che i fattori ambientali svolgono un ruolo determinante riguardo la condizione fitosanitaria delle specie coinvolte in fenomeni di deperimento. Il presente studio costituisce un metodo semplice di gestione, tramite strumenti informatici GIS, per l'individuazione dei siti maggiormente vulnerabili agli stress abiotici e biotici per predisporre le strategie di mitigazione del problema.

Feducci M., 2010. GIS technology application on the environmental and phytosanitary relationship on *Quercus cerris* and *Pinus nigra* in Tuscany.

Abstract

Aims: The goal of this work was to investigate the influence of climatic and pedological factors involved to Turkey Oak's and Austrian Pine's decline by opportunistic fungi (*B. mediterranea*, *D. pinea*) in Tuscany, central Italy.

Methods and Results: The study was performed using GIS technology, molecular biology techniques and phytosanitary data collected during monitoring activity.

The crown damage data (discoloration, microfilia, dying/dieback of branches) of Turkey Oak and Austrian Pine collected during monitoring activity in Tuscan forestry were related to climatic and pedological factors obtained from numeric maps management by GIS software. The occurrence of the two opportunistic fungi in asymptomatic phase in plants growing in the monitoring site were evaluated using Real-time PCR technique and traditional methods.

Results showed that in the sites where climatic (rainfall and temperature), pedological factors (amount in the soil of sand, clay, limestone, organic matter) and forestry parameters (diameter, height, social class, crown shading, foliage transparency) were not suitable for the tree species, the crown damages were heavier and amount of fungal DNA by opportunistic species in asymptomatic samples of the hosts were higher.

Conclusions: Changing in climate conditions caused by global warming probably will have sanitary consequences on trees species that will become more vulnerable to opportunistic fungi. Data suggest that in the future in Tuscany forest populations of Turkey Oak and Austrian Pine will be more affected than in the present by opportunistic fungi thus the survival of some forest type will be threaten.

Significance and Impact of the Study: The results suggest that environmental factors play an important role in phytosanitary conditions of trees species affected by decline phenomenon. The present study perform a simple methods management by GIS technology method to identify the most vulnerable sites for abiotic/biotic stresses where mitigation strategy could be to planned.

Indice

Premessa	10
1. Il fenomeno del global change	10
1.1 Il global change e la patologia vegetale	12
2. I patogeni opportunisti	13
2.1 Il concetto di endofita ed endofitismo	14
2.2 Il fenomeno dell'endofitismo	14
2.3 <i>Biscogniauxia mediterranea</i> (De Not) O. Kuntze	15
2.4 <i>Diplodia pinea</i> (Desm.) Kickx	17
3. La diagnosi molecolare	18
3.1 Uso della PCR (Polymerase Chain Reaction) nella diagnosi molecolare	19
3.2 Altre tecniche di PCR ed il loro impiego in patologia vegetale	20
4. GIS (Geographical Information System)	23
4.1 Definizione di GIS	23
4.2 Storia del GIS	23
4.3 La struttura di un GIS ed i principali usi nelle scienze ambientali	24
5. Scopo del presente studio	25
6. Raccolta e valutazione di dati ambientali	26
6.1 Scopo del lavoro	26
6.2 Materiali e metodi	26
6.3 Risultati	29
6.4 Discussione	33
7. Monitoraggio fitosanitario dei popolamenti montani	34
7.1 Scopo del lavoro	34
7.2 Materiali e metodi	34
7.2.1 Scelta delle aree	34
7.2.2 Raccolta dati in campo	36
7.3 Risultati	37
7.3.1 Monitoraggio delle aree di Cerro	37
7.3.2 Monitoraggio delle aree di Pino nero	44
7.4 Discussione	52
Cerro	52
Pino nero	53

8. Relazione fra dati del monitoraggio e presenza di patogeni fungini valutate con metodi molecolari	55
8.1 Scopo del lavoro	55
8.2 Materiali e metodi.....	55
8.2.1 Materiale vegetale.....	55
8.2.2 Preparazione dei campioni	56
8.2.3 Protocollo Real-Time PCR per <i>Biscogniauxia mediterranea</i>	56
Primers e probe (<i>B. mediterranea</i>)	56
Condizione di amplificazione (<i>B. mediterranea</i>)	57
Curva standard (<i>B. mediterranea</i>)	57
Standardizzazione dei risultati (<i>B. mediterranea</i>)	57
8.2.4 Protocollo Real-Time PCR per <i>Diplodia Pinea</i>	58
Primers e probe (<i>D. pinea</i>)	58
Condizione di amplificazione (<i>D. pinea</i>)	58
Curva standard (<i>D. pinea</i>)	58
Standardizzazione dei risultati (<i>D. pinea</i>)	58
8.3 Risultati	59
8.3.1 Isolamenti in vitro - Cerro	59
8.3.2 Real-Time PCR - Cerro.....	60
8.3.3 Isolamenti in vitro - Pino nero.....	63
8.3.4 Real-Time PCR - Pino nero.....	65
8.4 Discussione	68
9. Relazioni fra variabili climatiche e stato fitosanitario di Cerro e Pino nero in Toscana organizzate in un SIT (sistema informativo territoriale)	69
9.1 Scopo del lavoro	69
9.2 Materiali e metodi.....	69
9.3 Risultati	70
9.3.1 Dati meteo-ambientali, dati di monitoraggio, analisi di laboratorio - Cerro.....	70
9.3.2 Dati meteo-ambientali, dati di monitoraggio, analisi di laboratorio - Pino nero.....	74
9.4 Discussione	78
Cerro	79
Pino nero	80
10. Conclusioni	81
Allegati	96

Allegato I : Cartografia tematica - DEM (Digital ElevationModel).	97
Allegato II : Cartografia tematica - carta delle pendenze.	98
Allegato III : Cartografia tematica - carta pedologica. (Regione Toscana - Direzione Generali Sviluppo Economico, Settore Programmazione Forestale, modificato).	99
Allegato IV : Scheda di rilievo utilizzata per la raccolta delle informazioni quali- quantitative delle piante monitorate.	100

Premessa

Nel corso della storia l'uomo ha dovuto affrontare numerose sfide che spesso ha risolto attraverso il suo ingegno e la conoscenza scientifica. Dopo la fine dei grandi conflitti mondiali con l'avvento della società industriale prima e di quella tecnologica adesso, le sfide principali sono state per lo più affrontate per consentire un miglioramento della qualità della vita a livello mondiale.

Dalla fine degli anni '60 del XX secolo, in risposta ad un intenso e sregolato uso delle risorse naturali, il pensiero ecologista si diffonde velocemente dai laboratori di ricerca, permeando le strutture socio-economiche di tutti i principali paesi industrializzati mondiali e strutturandosi come un vero e proprio movimento di pensiero fino a porre delle vere e proprie basi filosofiche che lo hanno portato ad essere ciò che oggi i suoi principali esponenti, Arne Naess, George Sessions, Bill Devall, Warwick Fox, Alan Drengson o Robyn Eckersley, solo per citarne alcuni, ci espongono (Carson, 1999; Devall, 1980; Devall, 1991; Naess, 1973; Sessions, 1987; Warwick, 2006).

Sebbene oggi possa sembrare scontato, alcuni comportamenti ritenuti ecocompatibili, sono il frutto di un lungo processo di maturazione dei popoli che ha portato alla creazione di una "coscienza ambientale".

Nel corso degli anni questa "coscienza" si è confrontata con importanti interrogativi in merito alle attività umane che avrebbero comportato una radicale alterazione dell'ambiente per come noi lo conosciamo. Negli anni '60 e '70 l'attenzione è stata catalizzata sulle armi nucleari e sull'utilizzo civile dell'energia nucleare, negli anni '80 si è ampiamente parlato delle piogge acide, negli anni '90 del problema del buco dell'ozono e della deforestazione e attualmente si discute del cambiamento climatico e del riscaldamento globale.

Il fenomeno del "global change" è decisamente complesso e dai contorni ancora poco definiti tanto che lascia aperte ampie discussioni anche nelle sedi scientifiche più autorevoli. L'elemento unanimemente più condiviso è che un cambiamento degli andamenti climatici a livello globale, sia esso nel breve o nel medio periodo, comporterà inevitabilmente un conseguente cambiamento negli attuali assetti mondiali a livello socio-economico, con una conseguente ridefinizione dei rapporti tra le nazioni.

1. Il fenomeno del global change

Con l'espressione global change si intende quel complesso di fenomeni che concorrono a determinare un cambiamento nell'andamento medio dei fattori ecologico-climatici. In modo improprio oggi si tende invece ad identificare con queste parole per lo

più il fenomeno del global warming ossia il riscaldamento climatico dovuto al contributo antropico soprattutto dal periodo della società industriale ad oggi. Sebbene sia difficile stimare con precisione le conseguenze del riscaldamento globale è ormai comunemente riconosciuto che tale fenomeno stia incidendo su molti ecosistemi (Aber, 2001).

Nell'ultimo report dell'Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2007) la comunità scientifica ha raccolto tutti i dati e le conoscenze disponibili per definire l'evoluzione del fenomeno e quantificare i benefici delle strategie mitiganti messe in atto sino ad oggi.

Dal documento emerge che molti ecosistemi si stanno velocemente contraendo con conseguente perdita di biodiversità. I dati quali-quantitativi rilevati in varie aree dell'Artide e dell'Antartide a seguito dell'innalzamento delle temperature rivelano un progressivo allargamento e incremento numerico dei laghi glaciali, un aumento di instabilità del terreno nelle regioni con permafrost, un cambiamento negli ecosistemi mare-ghiaccio e importanti modifiche agli alti livelli (predatori) delle catene trofiche di questi ecosistemi.

Il ciclo dell'acqua risulta alterato in molte regioni dove si osserva un aumento del run-off e un progressivo anticipo del picco primaverile di scarico di molti fiumi alimentati dai ghiacciai e nevai. In molte aree del pianeta il riscaldamento dei laghi e dei fiumi ha portato ad una alterazione sulla struttura termica e sulla qualità dell'acqua.

Studi condotti su un vasto numero di specie animali e vegetali hanno sottolineato come si verifichi un progressivo anticipo degli eventi primaverili come la fioritura, la migrazione degli uccelli e la deposizione delle uova e uno spostamento delle specie verso il polo e verso le alte latitudini.

In molti sistemi biologici marini ed acquatici è ormai accertato che l'aumento delle temperature ha comportato modificazioni nella disponibilità di ittiofauna, plancton e alghe alle alte altitudini degli oceani e che ha prodotto un'anticipazione temporale nelle migrazioni dei pesci nei fiumi.

Nel documento si riporta inoltre che circa il 90% delle 29.000 serie di dati osservati provenienti da 75 studi con finalità diverse, concordano su un significativo cambiamento nei sistemi fisici e biologici a seguito del contributo del riscaldamento per attività antropogenica, in opposizione alle resistenze di chi ancora asserisce che il riscaldamento globale sia legato alla fase di transizione interglaciale che il pianeta sta attraversando.

Secondo gli scenari ottenuti con i modelli di simulazione approntati all'interno dell'IPCC per il secolo in corso si ipotizza un aumento della media annuale del run-off dei fiumi e della disponibilità idrica tra il 10% ed il 40% alle alte latitudini ed in aree tropicali, in

contrapposizione con una diminuzione del 10-30% in alcune regioni aride alle medie altitudini e nelle zone secche dei tropici. Alcune zone soggette ad aridità diventeranno aree desertiche e altre ritenute oggi a rischio diventeranno soggette a stress idrici con periodicità permanente. In altre zone del globo l'aumento nella frequenza e nella quantità delle precipitazioni aumenterà il rischio di inondazioni.

La riserva idrica contenuta nei ghiacciai andrà progressivamente diminuendo provocando forti disagi nelle catene montuose dove le popolazioni vivono grazie a questa risorsa (circa 1/6 dell'attuale popolazione mondiale).

Le simulazioni indicano che molti ecosistemi esauriranno la loro resilienza in seguito all'azione combinata dei numerosi fattori di disturbo legati al mutamento climatico (inondazioni, siccità, incendi, insetti, acidificazione degli oceani, cambiamenti uso del suolo, inquinamento, sovrasfruttamento delle risorse) con conseguente perdita delle ecocenosi in essi presenti. La capacità di stoccare carbonio delle fitocenosi raggiungerà un picco alla metà del secolo per poi stabilizzarsi o nel caso peggiore invertirsi se le stime dell'aumento delle temperature dovessero essere superiori al previsto. In questo ultimo caso, oltrepassando i valori ipotizzati di 1,5-2,5 °C di surriscaldamento della temperatura media globale, i modelli simulano cambiamenti decisamente pessimistici per la sopravvivenza di molti ecosistemi, per la perdita di biodiversità e di risorse naturali, con conseguenti carenze di acqua e di cibo per l'uomo.

1.1 Il global change e la patologia vegetale

Nel campo della patologia forestale le anomalie climatiche hanno fatto concentrare l'attenzione sulle specie aliene invasive e sui patogeni opportunisti. Le prime, a seguito delle variazioni termo-pluviometriche possono allargare i loro areali di diffusione, mentre i secondi, possono trovare condizioni maggiormente favorevoli per esprimere le loro capacità patogene nei loro attuali areali d'insidenza.

Se nel caso delle specie aliene invasive uno dei principali fattori influenti per la diffusione sono le attività umane di spostamento di merci e persone, per quanto riguarda i patogeni opportunisti le fluttuazioni nei regimi termo-pluviometrici e gli stress da essi derivati, hanno contribuito ad aumentare la sensibilità degli ecosistemi. Molti ricercatori negli ultimi anni hanno segnalato danni ai soprasuoli forestali dovuti soprattutto ai patogeni opportunisti (Dale et al., 2001; Garrett et al., 2006) e spesso questi eventi trovano una relazione con il cambiamento climatico in atto (Desprez-Loustau et al., 2007).

Questo ha fatto sì che negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si sia maggiormente concentrata su come il cambiamento climatico influisca sulle interazioni tra gli organismi

piuttosto che sugli adattamenti dei singoli organismi al cambiamento climatico (Chapela e Boddy, 1988).

Grazie anche al recentemente miglioramento degli strumenti informatici è stato possibile condurre studi di epidemiologia su vasta scala e realizzare simulazioni per la diffusione di alcuni dei patogeni più dannosi. A tal proposito, un recente studio è stato condotto da un team di ricercatori francesi (Desprez-Loustau et al., 2007) che partendo da una serie di conoscenze in merito all'ecologia di alcuni organismi patogeni e applicando gli scenari ipotizzati dall'IPCC opportunamente contestualizzati alla realtà dello stato francese, ottengono interessanti risultati.

Considerando soprattutto i patogeni fogliari e quelli legati alle porzioni epigee delle piante forestali per i quali gli effetti delle variazioni climatiche sono direttamente influenti, il gruppo francese osserva che per *Melampsora pinitorqua*, tipico patogeno dei climi temperato-umidi, il surriscaldamento globale produrrà una contrazione dell'areale di diffusione della malattia, mentre per le specie termofile, come ad esempio *Cryphonectria parasitica*, *Mycosphaerella pini* e *Phytophthora cinnamomi* si avrà una frammentazione dell'areale. Dove si manterranno primavere piovose con l'aumento delle temperature si avrà una maggior diffusione della malattia, ma oltre una certa soglia di deficit idrico primaverile non si verificheranno più le condizioni idonee alla germinazione delle spore del fungo, con un conseguente effetto negativo sulla diffusione del patogeno. Nel caso di patogeni opportunisti con comportamento endofita come *Biscogniauxia mediterranea* e *Diplodia pinea* si osserva invece un trend crescente all'aumentare delle temperature medie stagionali, questo dovuto all'ecologia dei microrganismi fortemente legata a situazioni di stress idrico.

2. I patogeni opportunisti

Con i termini patogeno opportunisto (opportunistic pathogen) nelle scienze biologiche ci si riferisce ad un'ampia coorte di microrganismi (batteri, funghi, virus, protozoi) che in condizioni di salute dell'organismo ospite non sono in grado di produrre malattia, ma possono invece generare un'infezione se le difese immunitarie risultano indebolite o totalmente compromesse.

Nel caso della patologia vegetale si parla spesso di patogeni opportunisti in riferimento a quei miceti che si avvantaggiano di mutate condizioni nelle difese dell'ospite vegetale per poter produrre l'infezione. Questi microrganismi spesso conducono gran parte della loro esistenza come saprotrofi, oppure protetti in forme di resistenza nell'ambiente. Nel momento in cui si verificano dei cambiamenti della fisiologia dell'ospite a causa di mutate

condizioni ambientali che comportano un abbassamento delle difese della pianta, tali organismi sono capaci di sorpassare le barriere difensive dell'ospite e dare il via al processo infettivo. Alcuni patogeni opportunisti possono inoltre avere un comportamento endofitico, cioè attendere il momento dell'abbassamento delle difese dell'ospite già all'interno dei suoi tessuti e qui rimanere in fase latente.

2.1 Il concetto di endofita ed endofitismo

La parola endofita deriva dal greco “endon” interno, dentro e “phyton” pianta, quindi in senso letterario con tale termine ci si riferisce ad un “organismo che vive all'interno di una pianta”. Comunemente gli organismi associati con il termine endofita sono per lo più funghi e batteri (Fahey et al., 1991; Ragazzi et al., 2004). Attualmente il mondo scientifico non è concorde sull'uso della parola endofita per tutte le entità fungine che comunque rientrano nella definizione suddetta (Wilson., 1995) ed in alcuni casi è preferita l'espressione di microrganismi in fase latente o microrganismi latenti (Stanosz, 1997). Sia che si utilizzi un'espressione o l'altra, resta in entrambi i casi il concetto comune che un organismo fungino stabilisce un'interazione intima con un ospite vegetale. Questa interazione può essere catalogata nell'ambito delle comuni simbiosi ecologiche (neutralismo, mutualismo, commensalismo e parassitismo) e rimanere stabile nel tempo, ma anche evolvere in un certo momento della vita dei due simbiotici. In questo panorama un endofita potrà avere un comportamento neutrale nei confronti dell'ospite per un lasso temporale più o meno lungo ed in seguito cambiare i suoi rapporti con la pianta trasformandosi in un parassita esattamente come un comune agente patogeno.

2.2 Il fenomeno dell'endofitismo

In campo forestale l'interesse per l'endofitismo ed in particolare per l'endofitismo patogeno risulta piuttosto recente in quanto solo dagli anni '80 in poi il numero di studi su questo argomento si è fatto più consistente (Ragazzi et al., 2004).

Sebbene le conoscenze acquisite siano molte, il campo di ricerca risulta ancora vasto, soprattutto per quanto riguarda i processi che permettono all'endofita di capire qual è il momento idoneo per attivare i suoi meccanismi di patogenesi. Molti studi condotti su differenti entità fungine hanno messo in evidenza come i fattori ambientali giochino un ruolo decisivo in questi patosistemi.

Fattori ecologici di varia natura quali siccità, fuoco, grandine, gelo o altri agenti biotici comportano uno stress per la pianta che attiva risposte metaboliche di difesa che conseguentemente sono il segnale per l'endofita per manifestare la sua natura parassitaria.

Numerosi studi, condotti soprattutto su piante agrarie hanno messo in evidenza come la pianta possa attivare prontamente vie metaboliche alternative per produrre nuove molecole con specifiche funzioni di resistenza agli stress.

Nei confronti dello stress idrico è stato osservato che molte specie vegetali sono capaci di attivare una via metabolica alternativa per la produzione dell'aminoacido prolina, ritenuto ad oggi uno dei più efficienti osmoprotettori degli organismi vegetali. È stato osservato che in condizioni di normalità la prolina è prodotta dalla via metabolica dell'ornitina, ma che in seguito alla percezione di uno stress idrico la pianta produce l'aminoacido a partire dall'acido glutammico. Questa seconda via metabolica risulta quantitativamente più efficiente e più veloce, in quanto regolata da un minor numero di enzimi, garantendo una miglior prontezza nella risposta allo stress idrico (Forlani e Scainelli, 1998).

In cloni di pioppo tremulo americano (*Populus tremuloides*) in condizioni di stress idrico è stato osservato che l'aminoacido prolina è accumulato oltre i normali quantitativi nei tessuti (Belanger et al., 1990). Altri studi hanno dimostrato che proprio elevati quantitativi dell'aminoacido, stimolano la crescita del fungo *Entoleuca mammata*, famiglia delle *Xylariaceae*, responsabile del cancro corticale del pioppo (Griffin et al., 1986).

Altri studi mostrano invece come la presenza di endofiti nei tessuti vegetali possa potenziare le difese dell'ospite nel caso di altri patogeni o insetti. Osservazioni condotte su piante di *Pinus monticola* mostrano che la presenza di endofiti nei tessuti vegetali aumenta la capacità di resistere all'infezioni da parte di *Cronartium ribicola*, agente patogeno responsabile della ruggine vescicolosa (Ganley et al., 2008).

Altre esperienze condotte su Pino marittimo mettono in evidenza che piante sottoposte a stress da freddo e carenze idriche tendono ad accumulare acido jasmonico nei tessuti (Pedranzani et al., 2008), mentre altri studi riportano che tale acido è coinvolto nei meccanismi di difesa della pianta da agenti di danno come l'insetto *Hylobius abietis* (Heijari et al., 2005; Heijari et al., 2008) o i funghi *Ceratocystis polonica* (Krokene et al., 2008) e *Pythium ultimum* (Kozłowski et al., 1999).

2.3 *Biscogniauxia mediterranea* (De Not) O. Kuntze

Biscogniauxia mediterranea (De Not) O. Kuntze è un ascomicete appartenente alla Famiglia *Xylariaceae*.

Il fungo è stato spesso associato al deperimento dei querceti, fenomeno piuttosto diffuso nel Nord e Centro America, in Europa, in Nord Africa ed in Russia (Desprez-Loustau et al., 2006; Desprez-Loustau et al., 2007; Vannini et al., 1996c; Wargo, 1996) che interessa particolarmente il genere *Quercus*. All'interno di questo genere gli ospiti sui quali è stata

segnalata la presenza del patogeno sono per lo più querce caducifoglie come la farnia, la roverella, il Cerro, il farnetto (Ragazzi et al., 1989), ma non mancano anche i ritrovamenti su querce sclerofille sempreverdi quali il leccio e la sughera (Torres, 1985).

La sintomatologia legata all'azione di questo ascomicete è controversa in quanto spesso lo si trova associato con altri funghi endofiti o patogeni e talvolta presenta caratteri comuni con danni legati allo stress idrico (Desprez-Loustau et al., 2006). Molti autori hanno comunque osservato sintomi comuni su specie diverse che sono ritenuti piuttosto identificativi dell'infezione di *B. mediterranea*. Il fungo è capace di produrre sul fusto e sui rami degli ospiti cancri corticali, con conseguenti disseccamenti delle porzioni legnose sovrastanti la zona infetta ed un progressivo deperimento della chioma. In seguito alla colonizzazione dell'ospite il patogeno produce strutture crostose nerastre, simili a porzioni di legno bruciato, che erompono da sotto i tessuti corticali. Questi stromi crostosi hanno fatto indicare *B. mediterranea* come l'agente responsabile della malattia del cancro carbonioso. Da questi stromi nerastri il patogeno differenzia le forme di propagazione, conidi e/o ascospore, che si liberano nell'ambiente e costituiscono la principale forma di propagazione del fungo (Chapela e Boddy, 1988; Manion e Griffin, 1996; Vannini et al., 1996b). E' stato inoltre osservato che la presenza di una abbondante produzione di rametti epicormici sul fusto può essere legato all'azione del patogeno e che in alcune circostanze è frequente rinvenire alla base delle piante colpite essudazioni nerastre.

E' specie termofila ed è stato più volte dimostrato come il comportamento di questo micete sia legato a condizioni di siccità della stazione in cui è stato rinvenuto (Vannini et al., 1994);).

B. mediterranea svolge parte del suo ciclo vitale in fase latente all'interno dei tessuti dell'ospite senza manifestare la sua presenza, ma esprime velocemente il suo carattere patogeno al momento che l'ospite manifesta stati di sofferenza legati ad altri fattori di disturbo sia biotici che abiotici.

Vannini e Scarascia Mugnozza hanno osservato che *B. mediterranea* causa danni a piantine inoculate artificialmente e sottoposte a stress idrico, ma non in quelle non stressate e che il potenziale idrico misurato in campo su piante sane, sia prima dell'alba che a mezzogiorno, risultava essere più basso in stazioni dove l'incidenza della malattia era maggiormente elevata (Vannini e Scarascia Mugnozza, 1991). In un'altra esperienza Vannini riporta che nell'Italia centro-meridionale le recenti modificazioni nei regimi pluviometrici e le conseguenti condizioni di stress idrico, soprattutto durante la stagione estiva, favorivano la presenza di *B. mediterranea* che, causando maggiori morie a carico

del Cerro, specie maggiormente sensibile, alteravano la mescolanza dei querceti misti a favore delle specie più xerotolleranti come la roverella (Vannini et al., 1996c).

Capretti e Battisti hanno indagato le interazioni di differenti stress indotte artificialmente su piantine di Cerro in condizioni di crescita controllate. Gli autori osservavano che la probabilità di isolare il fungo dai tessuti di piante infettate artificialmente era più elevata in piante sottoposte a stress idrico e defogliazione dovuta ad insetti, più bassa in piante soggette solo a deficit idrico e soltanto occasionale in piante inoculate, ma regolarmente innaffiate (Capretti e Battisti, 2007).

In virtù di quanto detto alcuni autori hanno attribuito a *B. mediterranea* la funzione di bioindicatore di situazioni di stress idrico.

2.4 *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx

Diplodia pinea (Desm.) Kickx è un fungo mitosporico appartenente alla famiglia *Botryosphaeriaceae*.

Il fungo è diffuso in ogni continente ricalcando l'areale naturale e quello di diffusione antropica del genere *Pinus* (Swart et al., 1985), ma ci sono state anche segnalazioni sul genere *Abies*, *Cedrus*, *Juniperus*, *Picea*, *Pseudotsuga* (Stanosz e Carlson, 1996) e *Cupressus*, (Intini et al., 2005). La sintomatologia con cui questo patogeno si presenta è piuttosto varia e dipendente dall'organo vegetale interessato e dalla specie ospite colpita (Swart e Wingfield, 1991). Causa principalmente disseccamento dei getti, ma anche degli aghi e dei rami. E' agente di cancro sui rami e conseguente resinazione degli organi colpiti e nel caso si diffonda nei tessuti legnosi può dar luogo a fenomeni di azzurramento del legno (Swart et al., 1987a). In giovani piante è capace di produrre la necrosi e morte del colletto (Palmer e Nicholls, 1985; Stanosz e Carlson, 1996). Nel caso del Pino domestico (*Pinus pinea*) è l'agente responsabile del fenomeno delle pine pagliose e/o gallerone (Petri e Adani, 1916; Verona, 1950) ed in Sud Africa su *Pinus eliottii* e *Pinus taedae* è stato osservato essere anche un agente di marciume radicale (Wingfield e Knox-Davies, 1980).

Il fungo si diffonde mediante conidi liberati dalle strutture riproduttive che sono prodotte sulle porzioni di pianta infette ormai morte (aghi, germogli, rami, strobili). Il patogeno ha una buona capacità di sopravvivenza in fase saprotrofa nei tessuti morti o nelle porzioni infette dei suoi ospiti rimaste nell'ambiente dopo la morte della pianta ed è in grado di colonizzare i tessuti vivi precocemente, rimanendovi a lungo in fase latente (Stanoz et al., 1997). Questo comportamento del fungo ha causato soprattutto in America estese morie ai soprassuoli di Pino, che nonostante trattamenti e cure colturali continuavano periodicamente a manifestare i sintomi della malattia e nel giro di pochi anni presentavano estese morie

(Flowers et al., 2001). Anche in vivaio la capacità del patogeno di rimanere in fase latente in tessuti dove anche gli antiparassitari sistemici risultavano di difficile traslocazione ha vanificato programmi di controllo della malattia comportando ingenti perdite economiche (Palmer et al., 1986).

Molti studi hanno messo in evidenza come l'incidenza della malattia sia dipendente oltre che dagli elementi intrinseci al patosistema, quali l'ospite ed il patogeno, soprattutto dai fattori ambientali, come gli scompensi nutrizionali (Stanosz et al., 2004), la grandine (Nicholls e Ostry, 1990), l'umidità (Swart et al., 1987b), la siccità (Bachi e Peterson, 1985) e l'attacco di insetti dannosi appartenenti alle famiglie *Scolytidae* e *Curculionidae* (Zwolinski et al., 1995).

3. La diagnosi molecolare

I patologi vegetali nel corso degli anni si sono avvalsi di tecniche relativamente semplici per la diagnosi delle entità fungine. Queste tecniche ancora oggi utilizzate presentano il problema di una incertezza piuttosto elevata nella diagnosi e tempi eccessivamente lunghi per l'ottenimento dei risultati. Con l'aumentare delle conoscenze e della tecnica, nel corso degli ultimi venti anni a questi sistemi tradizionali se ne sono affiancati altri più raffinati e veloci quali quelli sierologici e molecolari cioè basati sulla capacità di maneggiare gli acidi nucleici degli organismi. Questi ultimi sono stati sviluppati in campo medico per la diagnosi di malattie umane, ma nel tempo hanno trovato applicazione anche nel campo della patologia vegetale.

Il successo di questi nuovi sistemi è stato determinato dalla loro velocità di applicazione fornendo risposte più accurate. Inoltre il fatto di poter lavorare direttamente con le molecole degli acidi nucleici (DNA ed RNA), ha permesso di superare numerosi ostacoli di carattere pratico insiti nei metodi tradizionali, ampliando enormemente le frontiere della ricerca. Seguendo opportuni protocolli sperimentali grazie a kit commerciali è possibile isolare gli acidi nucleici dell'organismo bersaglio. In seguito tali campioni sono processati mediante l'utilizzo di varie apparecchiature, a seconda dello scopo prefissato, ma che hanno in comune la capacità di effettuare la "reazione di polimerizzazione a catena" del DNA, dall'inglese Polymerase Chain Reaction (PCR) scoperta per la prima volta nel 1983 da Kary Mullis (Mullis et al., 1986).

3.1 Uso della PCR (Polymerase Chain Reaction) nella diagnosi molecolare

La scoperta fatta da Mullis partì dall'osservazione delle caratteristiche chimico-fisiche dell'enzima coinvolto nelle fasi di replicazione della doppia elica di DNA (DNA polimerasi). La scoperta di una polimerasi prodotta dal batterio *Thermus aquaticus*, capace di resistere alle alte temperature permise a Mullis ed ai suoi colleghi di rendere la reazione di polimerizzazione del DNA "a catena" (Mullis, 1990) oltre a garantire una miglior denaturazione della doppia elica aumentando la sensibilità della reazione.

Per il corretto svolgimento della PCR nello stesso ambiente devono essere presenti gli elementi fondamentali del processo:

- una quantità di DNA che si desidera riprodurre;
- un enzima DNA polimerasi non necessariamente proveniente dallo stesso organismo di cui si deve replicare il materiale nucleico;
- una quantità di nucleotidi liberi sottoforma di deossiribonucleosidi trifosfati (dNTPs), utili all'enzima per la costituzione dei nuovi filamenti;
- una quantità di brevi sequenze di nucleotidi (oligonucleotidi) denominati primers che siano complementari agli estremi 5' e 3' del segmento da riprodurre di DNA. Tali primers denominati forward e reverse in funzione della posizione di appaiamento con le estremità del DNA, servono da "innescò" per la reazione;
- una miscela di altri elementi di supporto quali ad es. gli ioni magnesio, necessari per costituire l'ambiente adatto alla reazione.

E' inoltre necessario che siano mantenuti livelli di temperatura e pH idonei al corretto svolgimento della reazione.

La PCR è stata convenzionalmente divisa in 3 fasi principali:

1. Denaturazione: la miscela composta dal DNA da replicare, dai nucleotidi, dagli ioni magnesio, dai primers e dalla DNA polimerasi è riscaldata e portata a temperature comprese tra 94 e 99°C in modo che la doppia elica di DNA che agisce da stampo sia completamente scissa ed i due filamenti di cui essa è composta siano liberi;
2. Annealing o appaiamento: la temperatura è abbassata fino a 40-65°C circa per permettere ai primers di legarsi alle regioni dei filamenti di DNA denaturati a loro

- complementari. La scelta di opportune temperature della fase di annealing da parte dell'operatore può determinare una maggior specificità di appaiamento dei primers;
3. **Prolungamento:** la temperatura è portata fino a 65-72°C circa, per favorire l'azione della DNA polimerasi che determina un allungamento dei primers legati, aggiungendo i nucleotidi complementari dalla miscela circostante, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA denaturato.

Queste tre fasi vengono ripetute in sequenza per un numero definito di cicli da apposite macchine dette termociclatori, producendo una quantità di DNA utile all'analisi. La reazione a catena è generalmente arrestata intorno ai 50 cicli poiché oltre una certa quantità di DNA prodotto, l'efficienza della reazione decrementa vertiginosamente sino ad arrestarsi.

La parte che invece risulta ancora piuttosto laboriosa e influenzata dall'esperienza dell'operatore è quella legata alla preparazione della miscela di sostanze necessarie per lo svolgimento della PCR, l'ottimizzazione del protocollo sperimentale. In questa fase uno degli elementi maggiormente controversi da determinare è la quantità di DNA bersaglio del quale si vuole ottenere l'amplificazione. Data l'elevata sensibilità della tecnica per effettuare una PCR si può utilizzare teoricamente quantità molto basse di DNA bersaglio (una quantità di DNA genomico di 100 ng è già sufficiente per identificare un gene bersaglio che è presente in una singola copia). Per determinare la quantità di DNA ottenuta durante il processo di estrazione si ricorre ad uno spettrofotometro, un'apparecchiatura che permette di misurare un'aliquota dell'estratto dalla quale è possibile desumere il contenuto di acidi nucleici e la loro qualità (purezza del materiale estratto).

Piuttosto importante risulta anche la specificità dei primers utilizzati, dato che questa determina l'accuratezza dell'amplificazione del materiale genomico dell'organismo bersaglio. Attualmente i primers possono essere realizzati consultando apposite banche dati genomiche (DDBJ, EMBL, GenBank) nelle quali ricercare le sequenze nucleotidiche d'interesse per la sua progettazione o nel caso esse non siano disponibili si può ricorrere ad un completo sequenziamento per le zone d'interesse del patrimonio genico dell'organismo bersaglio.

3.2 Altre tecniche di PCR ed il loro impiego in patologia vegetale

Alla PCR tradizionale hanno fatto seguito un certo numero di varianti diverse della tecnica "standard" che permettono di ottenere ulteriori informazioni, ne potenziano l'efficienza, o risultano particolarmente utili in particolari settori della ricerca.

Tra le principali varianti si ricorda:

- hot start PCR: analoga alla tecnica originaria, ma che prevede l'inserimento dell'enzima DNA polimerasi quando la temperatura della miscela di PCR è già elevata ossia a denaturazione della doppia elica già avvenuta. Questa variante diminuisce la formazione di dimeri, migliorando l'efficacia complessiva della reazione;
- nested PCR: differisce dalla PCR classica per il fatto che si usano due coppie di primers specifici. La prima coppia (meno specifica per l'organismo bersaglio) produce una prima quantità di amplificato detto amplicone sulla quale la seconda coppia di primers (maggiormente specifici) lavora aumentando così la sensibilità e la specificità complessiva della reazione;
- multiplex PCR: tecnica che permette la possibilità di lavorare contemporaneamente con più organismi bersaglio. Nella miscela di PCR sono introdotti più coppie di primers ognuna specifica per ogni organismo bersaglio. Questo permette di ridurre il numero di PCR da dover realizzare in caso di studi particolarmente vasti, diminuendo i costi del lavoro;
- real-time PCR: questa tecnica permette di quantificare nel momento dell'amplificazione stessa, la quantità di acidi nucleici dell'organismo bersaglio. Questo è possibile grazie all'inserimento nella miscela di PCR di un fluoroforo, ossia di una molecola capace di emettere fluorescenza se eccitata. Tali molecole possono legarsi ai primers detti probe (sonda) nella chimica TaqManTM (fig. 1), oppure intercalarsi all'amplificato nella chimica SYBR[®] Green (fig. 2). Il termociclature Real-time irraggia ad ogni ciclo gli amplificati e ne registra la fluorescenza emessa che risulta essere direttamente proporzionale alla quantità di acidi nucleici prodotti. Con il software allegato alla macchina è poi possibile ottenere la quantificazione precisa dei prodotti di PCR ed altre informazioni utili in merito all'analisi.

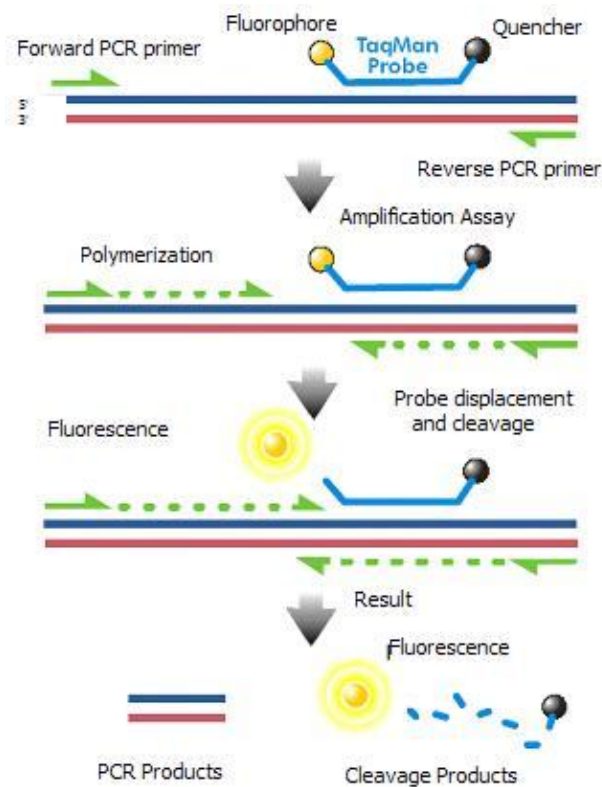


Figura 1. Meccanismo di funzionamento della Real-time PCR con chimica TaqMan™ (URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Taqman.png>)

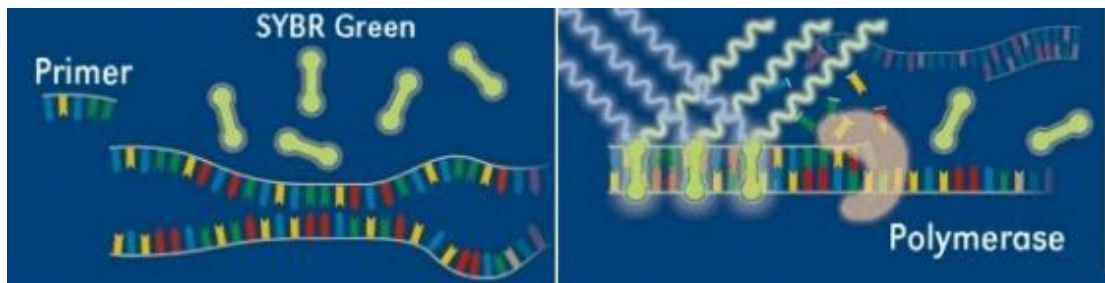


Figura 2. Meccanismo di funzionamento della Real-time PCR con chimica SYBR® Green (URL: <http://www.dkfz.de/gpcf/lightcycler480.html>)

Negli ultimi venti anni tutte le tecniche di biologia molecolare sono state ampiamente utilizzate nella diagnosi fitopatologia sia per studi filogenetici, che per la diagnosi preventiva o nella protezione delle colture (Martin, 2000; McCartney et al., 2003; Haugland et al., 2002), ma l'utilizzo della Real-time PCR risulta particolarmente utile per la sua elevata sensibilità (Scheda et al., 2004). La capacità di rilevare quantità infinitesimali di materiale genico e poterne quantificare l'entità istantaneamente, permette infatti di diagnosticare la presenza di un agente patogeno anche nelle prime fasi del processo infettivo o nel caso degli endofiti patogeni, quando questi risultano ancora in fase latente all'interno dei tessuti della pianta ospite (Luchi et al., 2005a; Luchi et al., 2005b; Luchi et al., 2006; Scheda et al., 2004).

4. GIS (Geographical Information System)

4.1 Definizione di GIS

L'acronimo GIS, Geographical Information System, ha assunto nel corso degli anni numerose definizioni non univoche che tendevano a sottolineare, ognuna, maggiormente un aspetto dell'argomento trattato. A questo fatto si aggiunge che in alcuni casi si è cercato di tradurre e adattare la terminologia anglosassone con quella di altri paesi aumentando le fonti di incertezza.

Le definizioni storicamente più utilizzate descrivono un GIS come “una potente serie di strumenti per acquisire, memorizzare, estrarre a volontà, trasformare e visualizzare dati spaziali dal mondo reale” (Burrough, 1986) o ancora come “un sistema computerizzato basato su 4 gruppi di procedure che permettono l'immissione, la gestione (archiviazione e recupero), la manipolazione e analisi e la produzione di nuovi dati georiferiti (Aronoff, 1989). Una più recente definizione include nelle componenti che costituiscono un GIS, anche le risorse umane che operano con gli strumenti informatici asserendo così che “un sistema informativo geografico è un insieme organizzato di hardware, software, dati geografici e persone, progettato per raccogliere, immagazzinare, manipolare, analizzare e rappresentare in modo efficiente tutte le forme di informazione geograficamente referenziata” (Minami, 2000).

Molte altre sono le definizioni reperibili nella letteratura specifica e, sebbene con piccole diversità, tutte concordano sul fatto comune che un GIS deve possedere la capacità di relazionare un set di dati con una posizione nello spazio fisico identificata da coordinate numeriche.

4.2 Storia del GIS

La storia del GIS è una storia relativamente recente. Intorno alla metà dello scorso secolo la disponibilità di immagini rilevate da piattaforme satellitari, aeree e dei dati acquisiti tramite ricevitori GPS presso gli istituti militari di ricerca era elevata. Contemporaneamente la geografia quantitativa e le relative analisi statistiche e multivariate a carattere geografico si stavano velocemente affermando. Con questi presupposti negli anni '60 nacquero le prime rudimentali piattaforme GIS sviluppate a scopo militare e capaci di correlare dati rilevati o acquisiti, con rappresentazioni della realtà (foto, immagini, etc.) e in grado di eseguire le prime analisi di tipo spaziale.

La prima vera applicazione GIS è stata realizzata in Canada nel 1962 (Canada Information System) finalizzata soprattutto alla gestione ed analisi dei dati prodotti dal Canada Land

Inventory. Contemporaneamente nel 1965 presso l'Università di Harvard nasce l'Harvard Laboratory for Computer Graphics and Spatial Analysis, dedito fino alla fine degli anni '80 allo sviluppo di soluzioni per la cartografia numerica. Proprio in quegli anni (1969) Jack Dangermond fondò ESRI (Environmental System Research Institute) che diventò la realtà più forte nello sviluppo dei GIS definendo alcuni standard della cartografia numerica ancora oggi in uso. Nel 1979 Dana Tomlin e Joseph Berry definiscono lo standard per tutti i GIS basati su dati raster.

Con la nascita dei primi personal computer ed il conseguente sviluppo dei primi softwares GIS commerciali per mini-hardware si può considerare l'inizio della storia moderna del GIS. Nel 1980 nasce infatti il primo software GIS della ESRI (ARC/INFO), che gestisce ed elabora dati grafici (ARC) e alfanumerici (INFO) raccogliendo in se tutte le conoscenze ed esperienze maturate sino ad allora nei vari laboratori ed istituti di ricerca. Questo software diventò di fatto il punto di riferimento nel panorama mondiale dei softwares GIS.

Parallelamente nel 1985 nacque GRASS (primo GIS a codice libero) e successivamente nel 1991 la prima versione di Linux (primo sistema operativo a codice libero). Nel 1994 Grass 4.0 viene reso pubblico in rete (World Wide Web) determinandone il successo nella comunità virtuale.

Nel 1999 ESRI produce un nuovo standard, il geodatabase model, ponendo fine alla dicotomia dei dati grafici e numerici.

Dal 2000 con lo sviluppo della rete e la disponibilità di banche dati sempre più vaste i softwares GIS si sono sempre più raffinati e potenziati dando vita ad una scienza multidisciplinare (informatica, statistica, topografia, scienze ambientali, scienze della terra, etc.).

Oggi sono disponibili sul mercato o in rete in modo gratuito vari softwares GIS di natura desktop variamente complessi e potenti, ma molte istituzioni si sono anche dotate di propri GIS consultabili on-line definiti comunemente WebGIS.

La potenzialità di questi strumenti ne ha decretato il successo ed ha fatto sì che questa tecnologia sia oggi utilizzata in ogni settore produttivo e di ricerca.

4.3 La struttura di un GIS ed i principali usi nelle scienze ambientali

Un software GIS è costituito da una serie di programmi e/o funzioni che operano tra loro ognuno con una finalità precisa. In realtà grazie all'interfaccia intuitiva e alla sempre maggiore integrazione delle sue componenti l'operatore oggi non avverte una netta distinzione delle parti, ma percepisce un ambiente di lavoro complesso capace di numerose

funzionalità. La grande capacità della tecnologia GIS risiede nel fatto di far interagire dati alfanumerici contenuti in tabelle con immagini geograficamente riferite di varia natura e formato per mezzo di un sistema relazionale di dati (Relational Database Management System, RDBMS).

Sulla base delle relazioni, l'applicativo che gestisce la parte grafica e quello che gestisce le funzioni di analisi, permettono all'operatore di riprodurre in varia forma (grafici, tabelle, cartografie tematiche, reports etc.) il dato grezzo o elaborato ed in seguito predisporlo per una restituzione su supporti specifici, come la stampa di carte tecniche.

In un software GIS coesistono quindi capacità di archiviazione e relazione dei dati svolte da un DBMS (Database Management System), quelle di disegno dei softwares CAD (Computer Aided Design) e quelle di programmi di analisi dei dati, comuni agli applicativi di calcolo o ai più sofisticati softwares statistici.

Secondo le definizioni più recenti di GIS esiste poi la componente umana che non svolge soltanto il ruolo di "operatore", ma attraverso le idee e le scelte contribuisce in modo attivo alla generazione di nuova informazione ed è quindi parte integrante del sistema.

Tale tecnologia negli ultimi dieci anni si è prepotentemente affermata anche nel settore delle scienze forestali ed è oggi ampiamente utilizzata in molte discipline ad esso collegate. Questa tecnologia può essere utilizzata per la gestione del territorio (Barbati et al., 2008; Melini e Travaglini, 2006), per studi di ecologia sia animale (Logan et al., 2007) che vegetale (Capelo et al., 2007; Chirici et al., 2002; Turco et al., 2004), per studi epidemiologici (Bozic et al., 2006; Nevalainen, 2002; Ristaino et al., 2000), per valutazioni diagnostiche (Wang et al., 2007) o per la modellazione di numerosi fattori ecologici (Agnew e Palutikof, 2000; Attorre et al., 2007; Attorre et al., 2008; Blasi et al., 2007; Piedallu e Gégout, 2007).

5. Scopo del presente studio

Le attività svolte nell'ambito di questa tesi sono state finalizzate allo sviluppo di un metodo di lavoro che permettesse di individuare e quantificare l'effetto di criticità ambientali (stress abiotici per lo più termo-pluviometrici) capaci di produrre un indebolimento nei soprassuoli forestali nei territori montani, esponendoli all'azione dei microrganismi patogeni. L'attenzione è stata in particolare focalizzata su due specie arboree vegetali: il Cerro (*Quercus cerris*), la specie arborea più diffusa sul territorio regionale (249.669 ha; INFC, 2007) ed il Pino nero (*Pinus nigra* subsp *nigra*), ampiamente diffuso lungo la dorsale appenninica in impianti artificiali (18.427 ha; INFC, 2007), entrambe particolarmente sensibili a questi fenomeni. Questa attività di ricerca è nata in

seguito alla convenzione stipulata tra il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie – Sezione Protezione delle piante e l’Azienda Regionale per lo Sviluppo e l’Innovazione nel settore Agricolo forestale (ARSIA), nell’ambito del servizio META (Monitoraggio Estensivo dei boschi della Toscana a fini Fitosanitari).

I risultati ottenuti sono stati utilizzati per la realizzazione di un sistema previsionale strutturato come un WebGIS, liberamente consultabile sul sito ufficiale del servizio META.

6. Raccolta e valutazione di dati ambientali

6.1 Scopo del lavoro

Acquisizione d’informazioni sulle caratteristiche stazionali e climatiche per le aree monitorate d’interesse mediante la costruzione di modelli matematici in ambiente GIS. Organizzazione delle informazioni ottenute in un SIT (Sistema Informativo Territoriale) specifico per questo studio.

6.2 Materiali e metodi

Al fine di poter ottenere il maggior numero di informazioni sulle stazioni d’interesse senza svolgere un numero eccessivo di misurazioni in campo, sono stati creati in ambiente GIS mediante il software ArcGIS 9.3 (ESRI®) una serie di strati informativi derivati dalla cartografia tecnica regionale disponibile. Tutti gli strati informativi sono stati georeferiti nel sistema di coordinate Gauss-Boaga, Roma Monte Mario 1940.

Partendo dal file vettoriale dei punti quotati e da quello contenente le curve di livello è stato costruito mediante l’estensione 3D Analyst un TIN (Triangulated Irregular Network) e da questo è stato derivato un DEM (Digital Elevation Model) con passo di 20m per tutto il territorio toscano.

Da quest’ultimo sempre mediante 3D Analyst è stata ricavata la carta delle pendenze (espressa in gradi).

E’ stata acquisita inoltre la cartografia pedologica del territorio regionale in formato numerico (Regione Toscana - Direzione Generali Sviluppo Economico, Settore Programmazione Forestale). Questo layer vettoriale individua poligoni omogenei per caratteristiche geo-pedologiche e contiene numerose informazioni sulla natura dei suoli regionali. Da questa cartografia sono stati ricavate le seguenti informazioni:

- **Marg50:** contenuto di argilla nei primi 50 cm di profondità del suolo (media ponderale in base a distribuzione suoli e successione orizzonti);

- **Msab50:** contenuto di sabbia nei primi 50 cm di profondità del suolo (media ponderale in base a distribuzione suoli e successione orizzonti);
- **Mcalc50:** contenuto in calcare totale (media ponderale in base a distribuzione suoli e successione orizzonti);
- **Mso50:** contenuto in sostanza organica (media ponderale in base a distribuzione suoli e successione orizzonti);
- **Awc:** acqua disponibile nel terreno espressa in mm/m (media ponderale in base a distribuzione suoli e successione orizzonti).

Per i parametri meteorologici si è scelto di adottare i dati derivanti dalla rete agrometeorologica regionale gestita da ARSIA. La rete conta centotrenta stazioni diffuse sul territorio regionale. La raccolta dei dati è effettuata da centraline automatizzate. I dati sono registrati dai sensori per frazioni di ora (ogni minuto, decine di minuti, quarti d'ora, etc.) in funzione della variabile meteorologica considerata e sono resi disponibili all'utente come media dei dati giornalieri o come evento più rilevante del giorno, nel caso delle temperature massime e minime. I parametri rilevati dalle centraline sono:

Parametro rilevato	Codice	Unità di misura
Temperatura massima	TMax	°C
Temperatura minima	TMin	°C
Temperatura media	TMed	°C
Umidità massima	Umax	%
Umidità media	UMed	%
Pioggia cumulata giornaliera	PTot	mm
Velocità massima del vento	VMax	m/s
Velocità media giornaliera del vento	VMed	m/s
Direzione prevalente del vento	Dir.Pro.	1=N 2=NE 3=E 4=SE 5=S 6=SO 7=O 8=NO
Radiazione solare globale media oraria della giornata	Rtot	Watt/mq/h

Tabella 1. Elenco dei parametri meteorologici rilevati dalla rete agro-meteo regionale.

Una volta acquisiti i dati si è proceduto alla loro analisi valutando:

- la copertura fornita da ogni stazione sul territorio regionale;
- la distribuzione altimetrica delle stazioni;
- l'integrità delle serie storiche per i parametri meteo rilevati.

In seguito i dati sono stati aggregati per periodi d'interesse in funzione delle finalità del presente studio. Sono state calcolate:

- **PmedAR09:** pioggia media mensile dei mesi antecedenti il rilievo (media della pioggia mensile nei mesi di gennaio-luglio dell'anno in cui è stato effettuato il rilievo in campo);
- **TmedAR09:** temperatura media mensile dei mesi antecedenti il rilievo (temperatura media mensile nei mesi di gennaio-luglio dell'anno in cui è stato effettuato il rilievo in campo);
- **PmedVR09:** pioggia media mensile della stagione vegetativa del rilievo (media della pioggia mensile nei mesi aprile-luglio dell'anno in cui è stato effettuato il rilievo in campo);
- **TmedVR09:** temperatura media mensile della stagione vegetativa del rilievo (temperatura media mensile nei mesi di aprile-luglio dell'anno in cui è stato effettuato il rilievo in campo).

I dati meteo aggregati sono stati poi convertiti in un file shape per le elaborazioni in ambiente GIS.

Per la spazializzazione dei dati meteo si è scelto di utilizzare l'interpolatore stocastico Kriging nella sua variante Ordinary Kriging ritenuto "the best linear unbiased predictor" (Attorre et al., 2007; Blasi et al., 2007). Sebbene non sia possibile asserire che questo sia in assoluto il miglior metodo di interpolazione per i dati climatici, numerosi studi hanno dimostrato che, se ben utilizzato, il Kriging in tutte le sue variabili, offre i migliori risultati ottenibili (Fiorenzo et al., 2008). Essendo basato su concetti statistici, tale strumento ha la possibilità di modellare la natura spaziale del dato fornendo una stima degli errori commessi nel processo di interpolazione che risultano utili per la valutazione della bontà del modello costruito.

Prima di procedere alla vera e propria spazializzazione è stato necessario analizzare i dati disponibili per valutarne la distribuzione, la presenza di trend e/o di eventuali anisotropie locali, al fine di modulare i parametri del Kriging per costruire il semivariogramma

ottimale per il modello. Le analisi sono state condotte con lo strumento Exploratory Spatial Data Analysis (ESDA tools) del software ArcMap 9.3.

6.3 Risultati

Con gli strumenti informatici è stato possibile ricavare informazioni a livello regionale che sono state poi applicate ai siti d'interesse di questo studio. In allegato al presente lavoro sono riportate le carte tematiche (DEM, carta delle pendenze, carta pedologica) contenute nel SIT.

L'analisi esplorativa dei dati ha evidenziato che le centotrenta stazioni della rete ARSIA sono distribuite in modo piuttosto disomogeneo sul territorio ed ognuna ricopre una superficie media di territorio di 176,8 km².

Considerando ad esempio la ripartizione territoriale delle stazioni per superficie provinciale si osserva che alcune province presentano una sottostima della copertura (valori negativi in tab. 2), mentre altre una sovrastima (valori positivi in tab. 2).

Provincia	Superficie [km ²]	N° stazioni meteo disponibili	Superficie coperta per stazione [km ² /stazione]	N° stazioni per 176,8 km ² /stazione	Scarto stazioni
Arezzo	3.235,15	13	248,9	18	-5
Firenze	3.514,38	20	175,7	20	0
Grosseto	4.504,29	21	214,5	25	-4
Livorno	1.211,38	12	100,9	7	5
Lucca	1.772,81	15	118,2	10	5
Massa-Carrara	1.156,33	9	128,5	7	2
Pisa	2.444,38	12	203,7	14	-2
Pistoia	964,98	6	160,8	5	1
Prato	365,26	5	73,1	2	3
Siena	3.821,22	17	224,8	22	-5
Totale	22.990,18	130	176,8	130	

Tabella 2. Ripartizione delle stazioni meteo su base provinciale. Superfici e numero di stazioni per provincia, porzione di territorio per stazione, numero ideale di stazioni per una copertura omogenea di 176.8 km² e scarto tra la situazione ideale e reale del numero di stazioni.

Suddividendo il territorio nelle tre zone altimetriche di pianura, collina e montagna la distribuzione delle stazioni risulta concentrata nelle aree di pianura e di collina, mentre sono meno rappresentate quelle montane. Anche considerando la superficie totale per ogni zona altimetrica, le stazioni della rete risultano distribuite in modo disomogeneo in quanto si ha una sovrabbondanza numerica in pianura e una carenza nelle fasce collinare e montana (tab. 3 e fig. 3).

Zona altimetrica	Superficie regionale per zona altimetrica	N° stazioni disponibili	Superficie media per stazione	Stazioni necessarie proporzionate alla superficie unitaria di 176,8 km ²	Scarto Stazioni
Pianura [0 - 200 m]	1.839,21	55	33,44	10	45
Collina [201 - 600 m]	15.403,42	55	280,06	87	-32
Montagna [>600 m]	5.747,55	20	287,38	33	-13

Tabella 3. Ripartizione delle stazioni per zona altimetrica, relativa superficie, numero di stazioni disponibili, superficie media ricoperta per ogni stazione per zona, numero di stazioni ideale e scarto tra la situazione ideale e quella reale in numero di stazioni.

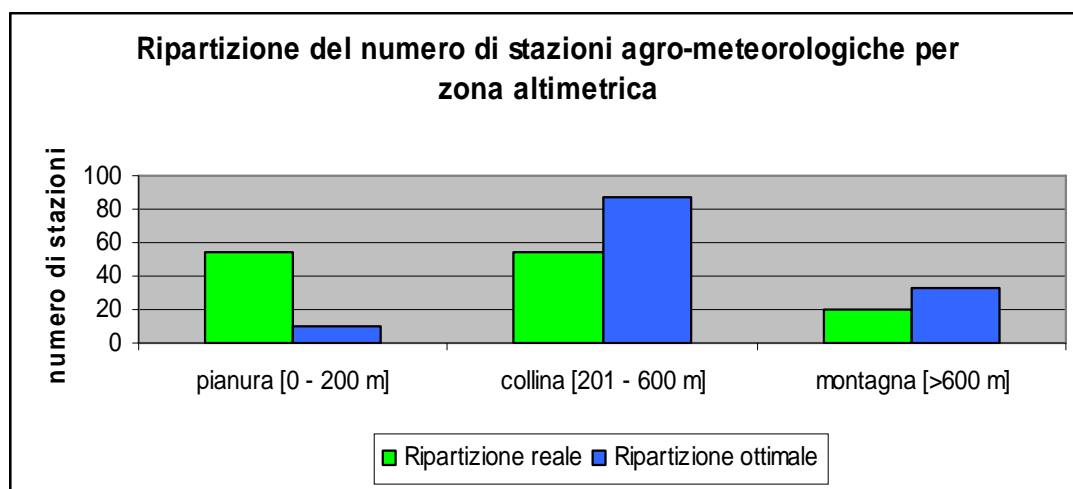


Figura 3. Confronto tra la distribuzione reale delle stazioni e quella ideale in proporzione alla superficie di territorio per zona altimetrica.

Per quanto riguarda la lunghezza delle serie storiche i dati sono piuttosto disformi. Solo per tre stazioni si dispone di una serie pressoché completa di dati ventennali, mentre per le altre rimanenti, le serie variano da un'ampiezza temporale di diciannove anni sino a soli tre anni per quelle di recente installazione. Le finalità del presente studio tuttavia permettono l'uso dei dati di tutte le stazioni e delle serie storiche complete in quanto il periodo d'interesse è vincolato al solo momento dei rilievi e dei campionamenti, (anno 2009).

Le analisi preliminari alla spazializzazione per i dati aggregati hanno rivelato che alcune grandezze non si distribuivano in modo normale e che nel territorio regionale sussistono due trend, entrambi di secondo ordine. Sia le piogge che le temperature risultano influenzate secondo le direttrici Nord-Sud ed Ovest-Est. Le distribuzioni non normali dei dati sono state normalizzate con una funzione logaritmica ed i trend "detrendizzati" con polinomi di ordine II. Il modello utilizzato per la costruzione dei semivariogrammi è stato quello sferico poiché offriva i migliori risultati.

Variabile	Modello	Risultati cross validation				
		ME	RMS	ASE	MS	RMSS
PmedAR09	Sferico	-0,2167	14.64	11.28	-0,027	1,12
TmedAR09	Sferico	0,0046	1.19	1.15	0.001	1.02
PmedVR09	Sferico	-0,1837	10.22	9.38	-0,034	1.12
TmedVR09	Sferico	0.0222	1.28	1.19	0,011	1.06

Tabella 4. Modelli di interpolazione dei parametri climatici considerati ottenuti tramite Ordinary Kriging. Le colonne indicano nell'ordine, la variabile climatica modellata ed il modello di variogramma matematico impiegato. Nella seconda sezione sono riportati i risultati dell'analisi di cross-validation utili per la stima della bontà del modello costruito (ME = errore medio; RMS = radice quadratica media dell'errore; ASE = media dell'errore standardizzato; MS = media standardizzata; RMSS = radice media standardizzata dell'errore).

Di seguito sono riportate, a titolo d'esempio, due cartografie degli indici climatici aggregati realizzati

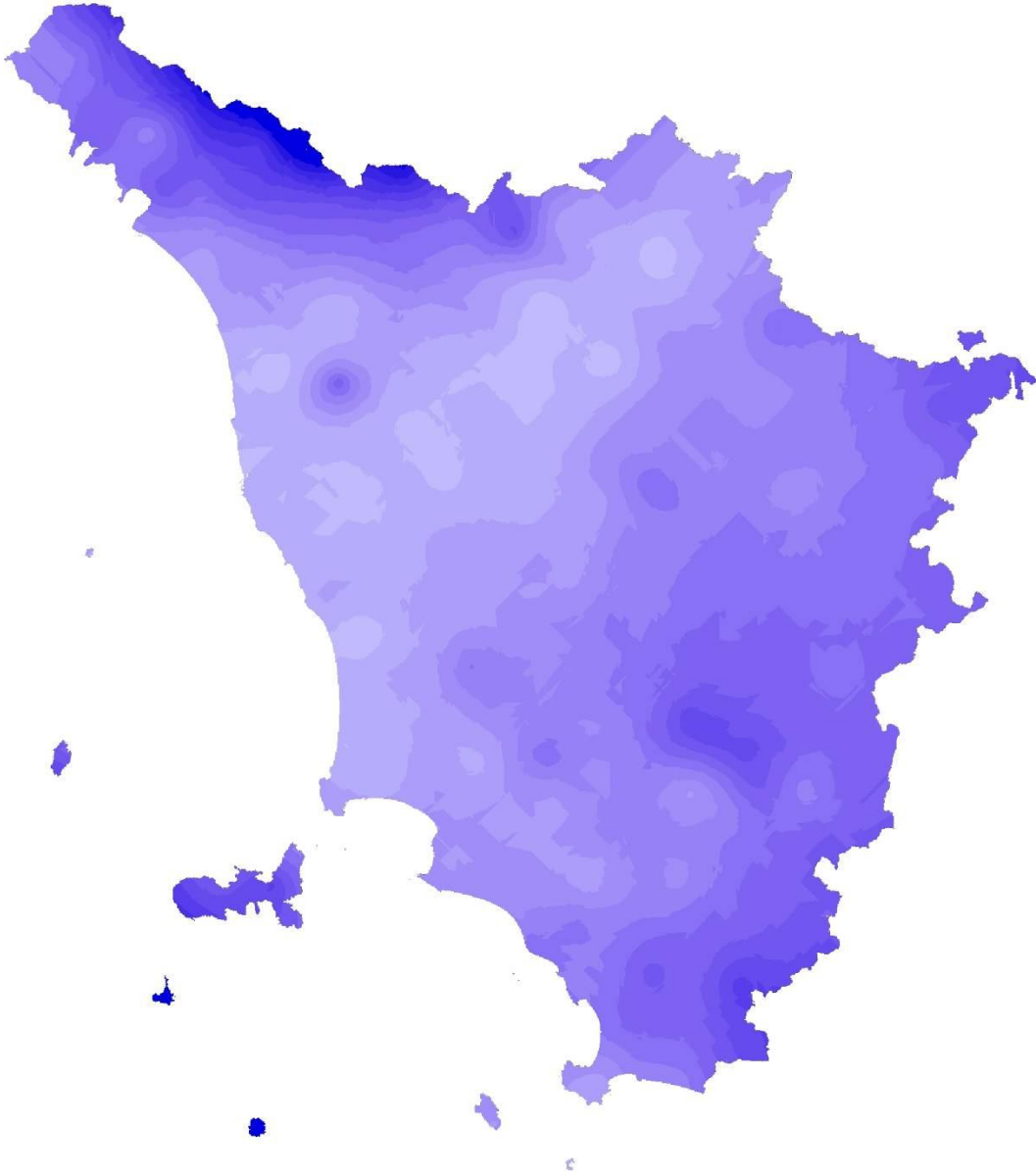


Figura 4. Cartografia della pioggia media mensile della stagione vegetativa del rilievo (media della pioggia mensile nei mesi aprile-luglio dell'anno in cui è stato effettuato il rilievo in campo)

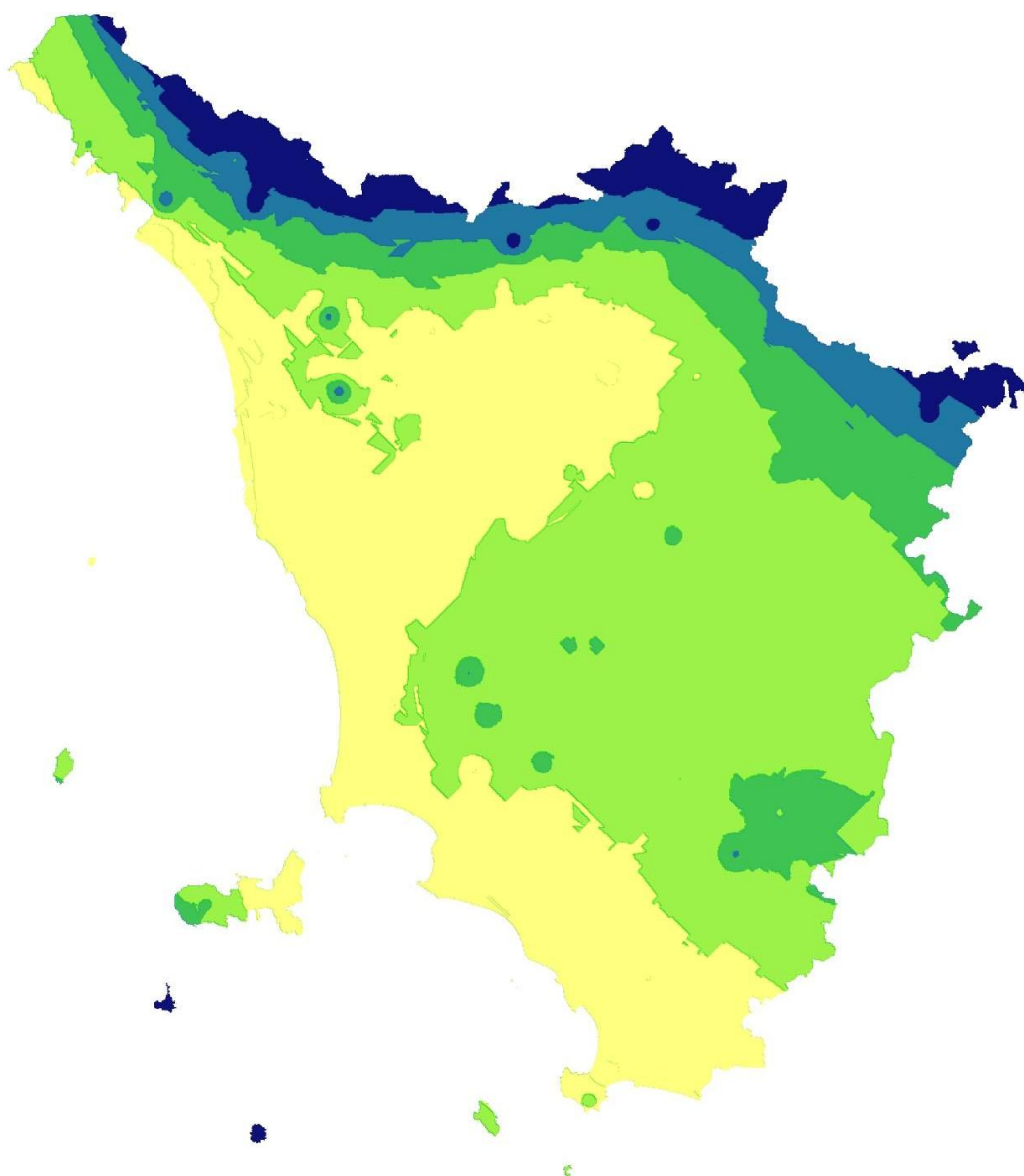


Figura 5. Cartografia della temperatura media mensile dei mesi antecedenti il rilievo (temperatura media mensile nei mesi di gennaio-luglio dell'anno in cui è stato effettuato il rilievo in campo).

6.4 Discussione

Sono stati acquisiti i dati ambientali in formato numerico al fine di costruire un sistema informativo territoriale (SIT) di supporto al presente studio.

Tale SIT è composto da carte derivate da elaborazioni condotte specificatamente per questo studio quali il DEM, la carta delle pendenze e da altra cartografia già disponibile, quale la carta pedologica digitale regionale, dalla quale sono state estrapolate le informazioni di maggior interesse sulla natura dei suoli.

Per l'utilizzo dei dati meteorologici della rete di rilevamento regionale è stata necessaria un'analisi esplorativa preventiva per verificare la distribuzione e la copertura sul territorio

delle stazioni meteo. L'analisi ha fatto emergere una distribuzione non ottimale delle stazioni sia per omogeneità di superficie territoriale coperta che per fascia altimetrica. Sarebbe pertanto auspicabile una ridistribuzione delle stazioni sul territorio aumentandone il numero nelle situazioni deficitarie. L'analisi dell'integrità delle serie storiche dei dati ha evidenziato un'eccessiva frammentarietà delle serie che risultano quindi poco utili nel caso di applicazioni meramente di ordine climatico. Secondo quanto riportato dalla WMO (World Meteorological Organization), infatti, per poter definire in modo opportuno le caratteristiche climatiche di una località è necessario ricorrere a serie climatiche almeno trentennali (Fiorenzo et al., 2008). La finalità del presente studio, tuttavia, è quella di valutare le possibili relazioni della stagionalità degli eventi meteorologici con la sofferenza dei popolamenti arborei affetti dai due organismi patogeni considerati. Per tali ragioni risulta sufficiente avere a disposizione le serie storiche complete per i periodi d'interesse considerati, piuttosto che sul lungo periodo. Inoltre le aree di monitoraggio selezionate sono risultate vicine a stazioni meteo della rete e questo ha permesso di ottenere dati meteo prossimi alle reali condizioni di campo.

Il metodo di spazializzazione stocastico Ordinary Kriging utilizzato in questo studio, ha permesso di ottenere modelli con elevata affidabilità, come evidenziato dai valori prossimi allo zero dell'errore medio del modello, dalla vicinanza tra i valori della radice quadratica media dell'errore e la media dell'errore standardizzato e dalla vicinanza al valore zero della radice media standardizzata dell'errore. Questo permette di poter ricavare con una buona accuratezza i valori per la variabile climatica, oltre che sul territorio regionale, per i punti di monitoraggio selezionati.

7. Monitoraggio fitosanitario dei popolamenti montani

7.1 Scopo del lavoro

Predisporre una rete di monitoraggio permanente sul territorio per l'acquisizione di dati in campo in merito alle condizioni fitosanitarie delle piante di Cerro e Pino nero.

7.2 Materiali e metodi

7.2.1 Scelta delle aree

Per la scelta delle aree dove svolgere le valutazioni in campo si è ricorsi al software ESRI ArcMap 9.3. L'individuazione dei popolamenti di Cerro e Pino nero è basata sulla cartografia numerica dell'Inventario Forestale della Toscana (Regione Toscana - Giunta Regionale, 1998) acquisita presso Regione Toscana. Poiché i dati dell'inventario risalgono

al 1998, sono stati necessari alcuni sopralluoghi preventivi per verificare che le strutture dei popolamenti fossero idonee allo studio.

Sono state individuate venti aree boschive pressoché pure per ogni specie vegetale oggetto di studio, tutte di superficie prossima all'ettaro. Le aree sono state equamente distribuite nelle province di Firenze ed Arezzo. Ogni area è stata suddivisa in nove punti di rilievo distanti circa 200 m. Ogni punto è stato geograficamente riferito tramite ricevitore GPS (Garmin® Colorado 300).

In ogni punto di rilievo sono state monitorate tre piante ognuna marcata con vernice per agevolarne il ritrovamento al momento del campionamento per le analisi di laboratorio. Le aree selezionate nella provincia fiorentina ricadono nei territori gestiti dalla Comunità Montana del Mugello e dalla Comunità Montana della Montagna Fiorentina (fig. 6), mentre quelle nella provincia aretina nei territori di competenza della Comunità Montana del Casentino e della Comunità Montana Val Tiberina (fig. 7). I rilievi sono stati condotti nei mesi di luglio-agosto nell'anno 2009.

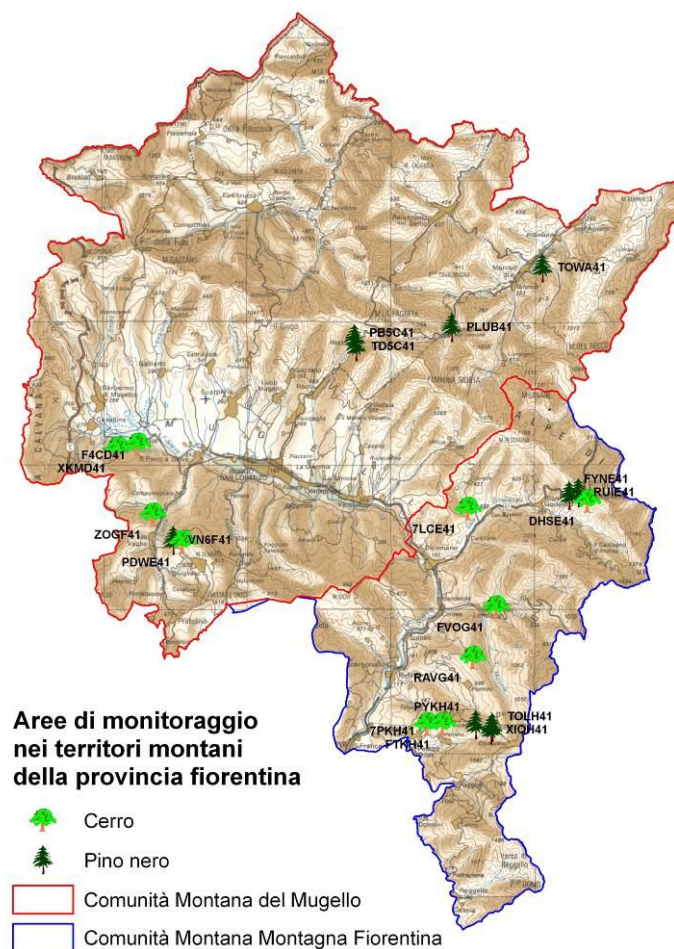


Figura 6. Ubicazione delle aree di monitoraggio nella provincia di Firenze.

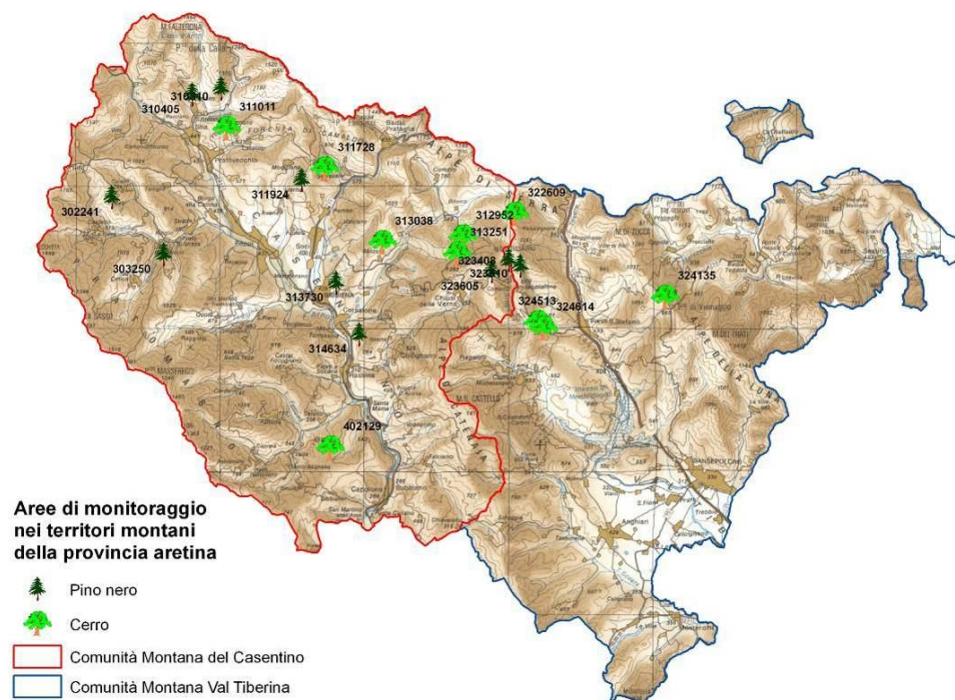


Figura 7. Ubicazione delle aree di monitoraggio nella provincia di Arezzo.

7.2.2 Raccolta dati in campo

In ogni punto di rilievo sono state raccolte una serie di informazioni quali-quantitative delle piante censite sulla base di esperienze di monitoraggio internazionali (AA.VV. 1994; Eichhorn et al., 2010). Il metodo è stato calibrato e adattato al caso di studio in oggetto. Per lo scopo è stata approntata un'apposita scheda di rilievo (allegato IV).

La scheda si suddivide in una prima parte utile alla raccolta dei dati geografici e stazionali ed una seconda, dedicata ai dati dendro-morfologici delle piante (specie, diametro, altezza, posizione sociale, inserzione della chioma, compressione della chioma, trasparenza della chioma) ed a quelli di danno suddivisi per porzioni di pianta (foglie o aghi nuovi, foglie o aghi vecchi, cimale, getto dell'anno, rametti con diametro inferiore ai 5 cm, rametti con diametro compreso tra i 5 cm ed i 10 cm, rametti con diametro superiore ai 10 cm, fusto, frutti, colletto e/o radici) con le relative specifiche dei sintomi riscontrati (alterazioni cromatiche, microfillia, allessatura-appassimento, melata-fumaggini-oidio, rami epicormici, essudazioni-resinazioni, disseccamento-seccumi, stroncamento dell'organo, perdita parziale/totale organo, necrosi dell'organo, cancro, ferite-lesioni, carie, marciumi, segni d'insetti, segni di funghi).

I danni osservati sono stati suddivisi in cinque classi in base alla loro intensità e/o diffusione, rapportata alla porzione di pianta interessata, secondo esperienze analoghe

(Cardoso et al., 2004; Garcia e Diez, 2003; Groth e Ozmon, 1999; Paul et al., 2005; Tello et al., 2005).

CLASSI DI DANNO	VALORE DEL DANNO
0	Danno assente, pianta o organo sano (0%)
1	Danno compreso tra 1 e 25 %
2	Danno compreso tra 26 e 50 %
3	Danno compreso tra 51 e 75 %
4	Danno compreso tra 76 e 100 %

Tabella 5. Elenco delle classi di danno e relativa percentuale corrispondete, utilizzate per la valutazione dei danni osservati sulle piante censite nel monitoraggio.

Successivamente i dati fitosanitari acquisiti nei punti di rilievo sono stati convertiti in formato digitale e integrati nel SIT. Per ogni parametro di danno rilevato è stato calcolato il valore di gravità (severity) secondo la seguente formula (Cardoso et al., 2004):

$$G = \sum (X_i \times N_i) / n$$

dove G gravità (severity)

X_i rappresenta la classe di danno attribuita

N_i rappresenta il numero di piante malate nella classe X_i

n rappresenta il numero di piante malate totali

7.3 Risultati

7.3.1 Monitoraggio delle aree di Cerro

I dati raccolti nelle aree sono stati sottoposti ad osservazioni preliminari al fine di eliminare tutte le informazioni ridondanti e tutti i sintomi non ascrivibili al caso di studio in oggetto (danni da insetti, altri funghi, meccanici etc.). Con preventive analisi delle frequenze sono stati così messi in evidenza i danni maggiormente diffusi, risultati essere tutte sintomatologie compatibili con il patogeno opportunisto *B. mediterranea*, e su questi si è proceduto con l'analisi. I parametri ritenuti idonei per le analisi successive sono stati:

- il disseccamento dei rami con diametro inferiore ai 5 cm,
(disseccamento rami $\varnothing < 5$ cm)
- il disseccamenti dei rami con diametro compreso tra i 5 ed i 10 cm,
(disseccamento rami $5 < \varnothing < 10$ cm)
- il danno cumulato dei due precedenti.
(danno tot. chioma)

Dal confronto dei dati acquisiti nelle due province di Firenze ed Arezzo per i tre parametri di danno registrati si osserva che le loro frequenze sono risultate piuttosto disformi. Sia nel caso dei rami di piccole dimensioni che di dimensioni superiori, i punti di rilievo della provincia fiorentina risultano maggiormente colpiti sia nel numero, una maggiore presenza di istogrammi nei grafici, che nell'intensità, un' altezza maggiore degli istogrammi (figg. 8 e 9).

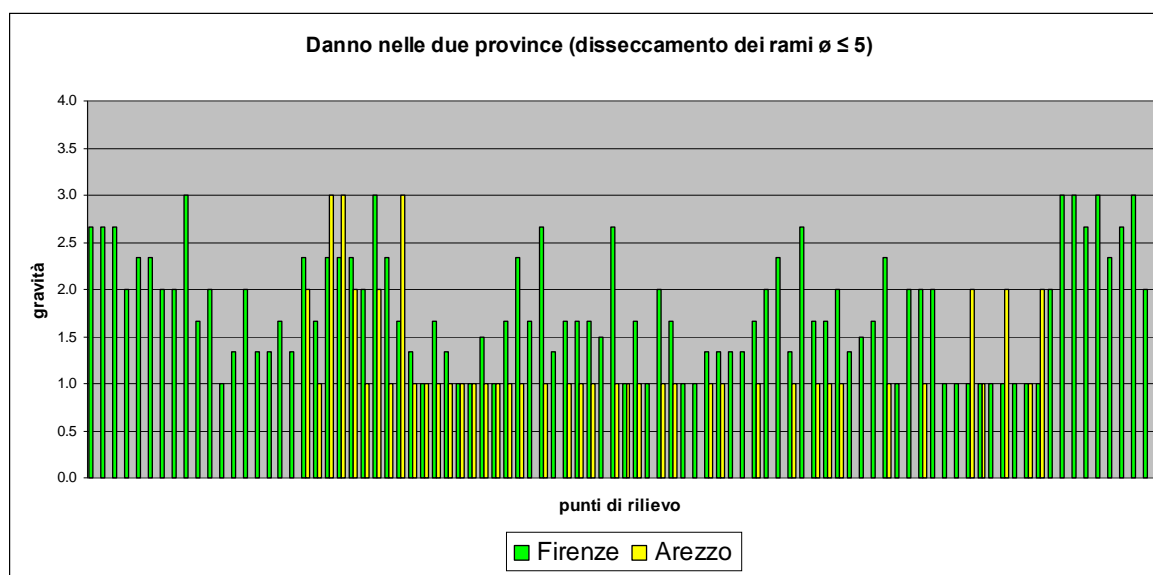


Figura 8. Gravità dei danni per il parametro “disseccamento rami $\varnothing < 5$ cm” registrata nelle province di Firenze ed Arezzo per tutti i 180 punti monitorati. Ogni istogramma rappresenta un punto con danno mentre l'altezza delle barre indica la gravità del danno.

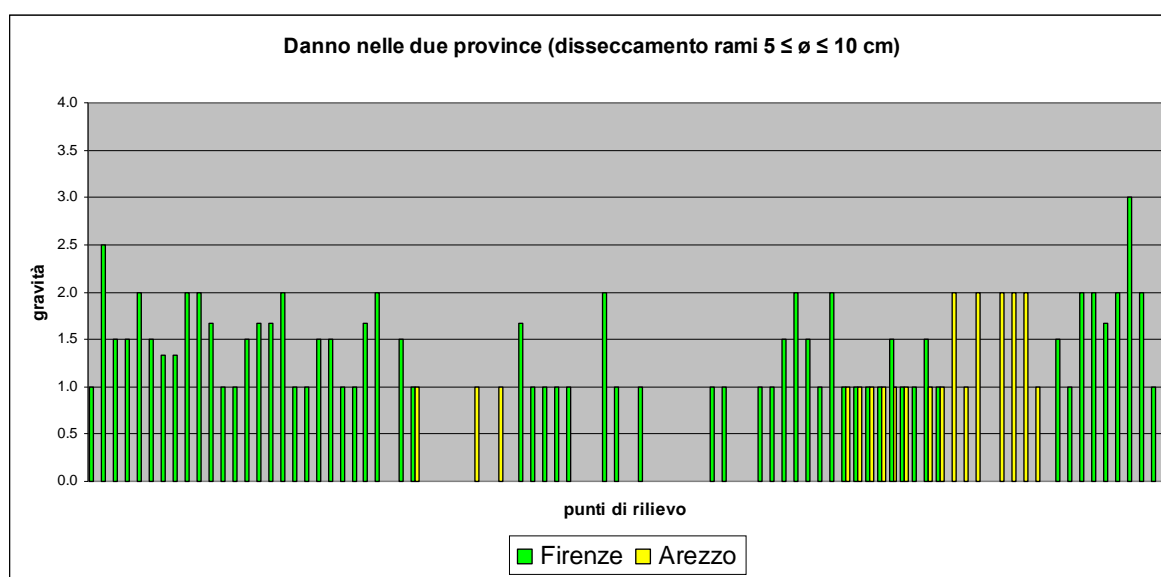


Figura 9. Gravità dei danni per il parametro “disseccamento rami $5 < \varnothing < 10$ cm” registrata nelle province di Firenze ed Arezzo per tutti i 180 punti monitorati. Ogni istogramma rappresenta un punto con danno mentre l'altezza delle barre indica la gravità del danno.

I danni maggiori sono stati registrati a carico dei rami di dimensioni più piccole, ossia delle porzioni di chioma più marginali e che possono maggiormente risentire di fenomeni di stress abiotico.

Soltanto in alcuni punti di rilievo sono stati osservati danni a carico dei rami di dimensioni maggiori, che permettono di evidenziare stati di sofferenza più forti rispetto agli altri siti monitorati.

Anche cumulando i due parametri e considerando il danno complessivo alla chioma (fig. 10) le tendenze generali osservate sono state confermate: i soprassuoli della provincia fiorentina versano in condizioni più gravi di quelli aretini.

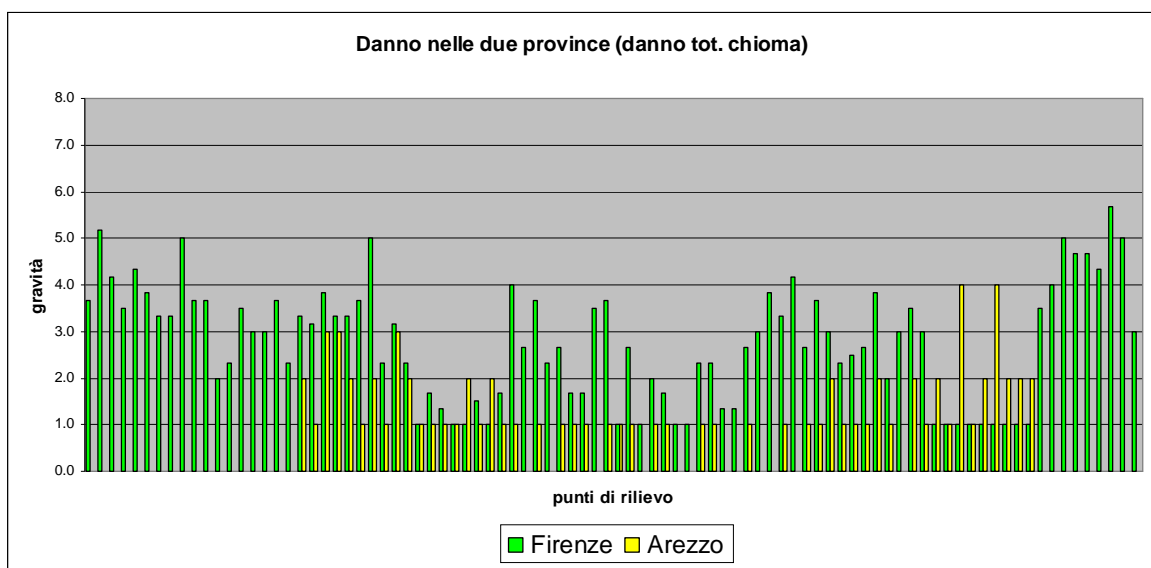


Figura 10. Gravità dei danni per il parametro “danno tot. chioma” registrata nelle province di Firenze ed Arezzo per tutti i 180 punti monitorati. Ogni istogramma rappresenta un punto con danno mentre l’altezza delle barre indica la gravità del danno.

Il test di Kruskal-Wallis eseguito con il software SPSS ver.17.0 (IBM®) per i tre parametri di danno misurati ha rivelato che le due province di Firenze ed Arezzo risultano significativamente diverse.

Gravità	Province	Media dei ranghi	χ^2	Significatività	gdl
disseccamento rami $\varnothing < 5$ cm	Firenze	125,25	83,914*	0,000	1
	Arezzo	55,75			
disseccamento rami $5 < \varnothing < 10$ cm	Firenze	113,68	43,671*	0,000	1
	Arezzo	67,32			
danno tot. chioma	Firenze	124,91	81,046*	0,000	1
	Arezzo	56,09			

* $p < 0,05$

Tabella 6. Risultati del test Kruskal-Wallis per i parametri di danno rilevati per il Cerro per le due provincie di monitoraggio.

Un successivo test di Kruskal-Wallis condotto sui valori di gravità per i parametri di danno ha permesso di evidenziare che anche le singole venti aree di rilievo differiscono significativamente tra loro, sia che si consideri il disseccamento dei rami $\varnothing < 5$ cm, che il disseccamento dei rami $5 < \varnothing < 10$ cm, che il danno totale alla chioma, come riportato nella seguente tabella (tab. 7)

Gravità	Area	Media dei ranghi	χ^2	Significatività	gdl
disseccamento rami $\varnothing < 5$ cm	7LCE4	158,00	143,268*	0,000	19
	7PKH4	115,17			
	DHSE4	150,83			
	F4DC4	97,33			
	FTKH4	134,78			
	FVOG4	100,39			
	PDWE4	129,17			
	RAVG4	127,67			
	XKMD4	74,50			
	ZOGF4	24,50			
	324614	24,50			
	402129	131,00			
	324513	74,50			
	313251	57,83			
	312952	57,83			
	322609	46,72			
	311011	41,17			
	311728	74,94			
	313038	164,67			
	324135	24,50			
disseccamento rami $5 < \varnothing < 10$ cm	7LCE4	152,61	133,643*	0,000	19
	7PKH4	147,56			
	DHSE4	132,28			

	F4DC4	58,33			
	FTKH4	114,94			
	FVOG4	74,00			
	PDWE4	122,56			
	RAVG4	127,33			
	XKMD4	50,50			
	ZOGF4	50,50			
	324614	50,50			
	402129	50,50			
	324513	74,00			
	313251	50,50			
	312952	50,50			
	322609	50,50			
	311011	113,17			
	311728	132,56			
	313038	156,67			
	324135	50,50			
danno tot. chioma	7LCE4	161,61	151,511*	0,000	19
	7PKH4	136,83			
	DHSE4	147,61			
	F4DC4	82,94			
	FTKH4	132,33			
	FVOG4	91,17			
	PDWE4	133,39			
	RAVG4	132,22			
	XKMD4	64,00			
	ZOGF4	20,00			
	324614	20,00			
	402129	101,50			
	324513	78,00			
	313251	49,33			
	312952	49,33			
	322609	39,56			
	311011	73,11			
	311728	110,11			
	313038	166,94			
	324135	20,00			

* $p < 0,05$

Tabella 7. Risultati del test Kruskal-Wallis per i parametri di danno rilevati per il Cerro per le venti aree di monitoraggio

Lo stesso test statistico è stato condotto considerando il danno tot. alla chioma ed i punti di rilievo, ma questo non ha evidenziato differenze significative tra i punti, inducendo così a considerare l'area come unità minima di studio per la valutazione dello stato fitosanitario dei soprasuoli.

Sulla base della gravità del danno totale alla chioma è stata redatta una graduatoria delle condizioni fitopatologiche delle aree al fine di individuare quelle maggiormente colpite e quelle in condizioni migliori (tab. 8). Tale graduatoria è risultata utile per il campionamento del materiale da sottoporre alle successive analisi di laboratorio.

Area di rilievo	Provincia	Gravità del danno totale alla chioma
ZOGF4	FI	4,1
7LCE4	FI	3,8
DHSE4	FI	3,4
PDWE4	FI	3,3
7PKH4	FI	3,2
FTKH4	FI	3,2
RAVG4	FI	2,9
F4DC4	FI	2,7
FVOG4	FI	2,7
313251	AR	2,1
XKMD4	FI	2,0
322609	AR	2,0
311011	AR	2,0
313038	AR	2,0
324513	AR	1,3
402129	AR	1,0
312952	AR	1,0
311728	AR	1,0
324135	AR	1,0
324614	AR	0,0

Tabella 8. Graduatoria della gravità complessiva riscontrata nelle venti aree di Cerro.

Poiché le precedenti analisi hanno evidenziato che per tutti i parametri di danno considerati le tendenze nelle province e nelle aree sono mantenute, si è scelto di utilizzare nelle successive elaborazioni solo il dato relativo alla gravità del danno complessivo alla chioma (danno tot. chioma). La gravità del danno totale alla chioma per ogni punto di rilievo è stata quindi messa in relazione con i parametri dendro-morfologici medi del punto attraverso regressioni lineari multiple con metodo stepwise mediante il software SPSS ver.17.0 (IBM®). La regressione è risultata significativa indicando che le due variabili indipendenti “trasparenza” e “compressione” sono in grado di predire significativamente la gravità del danno totale alla chioma ($F_{(2, 177)} = 122,878; p = 0,000$) ed il test di collinearità indica che i due predittori sono effettivamente indipendenti tra loro (non collineari). Il valore di R^2 è risultato essere 0,58.

L'equazione prodotta dalla regressione è stata:

$$\text{Gravità del danno tot. chioma} = (0,060 * \text{trasparenza}) + (-0,244 * \text{compressione della chioma}) + 0,636$$

Predittori	ANOVA regressione		Risultati regressione				
	$F_{(2, 177)}$	Significatività	R^2	t	Significatività	Test di Collinearità	
						Tolleranza	VIF
Trasparenza	122,878*	0,000	0,581	12,302*	0,000	0,856	1,168
Compressione della chioma				-4,324*	0,000	0,856	1,168
Variabili escluse							
Altezza				0,395*	0,693	0,827	1,210
Inserzione della chioma				-0,414*	0,679	0,892	1,121
Diametro				1,253*	0,212	0,993	1,007

* $p < 0,05$

Tabella 9. Risultati dell'analisi di regressione multipla con metodo stepwise e del test di collinearità sui predittori.

La retta di regressione tra trasparenza e gravità del danno esibisce un coefficiente positivo indicando che all'aumentare della trasparenza aumenta significativamente anche la gravità del danno alla chioma.

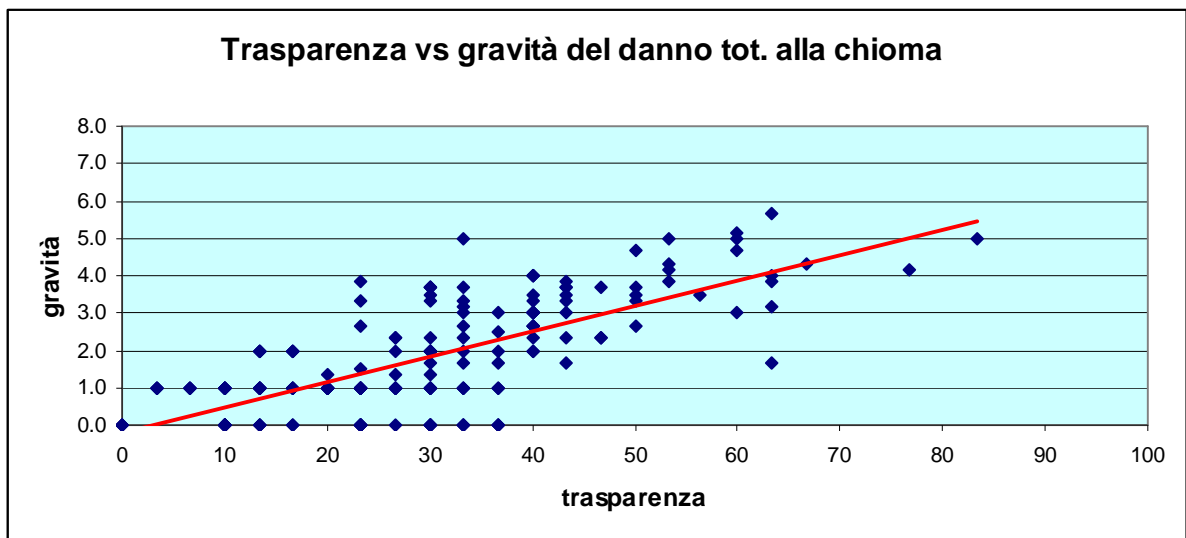


Figura 11. Regressione lineare tra trasparenza e gravità del danno totale alla chioma.

La retta di regressione tra compressione della chioma e gravità del danno totale alla chioma esibisce un coefficiente negativo indicando che all'aumentare delle costrizioni della chioma si ha una diminuzione significativa anche della gravità del danno totale alla chioma.

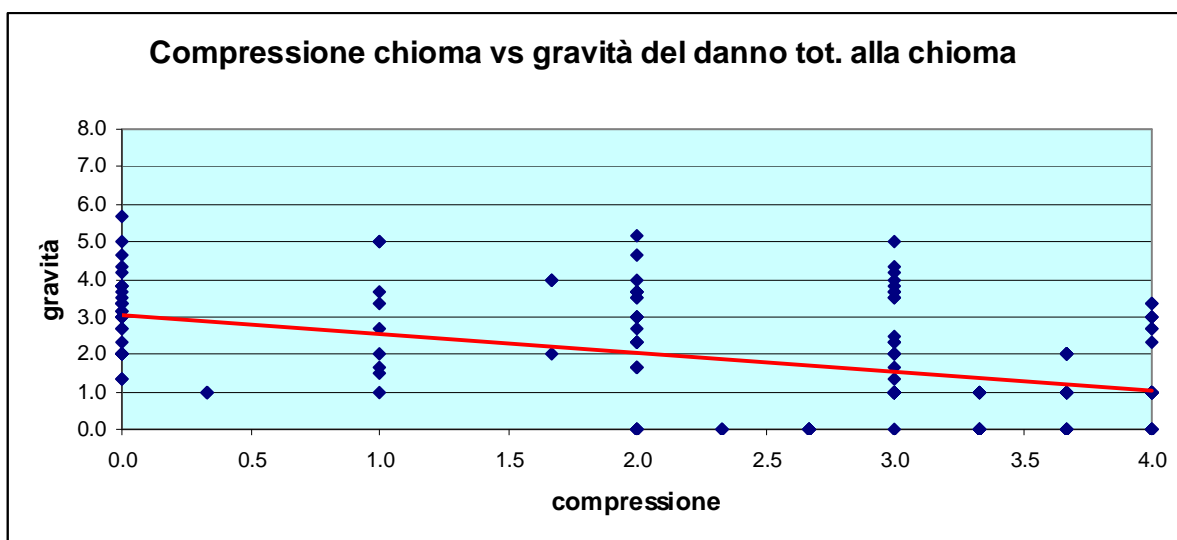


Figura 12. Relazione lineare tra compressione della chioma e gravità del danno totale alla chioma.

7.3.2 Monitoraggio delle aree di Pino nero

Analogamente a quanto fatto per il Cerro i dati raccolti nelle aree sono stati sottoposti ad una “scrematura” preventiva per eliminare le informazioni ridondanti ed i sintomi non pertinenti al presente caso di studio (danni da insetti, fuoco, azione antropica etc.). L’analisi dei dati si è quindi concentrata su tre parametri tutti riferibili alla chioma, già evidenziati in altri studi precedenti (Piuksi e Torta, 1994) come possibili manifestazioni di sofferenza da stress ambientali nonché anche sintomatologie imputabili a *Diplodia pinea*.

I parametri considerati sono stati i seguenti:

- le alterazioni cromatiche sugli aghi dell’anno e degli anni precedenti,
(alterazione cromatica aghi)
- la microfillia degli aghi dell’anno e degli aghi degli anni precedenti,
(microfillia)
- la perdita precoce degli aghi dell’anno e degli anni precedenti,
(perdita aghi)
- il danno cumulato dei tre precedenti parametri.
(danno tot. chioma)

Confrontando i dati dei danni registrati nelle due province di Firenze ed Arezzo per tutti i tre parametri di danno non cumulati si osserva una notevole complessità delle situazioni con aree dove sono stati registrati maggiori valori per un parametro e bassi per gli altri due e viceversa.

L'andamento generale tuttavia mette in evidenza che i danni osservati risultano maggiormente gravi sia per numero (maggior numero di istogrammi), che per intensità (maggior altezza delle barre degli istogrammi) nella provincia fiorentina rispetto ai soprassuoli aretini (fig. 13-15).

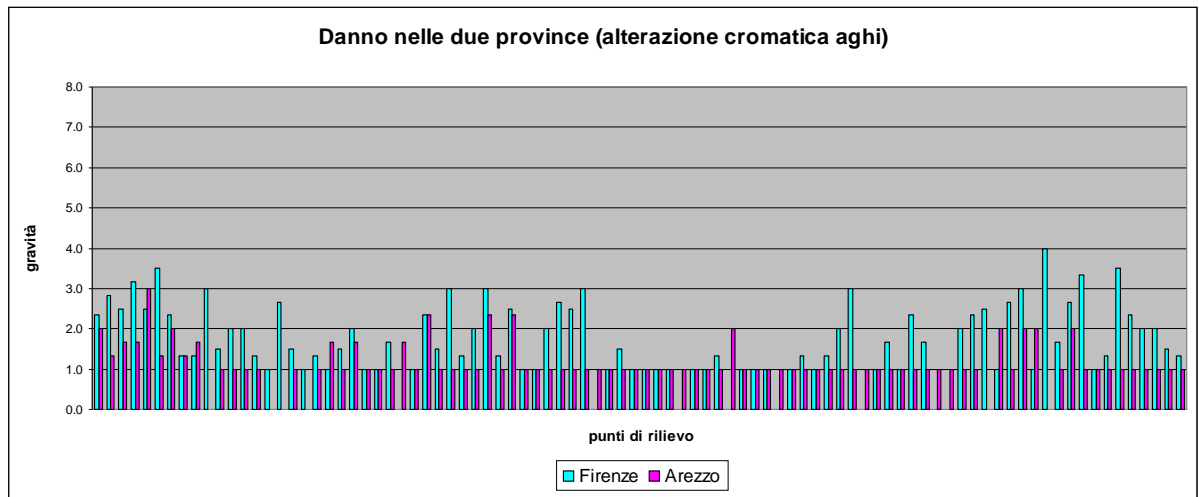


Figura 13. Gravità dei danni per il parametro “alterazione cromatica aghi” registrata nelle province di Firenze ed Arezzo per tutti i 180 punti monitorati. Ogni istogramma rappresenta un punto con danno mentre l'altezza delle barre indica la gravità del danno.

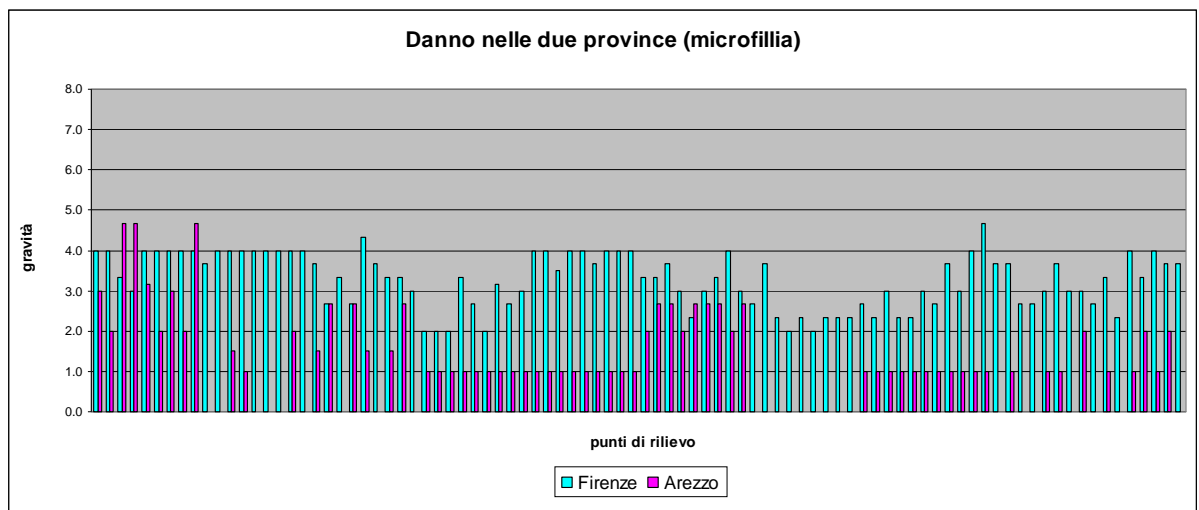


Figura 14. Gravità dei danni per il parametro “microfillia” registrata nelle province di Firenze ed Arezzo per tutti i 180 punti monitorati. Ogni istogramma rappresenta un punto con danno mentre l'altezza delle barre indica la gravità del danno.

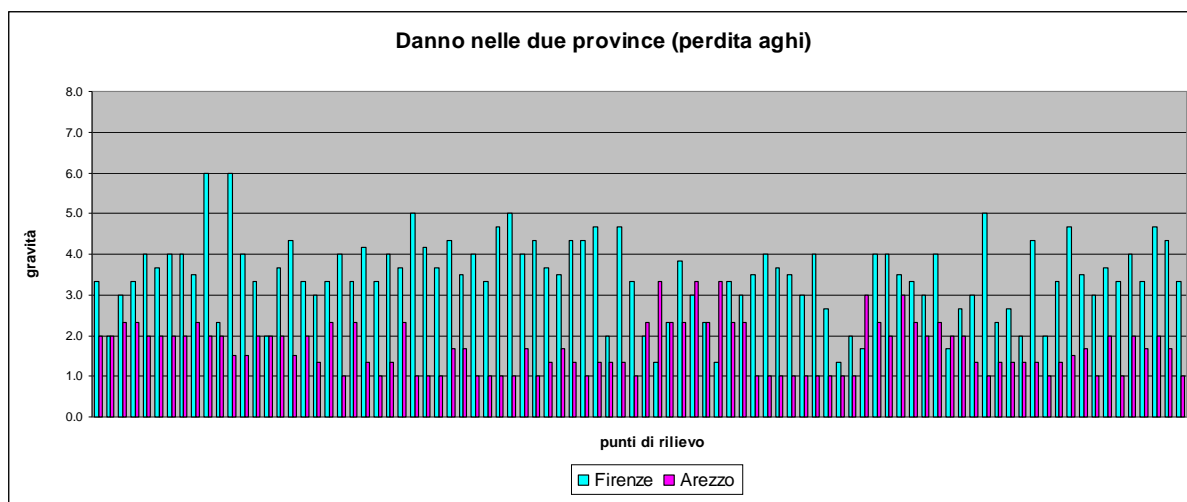


Figura 15. Gravità dei danni per il parametro “perdita aghi” registrata nelle province di Firenze ed Arezzo per tutti i 180 punti monitorati. Ogni istogramma rappresenta un punto con danno mentre l’altezza delle barre indica la gravità del danno.

Nel caso delle alterazioni cromatiche degli aghi, le due province presentano un andamento medio più simile mentre nel caso dei due parametri microfillia e perdita degli aghi i punti di monitoraggio della provincia fiorentina appaiono maggiormente colpiti.

In un numero piuttosto elevato di punti di monitoraggio i valori della gravità della microfillia sono decisamente più elevati nei soprassuoli fiorentini rispetto a quelli aretini.

Cumulando i tre precedenti parametri di danno si osserva che le tendenze generali per i punti di rilievo sono rimaste sostanzialmente invariate confermando le aree fiorentine come quelle mediamente più danneggiate (fig. 16).

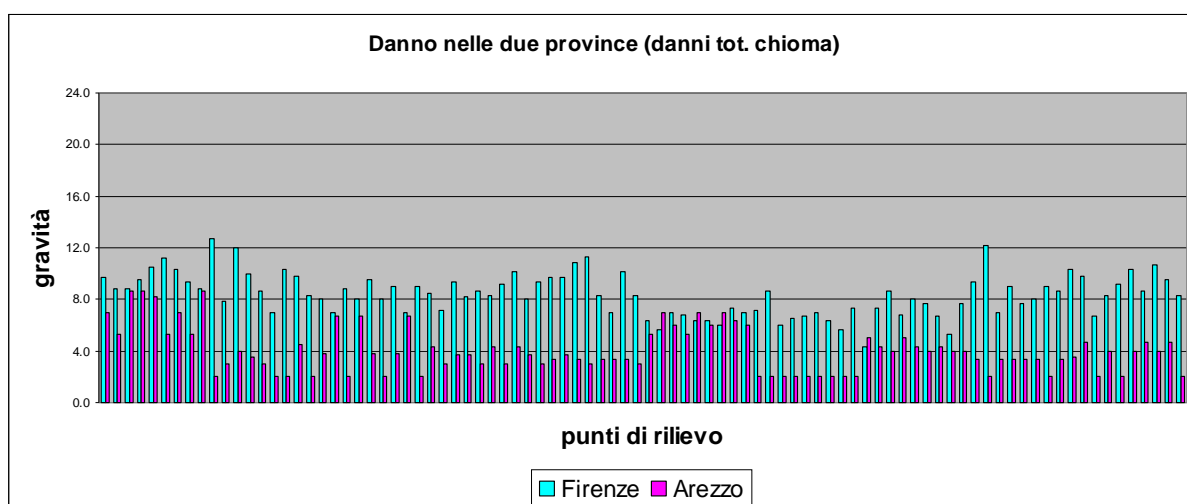


Figura 16. Gravità dei danni per il parametro “danno tot. chioma” registrata nelle province di Firenze ed Arezzo per tutti i 180 punti monitorati. Ogni istogramma rappresenta un punto con danno mentre l’altezza delle barre indica la gravità del danno.

Il test di Kruskal-Wallis realizzato con il software SPSS ver.17.0 (IBM®) per i tre parametri di danno misurati ha rivelato che le due province di Firenze ed Arezzo risultano significativamente diverse.

Gravità	Province	Media dei ranghi	χ^2	Significatività	gdl
alterazione cromatica degli aghi	Firenze	108,24	23,801*	0,000	1
	Arezzo	72,76			
microfillia	Firenze	128,94	99,649*	0,000	1
	Arezzo	52,06			
perdita degli aghi	Firenze	129,03	99,436*	0,000	1
	Arezzo	51,97			
danno tot. chioma	Firenze	131,43	111,368*	0,000	1
	Arezzo	49,57			

* $p < 0,05$

Tabella 10. Risultati del test Kruskal-Wallis per i parametri di danno rilevati per il Pino nero per le due province di monitoraggio.

Successivamente è stato effettuato un test Kruskal-Wallis tra le singole venti aree di rilievo. I risultati del test indicano che le aree differiscono significativamente tra loro sia che si consideri la gravità delle alterazioni cromatiche degli aghi, che la gravità della microfillia, che la gravità della perdita degli aghi, o il danno cumulato sulla chioma, come riportato nella seguente tabella (tab. 11).

Variabile	Area	Media dei ranghi	χ^2	Significatività	gdl
alterazione cromatica degli aghi	FYNE4-1	152,61	81,857*	0,000	19
	PB5C4-1	121,11			
	PLUB4-1	82,72			
	PYKH4-1	133,44			
	RUIE4-1	105,00			
	TD5C4-1	53,28			
	TOLH4-1	86,44			
	TOWA4-1	77,00			
	VN6F4-1	138,28			
	XIQH4-1	130,22			
	323605-1	36,11			
	323408-1	82,17			
	323510-1	90,67			
	302241-1	59,00			
	310310-1	68,17			
	314634-1	59,00			
	313730-1	59,00			

	310405-1	84,22			
	302550-1	132,56			
	311924-1	59,00			
microfillia	FYNE4-1	154,06	150,539*	0,000	19
	PB5C4-1	160,39			
	PLUB4-1	130,78			
	PYKH4-1	96,72			
	RUIE4-1	157,56			
	TD5C4-1	126,61			
	TOLH4-1	91,56			
	TOWA4-1	106,39			
	VN6F4-1	134,28			
	XIQH4-1	124,06			
	323605-1	28,72			
	323408-1	59,17			
	323510-1	43,50			
	302241-1	43,50			
	310310-1	91,83			
	314634-1	13,00			
	313730-1	43,50			
	310405-1	29,94			
	302550-1	131,11			
	311924-1	43,33			
perdita degli aghi	FYNE4-1	129,83	135,467*	0,000	19
	PB5C4-1	136,89			
	PLUB4-1	141,28			
	PYKH4-1	154,56			
	RUIE4-1	146,56			
	TD5C4-1	90,33			
	TOLH4-1	115,67			
	TOWA4-1	115,50			
	VN6F4-1	120,44			
	XIQH4-1	77,00			
	323605-1	61,50			
	323408-1	46,83			
	323510-1	26,33			
	302241-1	29,72			
	310310-1	102,50			
	314634-1	13,50			
	313730-1	85,89			
	310405-1	31,39			
	302550-1	139,28			
	311924-1	45,00			
danno tot. chioma	FYNE4-1	159,17	153,947*	0,000	19
	PB5C4-1	150,17			
	PLUB4-1	131,00			
	PYKH4-1	137,72			
	RUIE4-1	151,56			
	TD5C4-1	92,78			
	TOLH4-1	99,39			
	TOWA4-1	103,67			
	VN6F4-1	142,94			
	XIQH4-1	108,00			

323605-1	28,33
323408-1	50,50
323510-1	43,67
302241-1	32,89
310310-1	87,56
314634-1	11,00
313730-1	59,56
310405-1	30,39
302550-1	145,89
311924-1	43,83

* $p < 0,05$

Tabella 11. Risultati del test Kruskal-Wallis per i parametri di danno rilevati per il Pino nero per le venti aree di moniotaraggio

E' stato eseguito anche un ulteriore test Kruskal-Wallis per verificare l'indipendenza tra i punti di rilievo, ma i risultati indicano che i punti non sono significativamente diversi tra loro e questo ha permesso di individuare nell'area, l'unità minima omogenea per lo studio delle condizioni fitosanitarie.

In base alla gravità del danno totale alla chioma riscontrata è stata quindi redatta una classifica delle aree, al fine di individuare i siti in condizioni fitosanitarie migliori e peggiori (tab. 12). Tale graduatoria è stata impiegata per effettuare i campionamenti del materiale da sottoporre alle successive analisi di laboratorio.

Area di rilievo	Provincia	Gravità del danno totale alla chioma
PB5C4	FI	10,6
RUIE4	FI	10,6
FYNE4	FI	10,4
XIQH4	FI	10,3
VN6F4	FI	10,1
PYKH4	FI	9,5
TOWA4	FI	8,8
PLUB4	FI	8,5
TOLH4	FI	8,3
323605	AR	8,0
314634	AR	7,6
*TD5C4	FI	7,4
323510	AR	5,6
310405	AR	5,1
311924	AR	4,6
302241	AR	4,4
323408	AR	4,4
302550	AR	4,2
310310	AR	3,3
313730	AR	3,0

* l'area TD5C4 nella fase di campionamento del materiale per le analisi di laboratorio era interessata da operazioni di taglio a carico delle piante monitorate. Il campionamento è stato fatto in TOLH4.

Tabella 12. Graduatoria della gravità complessiva riscontrata nelle venti aree di Pino nero.

Poiché dalle precedenti osservazioni è stato evidenziato che per tutti i parametri di danno considerati le tendenze generali nelle province e nelle aree sono conservate, si è deciso di utilizzare nelle successive elaborazioni soltanto il dato della gravità del danno complessivo alla chioma (danno tot. chioma); tale dato, per ogni punto di rilievo, è stato messo in relazione con i parametri dendro-morfologici medi del punto attraverso regressioni lineari multiple con metodo stepwise effettuate con il software SPSS ver.17.0 (IBM®).

La regressione è risultata significativa indicando che le tre variabili indipendenti “trasparenza”, “diametro” e “altezza” sono in grado di predire significativamente la gravità del danno totale alla chioma ($F_{(3, 176)} = 163,689$; $p = 0,000$) ed il test di collinearità indica che i predittori sono indipendenti (non collineari). Il valore di R^2 è risultato pari a 0,74.

L’equazione ottenuta è stata:

$$\text{Gravità del danno tot. chioma} = (0,127 * \text{trasparenza}) + (-0,166 * \text{altezza}) + (-0,076 * \text{diametro}) + 3,196$$

Variabili	ANOVA regressione		Risultati regressione				
	$F_{(3, 176)}$	Significatività	R^2	t	Significatività	Test di Collinearità	
						Tolleranza	VIF
Trasparenza del fogliame	163,689*	0,000	0,736	13,985*	0,000	0,500	2,002
Altezza				-4,017*	0,000	0,392	2,548
Diametro				3,114*	0,002	0,511	1,955
Variabili escluse							
Inserzione della chioma				-0,804*	0,423	0,916	1,092
Compressione della chioma				0,069*	0,945	0,925	1,081
Posizione sociale				-0,093*	0,926	0,943	1,061

* $p < 0,05$

Tabella 13. Risultati dell’analisi di regressione multipla con metodo stepwise e del test di collinearità sui predittori.

La retta di regressione tra trasparenza e gravità del danno esibisce un coefficiente positivo indicando che all’aumentare della trasparenza aumenta significativamente anche la gravità del danno alla chioma.

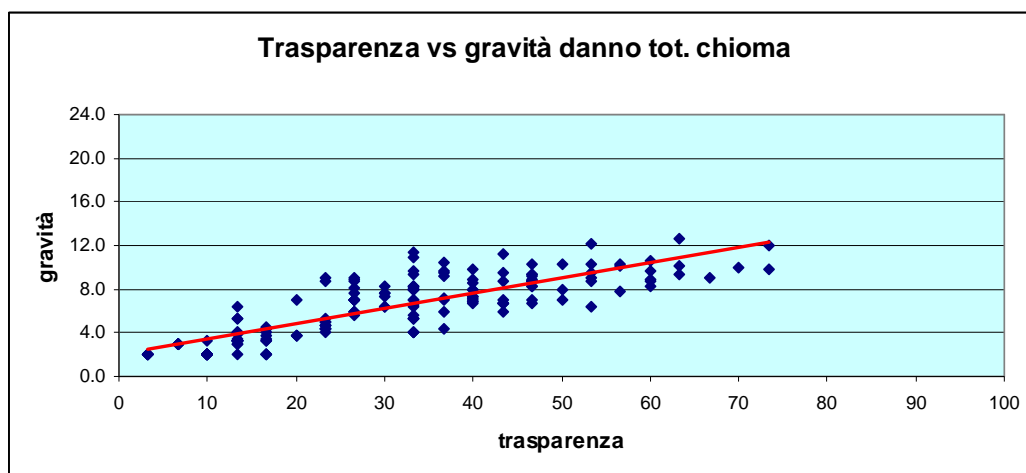


Figura 17. Regressione lineare tra trasparenza della chioma e gravità del danno totale alla chioma.

La retta di regressione tra diametro e gravità del danno totale alla chioma mostra un coefficiente negativo indicando che all'aumentare delle dimensioni della pianta il danno riscontrabile sulla chioma è significativamente minore.

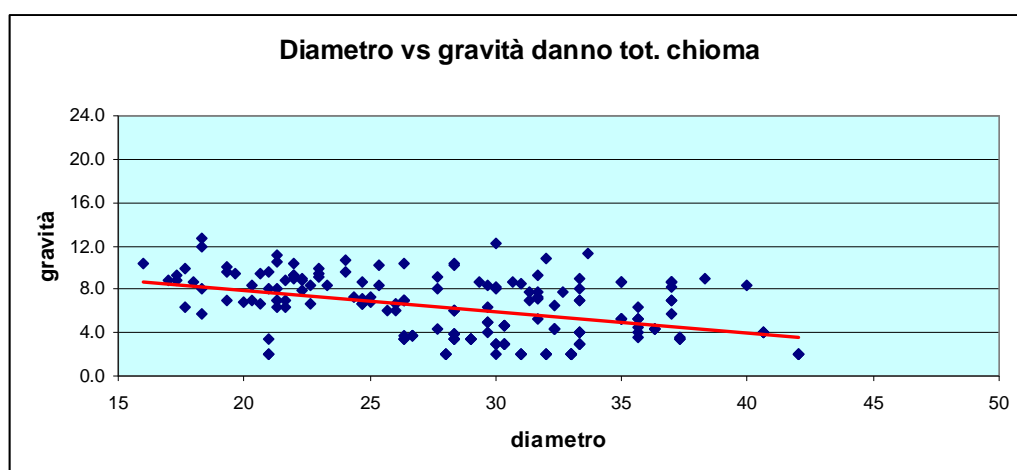


Figura 18. Regressione lineare tra diametro e gravità del danno totale alla chioma.

La retta di regressione tra altezza e gravità del danno totale alla chioma presenta un coefficiente negativo indicando che all'aumentare dell'altezza delle piante il danno registrabile sulla chioma è significativamente minore.

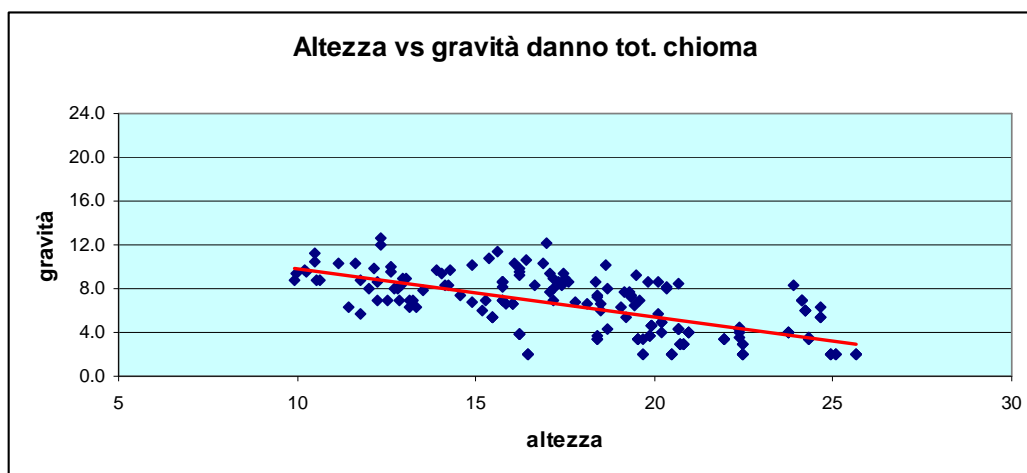


Figura 19. Regressione lineare tra altezza e gravità del danno totale alla chioma.

7.4 Discussione

Cerro

Le osservazioni condotte nelle aree di Cerro della provincia di Firenze e di Arezzo hanno messo in evidenza situazioni fitosanitarie piuttosto disformi. Sussistono infatti aree risultate sensibilmente danneggiate rispetto ad altre in condizioni fitosanitarie migliori. Questa elevata disformità è stata evidenziata tra le due province, ma anche tra le singole aree di monitoraggio, non tra i punti di rilievo.

I danni riscontrati risultano maggiormente gravi nelle aree fiorentine, qualsiasi parametro di danno si prenda in considerazione tra quelli utilizzati e sia che si consideri la frequenza delle osservazioni che l'intensità dei danni. E' stato inoltre evidenziato come il danno alle porzioni esterne della chioma (rami di piccole dimensioni) sia molto frequente nei soprassuoli ed è ipotizzabile che questo sia la manifestazione iniziale di stati di sofferenza delle piante ad opera dei fattori abiotici (A.A.V.V., 1994). Nelle aree dove sono state rilevate gravità elevate per i disseccamenti dei rami di piccole dimensioni sono stati osservati anche i disseccamenti delle branche più grosse della ramificazione. Tali osservazioni sottolineano la gradualità del fenomeno di disseccamento dalle porzioni cacuminali verso quelle più basse della chioma, manifestazione piuttosto comune nei fenomeni di sofferenza per le piante di Cerro in caso di stress abiotici (A.A.V.V., 1994; Bussotti, 2001) e compatibili anche con i primi sintomi dell'azione di *B. mediterranea*.

Le differenze fitosanitarie osservate nelle province possono essere spiegate considerando il regime termo-pluviometrico più asciutto e caldo che caratterizza la provincia fiorentina (ARSIA, 2008). I territori aretini, invece, soggetti a temperature mediamente più miti ed a maggiori apporti idrici, permetterebbero alle piante di vegetare in condizioni "meno stressanti".

Le analisi hanno permesso di individuare le aree come le unità di riferimento per la valutazione delle condizioni fitosanitarie e, sulla base della gravità, è stata realizzata una classifica per evidenziare i siti nelle peggiori condizioni. Tale classifica è risultata utile per le seguenti fasi di lavoro.

L'analisi dei dati dendro-morfometrici in relazione al danno tot. alla chioma registrato, ha evidenziato che la trasparenza e la compressione della chioma sono correlati con i danni osservati, rispettivamente, in modo direttamente ed inversamente proporzionale.

La trasparenza, parametro che esprime sinteticamente l'efficienza fotosintetica di una pianta rispetto ad un soggetto ideale in buone condizioni, aumenta all'aumentare del danno. Questo significa che i disseccamenti comportano effettivamente una diminuzione del fogliame con conseguente depauperamento delle risorse per la pianta.

Nel caso della compressione della chioma, definita come il grado di libertà della chioma rispetto alle piante vicine, si è osservato invece che al suo aumentare il danno va progressivamente diminuendo. Questa relazione è interpretabile considerando la struttura orizzontale dei popolamenti di cerro regionali. Chiome maggiormente vicine, ma non compenetranti, costituiscono una copertura uniforme che permette una maggior conservazione dell'umidità relativa ed una minore perdita di acqua dal suolo per evaporazione. Questo microclima contribuirebbe a migliorare le condizioni edafiche limitando il disseccamento delle porzioni distali della chioma.

Gli altri parametri dendro-morfometrici analizzati non hanno invece prodotto alcuna correlazione, probabilmente per una eccessiva omogeneità dei dati derivata dal governo a ceduo riscontrato nei soprassuoli monitorati. Questo tipo di gestione dei soprassuoli di latifoglie, tende ad uniformare sia le altezze che i diametri tra le piante (fatto salvo per le matricine) omogeneizzando la struttura orizzontale e verticale del popolamento.

Pino nero

Le osservazioni condotte nelle aree di Pino nero nelle province di Firenze ed Arezzo hanno messo in evidenza situazioni fitosanitarie molto eterogenee per i parametri considerati. Le condizioni peggiori, prescindendo dal parametro di danno tra quelli utilizzati, sono riscontrabili nella provincia fiorentina, sia per frequenza che per gravità. Considerando i singoli parametri di danno è stato osservato che i dati per le due province sono tendenzialmente più simili per le alterazioni cromatiche mentre si registra una differenza più marcata per la microfillia e la perdita precoce degli aghi.

Tra i tre precedenti parametri considerati, la microfillia appare essere quella che contraddistingue maggiormente le due province e che precedenti studi hanno già dimostrato essere correlata a fenomeni di stress ambientale (Piussi e Torta, 1994).

Il regime termo-pluviometrico maggiormente asciutto e caldo che caratterizza i territori fiorentini rispetto a quelli aretini (ARSIA, 2008) potrebbe essere la causa delle peggiori condizioni fitosanitarie riscontrate.

I test statistici condotti sui dati di gravità calcolata per i vari parametri di danno considerati, hanno evidenziato diversità statisticamente significative sia tra le due province che tra le singole aree di monitoraggio, ma non per i punti di rilievo. Ciò ha permesso di considerare l'area come unità di riferimento per stimare le condizioni fitosanitarie dei soprassuoli e sulla base della gravità è stata stilata una classifica per mettere in evidenza le situazioni più gravi. Tale classifica è stata utilizzata per il campionamento del materiale per le analisi di laboratorio illustrato in seguito nel presente lavoro.

Le correlazioni dei parametri dendro-morfologici con i danni hanno evidenziato che la struttura del popolamento ha un'influenza significativa sulle condizioni fitosanitarie, validando quanto già osservato empiricamente nei soprassuoli, ossia che le piante di maggiori dimensioni si presentano generalmente in condizioni fitosanitarie migliori.

I rimboschimenti di Pino nero tipici dell'Appennino Tosco-Emiliano, effettuati soprattutto nel periodo post-bellico, sono stati eseguiti con densità molto elevate e su suoli piuttosto superficiali. Nel tempo i tagli di selezione e diradamento sono stati spesso disattesi sottoponendo le piante ad una forte concorrenza intraspecifica. Questo ha determinato una selezione a vantaggio delle piante che sono state capaci di colonizzare più velocemente lo spazio sia in senso verticale che orizzontale. Le maggiori dimensioni, infatti, hanno garantito a questi individui un miglior accesso alle risorse nutritive (acqua, luce, minerali) rendendoli maggiormente tolleranti nei confronti degli stress ambientali.

In modo complementare, i danni rilevati sulle piante dei piani inferiori del bosco erano maggiormente diffusi e risultavano massimi per quelle costituenti il piano dominato, spesso ricettacolo di organismi patogeni e insetti dannosi.

8. Relazione fra dati del monitoraggio e presenza di patogeni fungini valutate con metodi molecolari

8.1 Scopo del lavoro

Valutazione della presenza di patogeni opportunisti *Biscogniauxia mediterranea* e *Diplodia pinea* nelle piante asintomatiche monitorate mediante metodi convenzionali di coltura in vitro e tecniche molecolari.

8.2 Materiali e metodi

8.2.1 Materiale vegetale

Sulla base delle elaborazioni dei dati raccolti in campo precedentemente illustrate, sono state selezionate quattro aree (due per ogni specie vegetale). Tali aree corrispondono, secondo quanto riportato nelle graduatorie precedentemente stilate, ai siti che versavano nelle condizioni sanitarie migliori e peggiori per le due specie vegetali considerate. Le aree di Cerro sono entrambe localizzate nei territori del comprensorio del Mugello in provincia di Firenze.

Quella in condizioni fitosanitarie migliori è ubicata in prossimità dell'invaso del Bilancino nel comune di Barberino di Mugello (43°58'16.06"N, 11°15'17.92"E; UTM-WGS84) ad una quota di circa 290 m s.l.m. e l'altra, nel comune di Vaglia (43°55'45.85"N, 11°17'7.23"E; UTM-WGS84), a circa 300 m s.l.m.

Per il Pino nero invece l'area migliore è ubica nel comune di Pelago, frazione Consuma (43°47'23.08"N, 11°34'22.50"E; UTM-WGS84) a quota 880 m s.l.m., mentre quella che versa nelle peggiori condizioni fitosanitarie è sita nel comune di Borgo S. Lorenzo, frazione di Razuolo (44° 2'8.45"N, 11°27'52.63"E; UTM-WGS84) ad una quota di circa 720 m s.l.m.

In ognuna di esse sono stati scelti tre punti di rilievo censiti nel monitoraggio (tab.13). In questi punti sono stati prelevati dalle piante asintomatiche due rami apicali di circa 15 cm di lunghezza nei mesi di ottobre-novembre dell'anno 2009. I campioni sono stati quindi portati in laboratorio e preparati per le analisi successive.

Specie	Area	Punto	Condizioni fitosanitarie	Località	Coordinate UTM-WGS84		Altimetria [m s.l.m.]
					N	E	
CERRO	XKMD4	XKMD4-2	+	Barberino di Mugello	43°58'16,50"	11°15'20,62"	289
		XKMD4-5	+		43°58'16,06"	11°15'17,92"	293
		XKMD4-7	+		43°58'17,77"	11°15'15,92"	289
CERRO	ZOGF4	ZOGF4-2	-	Vaglia	43°55'46,70"	11°17'5,69"	305
		ZOGF4-4	-		43°55'46,69"	11°17'7,05"	310
		ZOGF4-7	-		43°55'46,26"	11°17'9,75"	307
PINO NERO	*TOLH4	TOLH4-4	+	Pelago	43°47'22,24"	11°34'21,24"	876
		TOLH4-5	+		43°47'23,08"	11°34'22,50"	873

		TOLH4-8	+		43°47'21,09"	11°34'22,15"	891
PINO NERO	PB5C4	PB5C4-4	-	Borgo S. Lorenzo	44°2'8,03"	11°27'51,63"	709
		PB5C4-5	-		44°2'8,45"	11°27'52,63"	720
		PB5C4-7	-		44°2'8,03"	11°27'52,68"	726

* l'area TOLH4 sostituisce l'area TD5C4 poiché al momento del campionamento del materiale, quest'ultima era interessata da operazioni di taglio a carico delle piante monitorate.

Tabella 14. Informazioni delle aree e dei punti di campionamento per il prelievo dei campioni asintomatici da sottoporre ad analisi di laboratorio.

8.2.2 Preparazione dei campioni

Ogni ramo è stato sezionato in tre parti e sterilizzato mediante un protocollo basato su lavaggi successivi in etanolo, ipoclorito di sodio ed acqua sterile (Lodge et al., 1996; Luchi et al., 2005a; Luchi et al., 2005b) al fine di eliminare i microrganismi presenti sulla superficie esterna. Ciascuna parte è stata divisa longitudinalmente in due porzioni. In seguito, una delle due porzioni è stata sezionata in sette frammenti che sono stati trasferiti su terreno agarizzato 1,5% PDA (Difco - Potato Dextrose Agar), al fine di isolare i microrganismi presenti.

Le piastre sono state incubate a temperatura ambiente e controllate settimanalmente per un periodo di circa un mese. Al termine del periodo di osservazione delle piastre è stato eseguito un conteggio dei microrganismi presenti distinguendo tra batteri, altri funghi ed i due patogeni d'interesse (*Biscogniauxia mediterranea* e *Diplodia pinea*).

I frammenti provenienti dalla seconda porzione sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA. Il materiale è stato preventivamente macinato in azoto liquido e quindi si è proceduto all'estrazione degli acidi nucleici con il kit DNeasy Plant Minikit (Qiagen) secondo il protocollo fornito dal produttore.

La concentrazione e la qualità di DNA estratto per i campioni di Cerro e Pino nero è stata misurata mediante lo spettrofotometro Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Il DNA estratto è stato utilizzato per l'analisi in Real-Time PCR.

8.2.3 Protocollo Real-Time PCR per *Biscogniauxia mediterranea*

Primers e probe (*B. mediterranea*)

In accordo a precedenti esperienze (Luchi et al., 2005a) sono stati utilizzati il primer forward (5'-GGT CGT GGT GTG TAG CGT GA-3') ed il primer reverse (5'-TGA CAG GTC TTT CAG CGT GG-3') che si intercalano nella regione ITS1 del DNA ribosomale. La sequenza della sonda fluorogena che si intercala tra i due primers è la seguente: 5'-CGC TAT AAG GGA TCA CCG CCT CGC- 3'. All'estremità della sonda (probe) sono legati con legami covalenti i due fluorofori FAM (6-carboxy-fluorescein) in posizione 5' ed il fluoroforo TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) in posizione 3'

che reagiscono all'eccitazione luminosa esercitata dal termociclatore durante l'amplificazione degli acidi nucleici. La lunghezza dell'amplificato prodotto è di 66 pb.

Condizione di amplificazione (*B. mediterranea*)

La Real-time PCR è stata effettuata in piastre da 96 pozzetti (Micro AMP optical by Applied Biosystem) utilizzando il termociclatore ABI Prism 7900 Sequence Detector (Applied Biosystems). In ogni pozzetto sono stati miscelati 300 nmol l⁻¹ di primer forward (Applied Biosystem), 300 nmol l⁻¹ di primer revers (Applied Biosystem), 200 nmol l⁻¹ di probe (Applied Biosystem), 12,5 µl TaqManTM Universal Master Mix (Applied Biosystem) e 5 µl di DNA estratto (20 ng/tubo).

Ogni campione è stato analizzato in duplicato ed in ogni piastra sono stati inseriti due pozzetti controllo con acqua sterile (NTC).

Il ciclo impostato prevede una routine di 2 min. a 50°C, 10 min. a 95°C, 45 cicli a 95°C per 30s ognuno e 1 minuto a 60°C. L'analisi completa ha richiesto circa 2h 45 min.

Curva standard (*B. mediterranea*)

La curva standard di riferimento è stata allestita usando l'isolato BM6 della collezione del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie – Sezione Protezione delle piante (Luchi et al., 2005a). La concentrazione del DNA di riferimento è stata misurata tramite spettrofotometro Nanodrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) a 260 nm e la qualità del DNA è stata valutata dal rapporto tra le assorbanze misurate a 260 e 280 nm (A260/A280). La concentrazione registrata a 260 nm è risultata di 146 ng/µl. Successivamente sulla piastra a 96 pozzetti del termociclatore sono state allestite sette diluizioni seriali 1:5, ognuna con una replica, del campione BM6 definendo così sette punti standard con valori di concentrazione compresi tra 5x10³ pg DNA e 0,32 pg DNA/tubo.

Standardizzazione dei risultati (*B. mediterranea*)

La soglia di rilevamento della fluorescenza degli amplificati è stata impostata manualmente sulla base di esperienze pregresse. In seguito i risultati prodotti sono stati analizzati tramite il software SDS (Sequence Detection System) fornito con il termociclatore.

La quantità di DNA di *Biscogniauxia mediterranea* rilevata nei campioni è stata quindi espressa come pg di DNA di fungo su µg di DNA totale estratto (Winton et al., 2002).

8.2.4 Protocollo Real-Time PCR per *Diplodia Pinea*

Primers e probe (*D. pinea*)

Per l'analisi sono stati utilizzati il primer forward (5'-GTAAAACTGACGTTGAGGGACG-3') ed il primer reverse (5'-CATAATTG TCTGCCCCGGACTACT-3') intercalanti della regione ITS1 del DNA ribosomale in accordo a precedenti esperienze (Luchi et al., 2005b). La sonda (5'-AGGCTCGGGTAGCGAATAGGATTAGATACCC-3') è legata tramite legami covalenti a due fluorofori, FAM (6-carboxy-fluorescein) in posizione 5' ed il fluoroforo TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) in posizione 3', che reagiscono all'eccitazione luminosa prodotta dal termociclatore durante l'amplificazione del DNA. La lunghezza dell'amplificato prodotto è di 79 paia di basi.

Condizione di amplificazione (*D. pinea*)

Per l'analisi Real-time PCR sono stati utilizzati piastre da 96 pozzetti (Micro AMP optical by Applied Biosystem) ed il termociclatore ABI Prism 7900 Sequence Detector (Applied Biosystems). In ogni pozzetto sono stati miscelati 300 nmol l⁻¹ di primer forward (Applied Biosystem), 300 nmol l⁻¹ di primer reverse (Applied Biosystem), 200 nmol l⁻¹ di probe (Applied Biosystem), 12,5 µl TaqManTM Universal Master Mix (Applied Biosystem) e 5 µl di DNA estratto (150 ng/tubo). Ogni campione è stato analizzato in duplicato e per ogni piastra sono stati inseriti due pozzetti di controllo con acqua sterile (NTC). Il ciclo prevede una routine di 2 min. a 50°C, 10 min. a 95°C, 45 cicli a 95°C per 15s ognuno e 1 minuto a 60°C. L'analisi completa impiega circa 2h 30 min.

Curva standard (*D. pinea*)

La curva standard di riferimento è stata allestita usando l'isolato S7 dalla collezione del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie – Sezione Protezione delle piante (Luchi et al., 2005b). La concentrazione del DNA dell'isolato è stata misurata tramite spettrofotometro Nanodrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) a 260 nm e la sua qualità valutata dal rapporto tra le assorbanze misurate a 260 e 280 nm ($A_{260}/A_{280} = 1.8$). La concentrazione registrata a 260 nm è risultata di 44 ng/µl. In seguito sono state allestite nella piastra a 96 pozzetti sette diluizioni seriali 1:5 del campione S7, ognuna con una replica, definendo così sette punti standard con valori di concentrazione compresi tra 5×10^3 pg DNA e 0,32 pg DNA/tubo.

Standardizzazione dei risultati (*D. pinea*)

La soglia di rilevamento della fluorescenza degli amplificati è stata impostata manualmente sulla base di esperienze pregresse. In seguito i risultati prodotti sono stati

analizzati tramite il software SDS (Sequence Detection System) fornito con il termociclatore.

La quantità di DNA di *Diplodia pinea* rilevata nei campioni è stata poi espressa come pg di DNA di fungo su µg di DNA totale estratto (Winton et al., 2002).

8.3 Risultati

8.3.1 Isolamenti in vitro - Cerro

Considerando i tre punti di rilievo di ognuna delle due aree si osserva che i frammenti campionati in ZOGF4, l'area con condizioni fitosanitarie peggiori (-), hanno prodotto un maggior numero di colonie di *B. mediterranea* (21,4%; 21,4%; 26,2%) rispetto a campioni prelevati nei punti dell'area in condizioni fitosanitarie migliori, XKMD4 (8,7%; 0%; 3,2%). Globalmente si osserva che i frammenti prelevati in ZOGF4 hanno prodotto nel 23% dei casi, colonie del fungo, contro il 4% di quelli provenienti da XKMD4.

Solo in un numero esiguo di casi si è riscontrata la presenza di batteri in piastra confermando la validità del protocollo di sterilizzazione utilizzato.

Area	Punto	Specie ospite	Condizione della stazione	Frammenti positivi [n°]			Frammenti positivi [%]			
				Batteri	Altri funghi	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	Batteri	Altri funghi	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	
XKMD4	XKMD4-2	Cerro	+	4	111	11	3,2	88,1	8,7	
	XKMD4-5		+	4	122	0	3,2	96,8	0,0	
	XKMD4-7		+	5	117	4	4,0	92,9	3,2	
ZOGF4	ZOGF4-2	Cerro	-	9	90	27	7,1	71,4	21,4	
	ZOGF4-4		-	0	99	27	0,0	78,6	21,4	
	ZOGF4-5		-	0	93	33	0,0	73,8	26,2	
Totale XKMD4 [n° 378]			+	13	350	15	3,4	92,6	4,0	
Totale ZOGF4 [n° 378]			-	9	282	87	2,4	74,6	23,0	
Totale complessivo [n° 756]					22	632	102	2,9	83,6	13,5

Tabella 15. Risultati delle culture in vitro suddivise per provenienza dei campioni. I simboli + e - contraddistinguono l'area in condizioni fitosanitarie migliori e peggiori come risulta dai dati del monitoraggio.

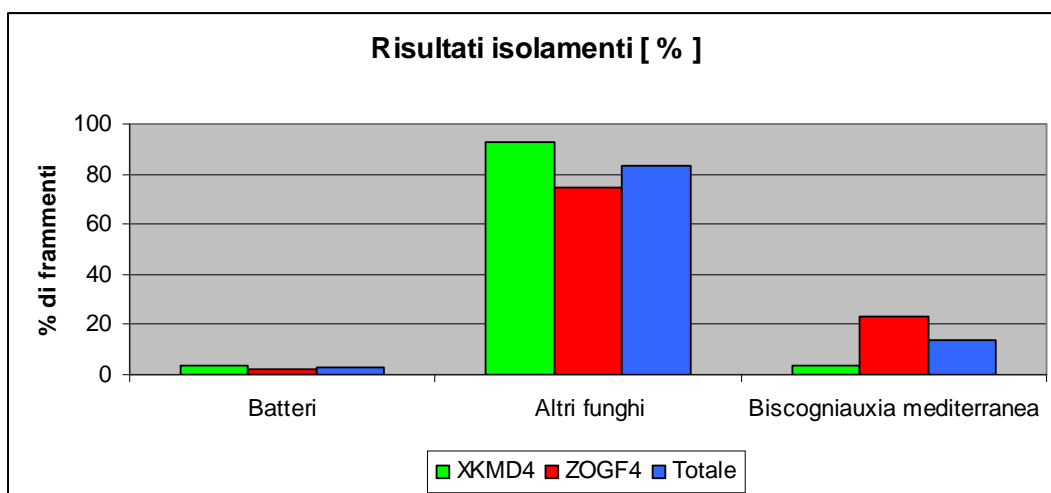


Figura 20. Risultati complessivi delle culture in vitro. Confronto tra le due aree ed i valori totali suddivisi per le tre categorie di osservazioni condotte (batteri, altri funghi e *B. mediterranea*).

Il test Kruskal-Wallis eseguito con il software SPSS ver.17.0 (IBM®) per verificare la differenza per le tre categorie di osservazioni condotte (batteri, altri funghi e *B. mediterranea*) per le due aree ha rivelato che XKMD4 e ZOGF4 risultano significative diverse per la categoria “*B. mediterranea*”, ma non per le altre due categorie “altri funghi” e “batteri”.

Non avendo proceduto ad una identificazione delle colonie diverse da *B. mediterranea* non è stato possibile evidenziare differenze tra le aree soltanto basandosi sul numero di funghi rinvenuti in piastra, mentre nel caso dei batteri la sterilizzazione condotta nel tentativo di eliminare gli agenti inquinanti ha ridotto la fonte di variazione facendo perdere significatività al test.

Osservazioni	Aree	Media dei ranghi	χ^2	Significatività	gdl
batteri	XKMD4	4,00	0,455*	0,500	1
	ZOGF4	3,00			
altri funghi	XKMD4	5,00	3,857*	0,050	1
	ZOGF4	2,00			
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	XKMD4	2,00	3,971*	0,046	1
	ZOGF4	5,00			

* $p < 0,05$

Tabella 16. Risultati del test Kruskal-Wallis per i dati degli isolamenti condotti su Cerro.

8.3.2 Real-Time PCR - Cerro

La curva standard di riferimento per la quantificazione del DNA estratto è stata costruita correlando i valori di Ct (asse y) con la concentrazione delle diluizioni seriali del

campione di riferimento BM6 (asse x). I valori di ogni diluizione sono calcolati come media delle due repliche preparate per ogni pozzetto.

La curva standard mostra un R^2 di 0,99 ed un'intercetta di -1,26.

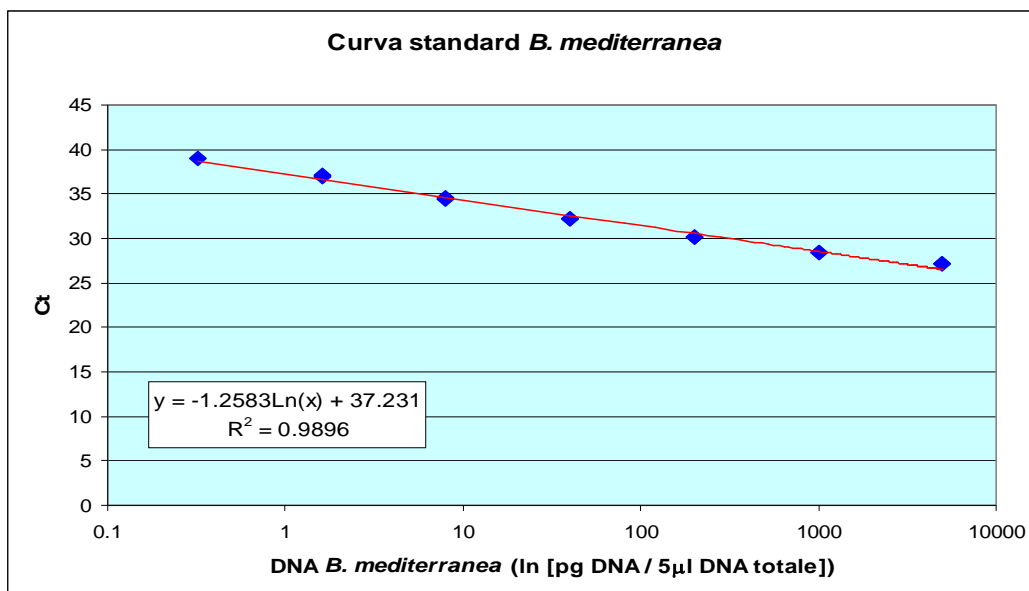


Figura 21. Curva standard per *Biscogniauxia mediterranea*.

Le quantità di DNA estratto dai trentasei campioni variano, escludendo i campioni negativi, tra i 3,2 ed i 564,9 pg di fungo / μg DNA totale estratto (dev.st. $\pm 95,9$).

Area n°=18	Punto n°=6	Condizioni area-punto	pg <i>B.mediterranea</i> / μg DNA Tot	Dev.St.	DNA max	DNA min
XKMD4	XKMD4-2	+	2,5	4,6	11,5	0,0
	XKMD4-5	+	0,0	0,0	0,0	0,0
	XKMD4-7	+	11,9	19,1	43,7	0,0
ZOGF4	ZOGF4-2	-	129,8	219,2	564,9	0,0
	ZOGF4-4	-	33,4	28,9	83,2	0,0
	ZOGF4-7	-	42,3	30,7	564,9	21,6
Totale XKMD4		+	4,8	11,9	43,7	0,0
Totale ZOGF4		-	68,5	389,6	0,0	0,0
Totale campioni [n°=36]			36,6	95,9	564,9	0,0

Tabella 17. Quantità medie di DNA di *B. mediterranea* espresse come pg del fungo / μg DNA totale estratto calcolate per i punti di campionamento, per le aree del monitoraggio e per tutti i campioni analizzati.

Analizzando i dati per i singoli punti si osserva che le quantità medie ottenute dai campioni provenienti dall'area in migliori condizioni fitosanitarie, XKMD4 (+), hanno sempre valori più bassi (2,5; 0; 11,9) rispetto a quelli dell'area in condizioni peggiori ZOGF4 (-) (129,8; 33,4; 42,3).

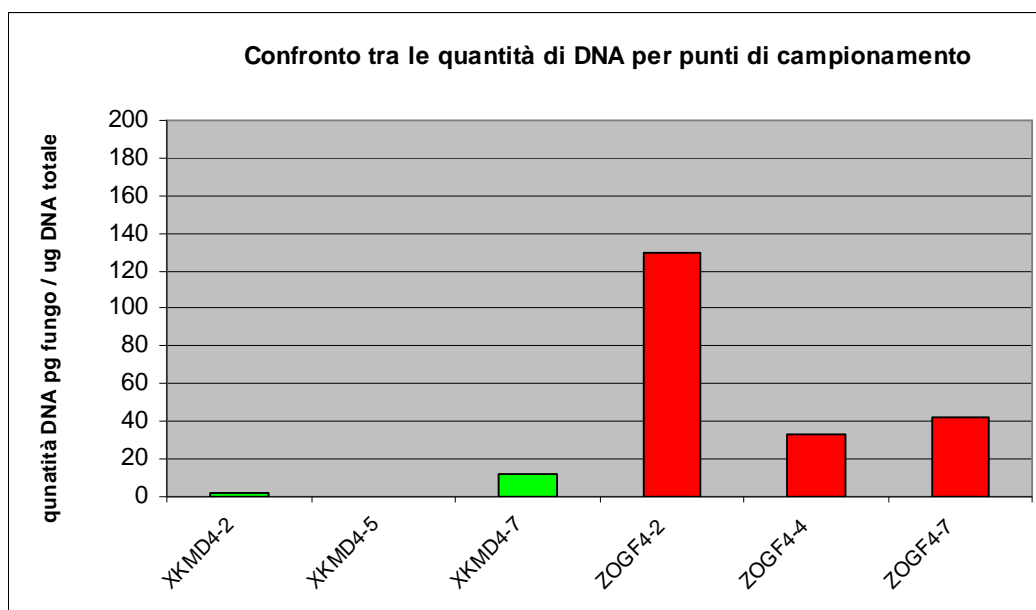


Figura 22. Confronto tra i valori medi delle quantità di DNA calcolate per ogni punto di campionamento. In verde ed in rosso i risultati del materiale proveniente dall'area in condizioni fitosanitarie migliori (+) e peggiori (-).

Confrontando tra loro i valori calcolati per ognuno dei 36 campioni analizzati si osserva che la frequenza dei risultati positivi è maggiore nell'area in condizioni fitosanitarie peggiori (figura 23, istogrammi rossi) e che i valori delle quantità di DNA ottenuti sono nella maggior parte dei casi superiori rispetto a quelli dell'altra area.

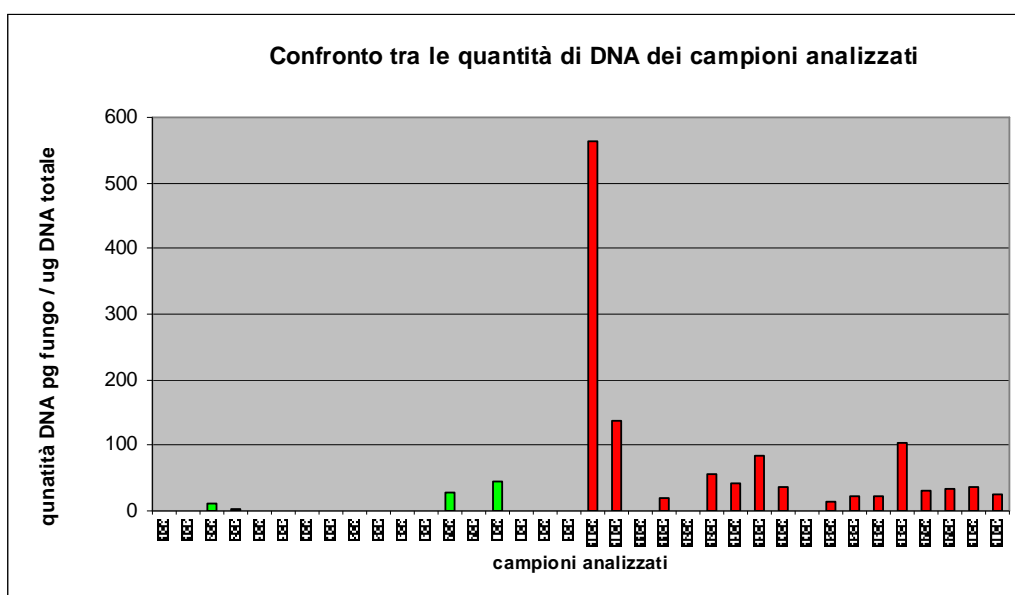


Figura 23. Confronto tra i valori delle quantità di DNA ottenuti per ogni campione. In verde ed in rosso i risultati del materiale proveniente rispettivamente dall'area in condizioni fitosanitarie migliori (+) e peggiori (-).

Le quantità di DNA ottenute sono state sottoposte al test statistico di Mann-Whitney (U test). I risultati del test rivelano che le quantità medie di DNA per l'area XKMD4 (+), area nelle migliori condizioni fitosanitarie, sono significativamente diverse e più basse rispetto a quelle dell'area ZOGF4 (-), rafforzando quanto già osservato per i dati riguardanti gli isolamenti.

	Aree	Media dei ranghi	U
DNA	XKMD4	12,17	48,00*
	ZOGF4	24,83	

* $p < 0,05$

Tabella 18. Risultati del test di Mann-Whitney per le quantità di DNA di *B. mediterranea*

Considerando il numero di piante risultate positive alle due tecniche diagnostiche si osserva una buona corrispondenza dei risultati. I valori più elevati, infatti, si riscontrano per la diagnosi effettuata con tecniche molecolari confermando la maggior sensibilità di tali metodi rispetto ai tradizionali.

Specie	Area	Punti	Condizioni fitosanitarie	Località	Piante positive [n°]	
					Isolamenti	Real-Time PCR
CERRO	XKMD4	XKMD4-2	+	Barberino di Mugello	1	1
		XKMD4-5	+		0	0
		XKMD4-7	+		2	2
CERRO	ZOGF4	ZOGF4-2	-	Vaglia	3	3
		ZOGF4-4	-		2	3
		ZOGF4-7	-		3	3

Tabella 19. Confronto tra i risultati ottenuti con i due metodi di diagnosi utilizzati espressi come numero di piante di Cerro infette. Piante totali analizzate n° = 18.

8.3.3 Isolamenti in vitro - Pino nero

I risultati ottenuti dalle prove di crescita condotte sul materiale di Pino nero rivelano che il maggior numero di colonie di *Diplodia pinea* sono state isolate dal materiale campionato nell'area che si presentava, secondo i risultati del monitoraggio, in peggiori condizioni fitosanitarie. Il materiale proveniente da PB5C4 (-) ha prodotto nel 22% dei campioni, colonie di *D. pinea*, rispetto a quello proveniente da TOLH4 (+) con solo il 4,2%. Analizzando i dati per i singoli punti, i valori percentuali più elevati sono sempre stati ottenuti dal materiale campionato nei punti dell'area con maggiori danni rilevati (29,4%; 23%, 13,5%), rispetto a quella in migliori condizioni fitosanitarie (10,3%, 0%, 2,4%).

Area	Punto	Specie ospite	Condizione della stazione	Frammenti positivi [n°]			Frammenti positivi [%]			
				Batteri	Altri funghi	<i>Diplodia pinea</i>	Batteri	Altri funghi	<i>Diplodia pinea</i>	
TOLH4	TOLH4-4	Pino nero	+	0	113	13	0,0	89,7	10,3	
	TOLH4-5		+	6	120	0	4,8	95,2	0,0	
	TOLH4-8		+	0	123	3	0,0	97,6	2,4	
PB5C4	PB5C4-4	Pino nero	-	0	89	37	0,0	70,6	29,4	
	PB5C4-5		-	0	97	29	0,0	77,0	23,0	
	PB5C4-7		-	0	109	17	0,0	86,5	13,5	
Totale PB5C4 [n° 378]			+	6	356	16	1,6	94,2	4,2	
Totale TOLH4 [n° 378]			-	0	295	83	0,0	78,0	22,0	
Totale complessivo [n° 756]					6	651	99	0,8	86,1	13,1

Tabella 20. Risultati delle culture in vitro suddivise per provenienza dei campioni. I simboli + e - contraddistinguono l'area in condizioni fitosanitarie migliori e peggiori come risulta dai dati del monitoraggio.

Dai risultati del test di Kruskal-Wallis eseguito con il software SPSS ver.17.0 (IBM®) sui dati degli isolamenti, si osserva che le due stazioni TOLH4 (+) e PB5C4 (-) risultano statisticamente diverse per la categoria *D. pinea* mentre non vi è significatività per quanto riguarda le categorie “altri funghi” e “batteri”. Come nel caso del Cerro, per la categoria “altri funghi” il fatto di non aver determinato le specie rinvenute, non permette di distinguere le due aree per la componente fungina diversa dal patogeno d'interesse, mentre per la categoria “batteri”, il protocollo di sterilizzazione adottato sui campioni ha eliminato la maggior parte dei batteri presenti riducendo la fonte di variazione del campione e facendo perdere significatività al test.

Osservazioni	Aree	Media dei ranghi	χ^2	Significatività	gdl
batteri	TOLH4	4,00	1,000*	0,317	1
	PB5C4	3,00			
altri funghi	TOLH4	5,00	3,857*	0,050	1
	PB5C4	2,00			
<i>Diplodia pinea</i>	TOLH4	2,00	3,857*	0,049	1
	PB5C4	5,00			

* $p < 0.05$

Tabella 21. Risultati del test Kruskal-Wallis per i dati degli isolamenti condotti su Pino nero.

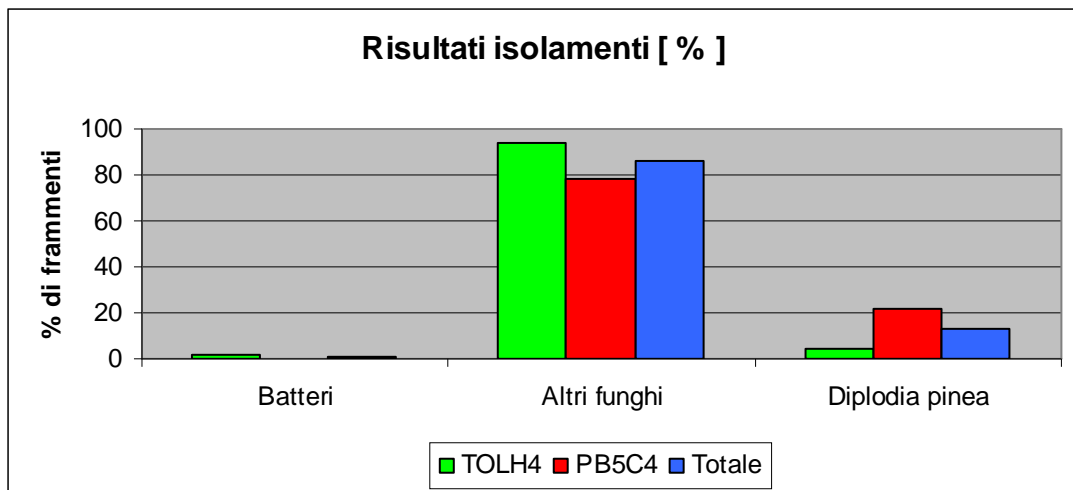


Figura 24. Risultati complessivi delle culture in vitro. Confronto tra le due aree ed i valori totali suddivisi per le tre categorie di osservazioni condotte (batteri, altri funghi e *D. pinea*).

8.3.4 Real-Time PCR - Pino nero

La curva standard di riferimento per la quantificazione del DNA estratto è stata costruita correlando i valori di Ct (asse y) con la concentrazione delle diluizioni seriali del campione di riferimento S7 (asse x). I valori di ogni diluizione sono calcolati come media delle due repliche preparate per ogni pozzetto.

La curva standard mostra un R^2 di 0,99 ed un'intercetta di -1,6.

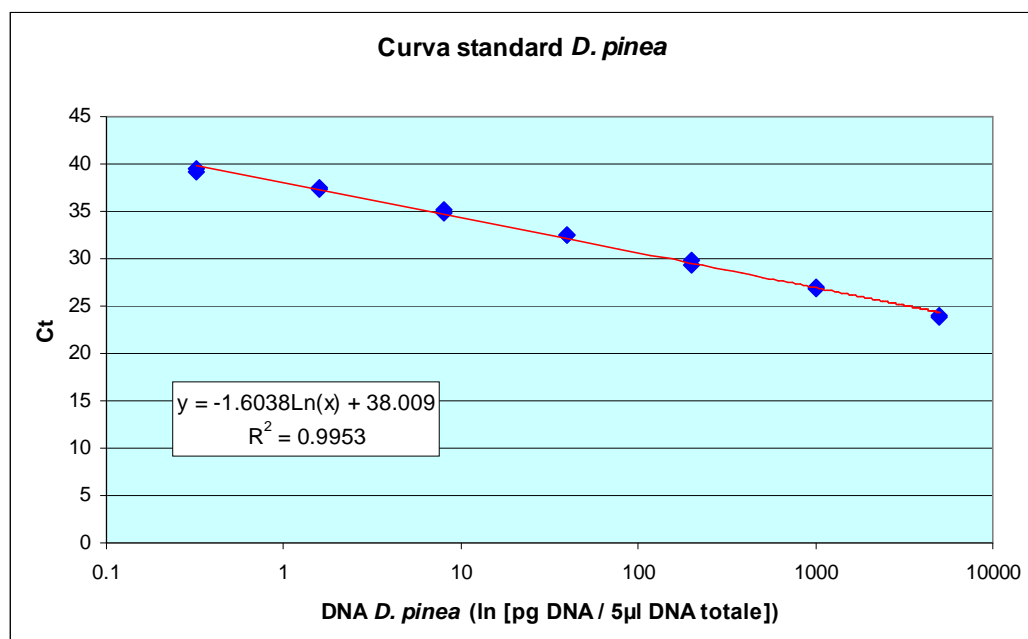


Figura 25. Curva standard per *Diplodia pinea*.

Escludendo i campioni negativi all'analisi, le quantità di DNA estratto dai trentasei campioni variano, da 0,3 a 23.694,8 pg di fungo / μg DNA totale estratto (dev.st. \pm 3.993,3).

Area n°=18	Punto n°=6	Condizioni area-punto	pg <i>D.pinea</i> / μg DNA Tot	Dev.St.	DNA max	DNA min
TOLH4	TOLH4-4	+	216,2	335,8	859,1	0,0
	TOLH4-5	+	31,8	25,8	59,2	2,2
	TOLH4-8	+	54,3	116,6	292,1	0,3
PB5C4	PB5C4-4	-	209,5	282,1	772,7	20,3
	PB5C4-5	-	4.699,9	9.363,1	23.694,8	49,9
	PB5C4-7	-	1.122,9	1.905,5	4.985,1	46,6
Totale TOLH4		+	99,2	211,5	859,1	0,0
Totale PB5C4		-	2.010,8	5.554,4	20,3	20,3
Totale campioni [n°=36]			1.055,0	3.993,3	23.694,8	0,0

Tabella 22. Quantità medie di DNA di *D. pinea* espresse come pg del fungo / μg DNA totale estratto calcolate per i punti di campionamento, per le aree del monitoraggio e per tutti i campioni analizzati.

Analizzando i dati per i singoli punti si osserva che le quantità medie ottenute dai campioni provenienti dall'area in migliori condizioni fitosanitarie, TOLH4 (+), hanno valori prossimi o minori (216,2; 31,8; 54,3) rispetto a quelli dell'area in condizioni peggiori PB5C4 (-) (209,5; 4.699,9; 1.122,9).

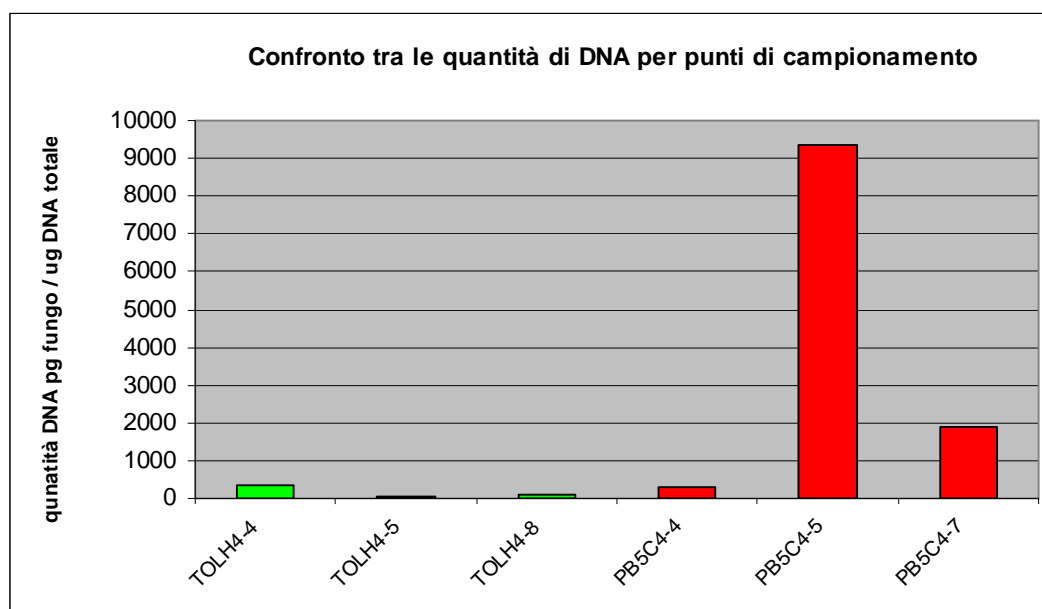


Figura 26. Confronto tra i valori medi delle quantità di DNA calcolate per ogni punto di campionamento. In verde ed in rosso i risultati del materiale proveniente dall'area in condizioni fitosanitarie migliori (+) e peggiori (-).

Confrontando tra loro i valori calcolati per ognuno dei trentasei campioni analizzati si osserva che la frequenza dei risultati positivi risulta maggiore per il materiale proveniente dall'area in condizioni fitosanitarie peggiori (istogrammi rossi in figura 27) e che i valori delle quantità di DNA ottenuti sono nella maggior parte dei casi superiori rispetto a quelli dell'altra area.

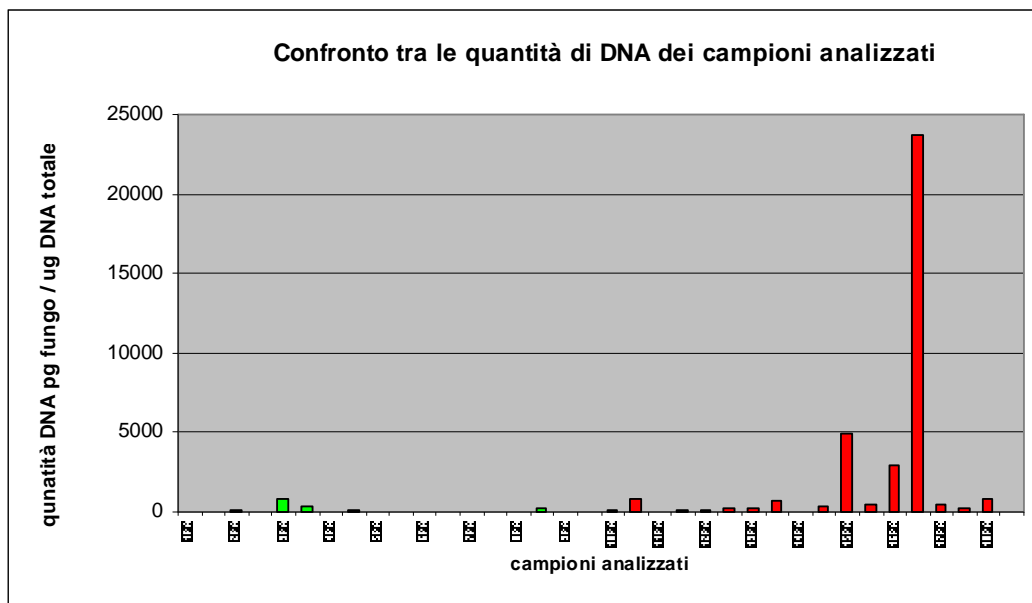


Figura 27. Confronto tra i valori delle quantità di DNA ottenuti per ogni campione. In verde ed in rosso i risultati del materiale proveniente rispettivamente dall'area in condizioni fitosanitarie migliori (+) e peggiori (-).

Successivamente le quantità di DNA sono state sottoposte al test statistico di Mann-Whitney (U test). I risultati del test rivelano che le quantità medie di DNA per l'area TOLH4 (+) ossia dell'area che si presentava in condizioni fitosanitarie migliori, sono significativamente diverse e più basse rispetto a quelle dell'area ZOGF4 (-), confermando le osservazioni condotte sui dati riguardanti gli isolamenti.

	Aree	Media dei ranghi	U
DNA	TOLH4	11,94	44,00*
	PB5C4	25,06	

* $p < 0,05$

Tabella 23. Risultati del test U per le quantità di DNA di *D. pinea*.

Dal confronto dei dati ottenuti con i due metodi diagnostici sulla base del numero di piante risultate positive si osserva che le tecniche molecolari sono più sensibili rispetto alle tradizionali rivelando la presenza del patogeno in tutte le piante censite. In nessun caso si è

invece registrato un numero maggiore di piante positive alla diagnosi tradizionale rispetto a quella con tecniche di biologia molecolare.

Specie	Area	Punti	Condizioni fitosanitarie	Località	Piante positive [n°]	
					Isolamenti	Real-Time PCR
PINO NERO	TOLH4	TOLH4-4	+	Pelago	3	3
		TOLH4-5	+		0	3
		TOLH4-8	+		1	3
PINO NERO	PB5C4	PB5C4-4	-	Borgo	3	3
		PB5C4-5	-	S.	2	3
		PB5C4-7	-	Lorenzo	3	3

Tabella 24. Confronto tra i risultati ottenuti con i due metodi di diagnosi utilizzati espressi come numero di piante di Pino nero infette. Piante totali analizzate n° = 18.

8.4 Discussione

Il materiale prelevato in campo nelle aree sottoposte a monitoraggio nei soprassuoli di Cerro e Pino nero è stato sottoposto ad analisi di laboratorio con tecniche tradizionali e di biologia molecolare per verificare la presenza in fase asintomatica dei patogeni opportunisti *Biscogniauxia mediterranea* per il Cerro e *Diplodia pinea* per il Pino nero.

Sia le analisi tradizionali che quelle molecolari hanno confermato la presenza dei due patogeni nelle aree monitorate, ma le analisi molecolari offrono risultati maggiormente accurati rivelando la presenza dei microrganismi anche nei casi in cui le convenzionali tecniche producono risultati diagnostici negativi. Inoltre le tecniche di Real-time PCR utilizzate permettono la quantificazione del DNA dei microrganismi offrendo una stima del grado d'infezione delle piante.

Per il Cerro si è osservato che nei soprassuoli vi è una netta distinzione tra le aree maggiormente danneggiate e quelle scarsamente danneggiate considerando sia i risultati degli isolamenti che quelli di Real-time PCR. Sulla base dell'analisi molecolare è stato inoltre constatato che le piante dell'area maggiormente danneggiata erano tutte già infettate dal patogeno e che questo per adesso rimane presente nella sua fase latente. Probabilmente le migliori condizioni edafiche della stazione permettono alle piante di mantenere uno stato di vigoria migliore che non permette al patogeno di espletare le sue funzioni patogene.

Come i soprassuoli di Cerro anche quelli di Pino nero sono risultati significativamente diversi sia per il numero di frammenti positivi che hanno prodotto colonie di *D. pinea*, sia per le quantità di DNA che è stato possibile ottenere. L'analisi molecolare tuttavia ha messo in evidenza che la presenza del microrganismo è diffusa indistintamente nei due soprassuoli confermando quanto già emerso in altri studi in merito al largo areale di diffusione del fungo, sebbene la sua presenza sia spesso in fase latente nei tessuti degli

ospiti vegetali (Flowers et al., 2003; Stanosz et al., 1996; Stanosz et al., 1997; Palmer e Nicholls, 1985). Le due aree sono comunque ben distinguibili tra loro per i valori delle quantità di DNA ritraibile dai campioni che sono risultati significativamente maggiori nel materiale proveniente dalle aree in condizioni fitosanitarie peggiori.

9. Relazioni fra variabili climatiche e stato fitosanitario di Cerro e Pino nero in Toscana organizzate in un SIT (sistema informativo territoriale)

9.1 Scopo del lavoro

Integrare tutti i dati ottenuti ed archiviati nel SIT (dati stazionali, dati meteo, dati fitosanitari) per individuare i fattori connessi allo stato di sofferenza osservato nelle aree.

9.2 Materiali e metodi

Tutti i dati ottenuti ed archiviati nel SIT corrispondono ad uno strato informativo separato. La loro natura (vettoriale o raster) oltre alla forma grafica contiene anche informazioni alfa-numeriche in merito alla grandezza fisica che essi rappresentano. Attraverso gli strumenti del software ArcGIS è stato possibile importare sul file contenente i dati del rilievo in campo, tutte le informazioni di natura ambientale. Il risultato prodotto è un database con tutte le informazioni disponibili per i siti d'interesse. I dati esportati in forma tabellare sono stati quindi sottoposti ad analisi statistica mediante il software SPSS 17.0 (IBM®). Sono state realizzate due regressioni lineari multiple (una per ogni specie vegetale considerata) dove come variabile dipendente è stato utilizzato il parametro della gravità del danno totale alla chioma, che esprime sinteticamente tutto il danno osservato, ma che mantiene comunque i trend generali osservati nelle province e nelle aree di monitoraggio per i singoli parametri.

I predittori utilizzati sono stati invece:

- **Marg50:** contenuto di argilla nei primi 50 cm di profondità del suolo (espressa come media ponderale in base a distribuzione suoli e successione orizzonti);
- **Msab50:** contenuto di sabbia nei primi 50 cm di profondità del suolo (espressa come media ponderale in base a distribuzione suoli e successione orizzonti);
- **Mcalc50:** contenuto in calcare totale (espresso come media ponderale in base a distribuzione suoli e successione orizzonti);
- **Mso50:** contenuto in sostanza organica (espressa come media ponderale in base a distribuzione suoli e successione orizzonti);

- **Awc:** acqua disponibile nel terreno espressa in mm/m (espressa come media ponderale in base a distribuzione suoli e successione orizzonti);
- **PmedAR09:** pioggia media mensile dei mesi antecedenti il rilievo (media della pioggia mensile nei mesi di gennaio-luglio dell'anno in cui è stato effettuato il rilievo in campo);
- **TmedAR09:** temperatura media mensile dei mesi antecedenti il rilievo (temperatura media mensile nei mesi di gennaio-luglio dell'anno in cui è stato effettuato il rilievo in campo);
- **PmedVR09:** pioggia media mensile della stagione vegetativa del rilievo (media della pioggia mensile nei mesi aprile-luglio dell'anno in cui è stato effettuato il rilievo in campo);
- **TmedVR09:** temperatura media mensile della stagione vegetativa del rilievo (temperatura media mensile nei mesi di aprile-luglio dell'anno in cui è stato effettuato il rilievo in campo);
- **Quota:** altimetria del luogo in metri sul livello del mare rilevata tramite GPS;
- **Pendenza:** inclinazione del luogo espressa in gradi ricavata dalla carta delle pendenze del SIT.

9.3 Risultati

9.3.1 Dati meteo-ambientali, dati di monitoraggio, analisi di laboratorio - Cerro

La regressione lineare multipla ha individuato sei predittori significativamente validi su undici testati nei vari modelli prodotti dall'analisi. La capacità delle variabili indipendenti di predire il danno è risultata essere altamente significativa ($F_{(6, 173)} = 44,95; p = 0,000$). Il valore di R^2 è pari a 0,61.

I predittori validi sono risultati essere:

- la pioggia media mensile della stagione vegetativa del rilievo,
- la temperatura media del periodo antecedente il rilievo,
- la quantità di argilla,
- la quantità di sabbia,
- la quantità di calcare,
- la quota.

L'equazione prodotta dalla regressione è stata la seguente:

Gravità danno tot. chioma = (-0,105 * pioggia media mensile della stagione vegetativa del rilievo) + (0,549 * temperatura medie mensile periodo precedente il rilievo) + (-0,169 * quantità di argilla) + (-0,071 * quantità di sabbia) + (0,076 * quantità di calcare) + (-0,002 * quota) + 5,246.

Nella seguente tabella si riportano i dati di output della regressione.

Variabili	ANOVA regressione		Risultati regressione				
	$F_{(6, 173)}$	Significatività	R^2	t	Significatività	Test di Collinearità	
						Tolleranza	VIF
PmedVR09	44,95*	0,000	0,609	-3,486*	0,001	0,081	12,289
Marg50				-8,733*	0,000	0,201	4,974
Mcalc50				3,779*	0,000	0,523	1,911
Msab50				-5,469*	0,000	0,181	5,535
Quota				4,245*	0,000	0,386	2,590
TmedAR09				2,740*	0,007	0,087	11,456
Variabili escluse							
Pendenza				-1,341*	0,182	0,746	1,341
PmedAR09				-0,151*	0,881	0,304	3,292
TmedVR09				1,278*	0,203	0,060	16,770
Mso50				1,501*	0,135	0,348	2,876
AWC				-1,501*	0,135	0,214	4,663

* $p < 0,05$

Tabella 25. Risultati della regressione lineare multipla con metodo stepwise.

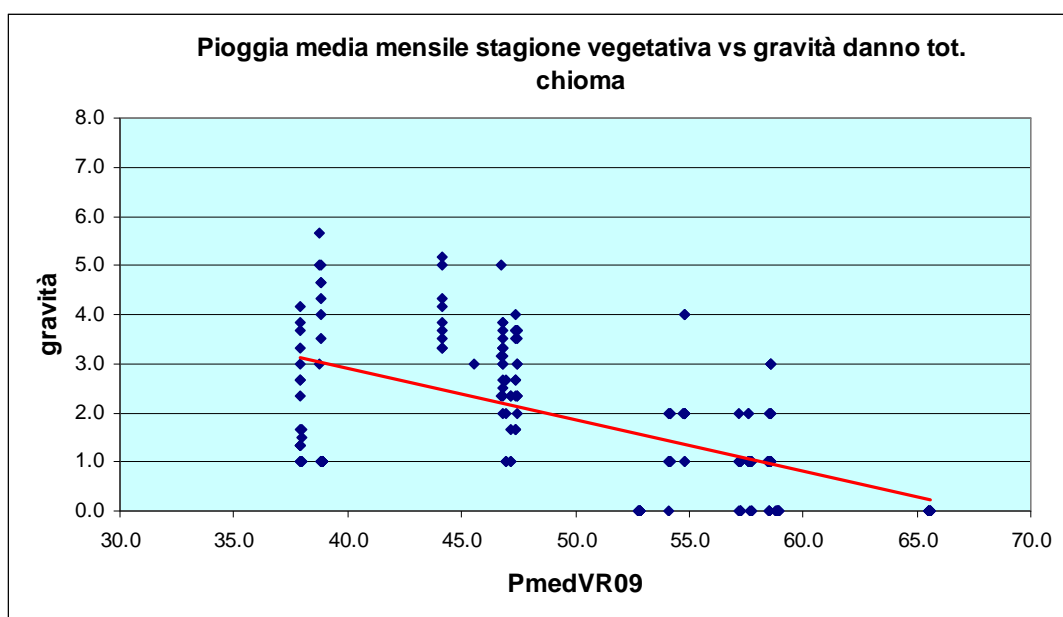


Figura 28. Regressione lineare tra la pioggia media mensile della stagione vegetativa del rilievo e la gravità del danno totale alla chioma.

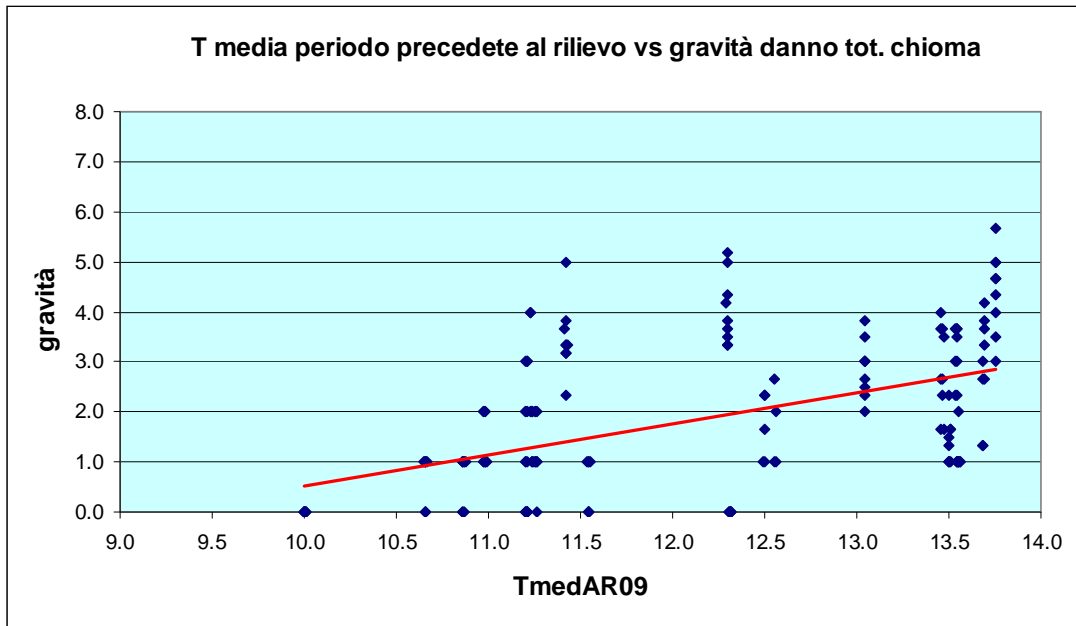


Figura 29. Regressione lineare tra la temperatura media antecedente il periodo di rilievo e la gravità del danno totale alla chioma.

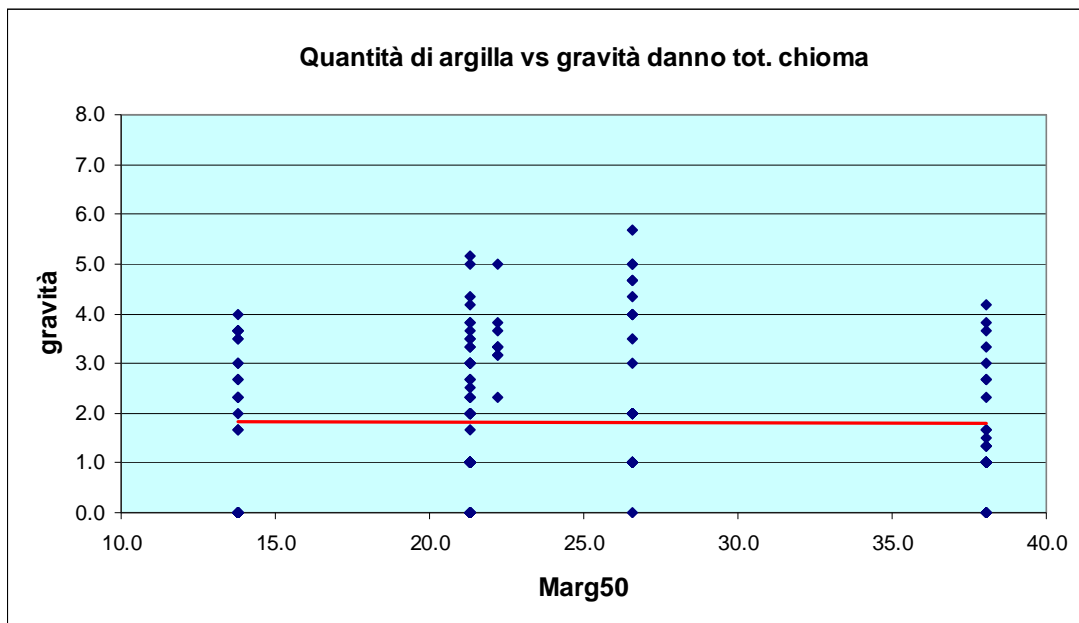


Figura 30. Regressione lineare tra la quantità di argilla e la gravità del danno totale alla chioma.

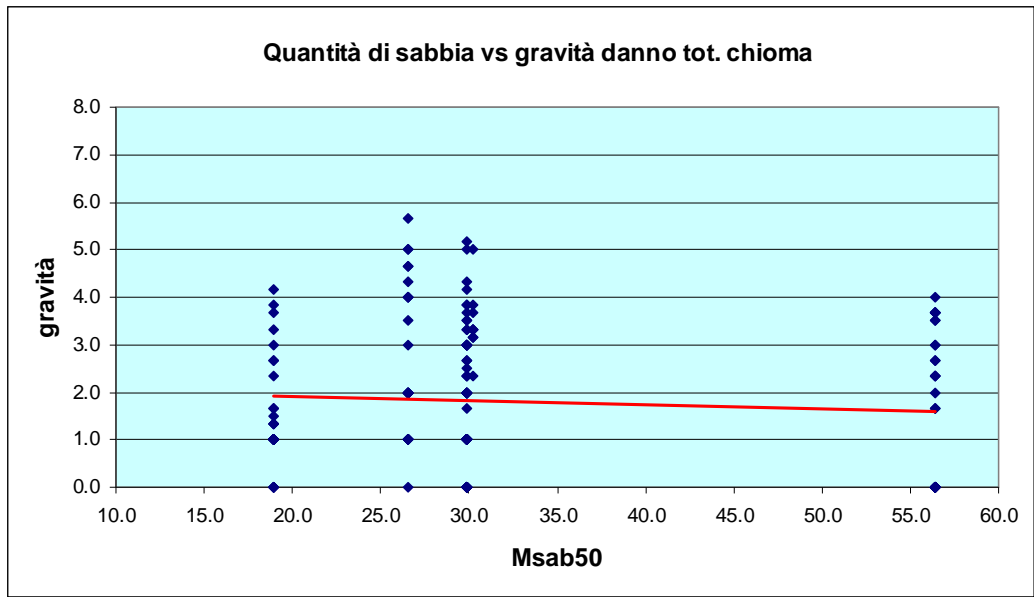


Figura 31. Regressione lineare tra la quantità di sabbia e la gravità del danno totale alla chioma.

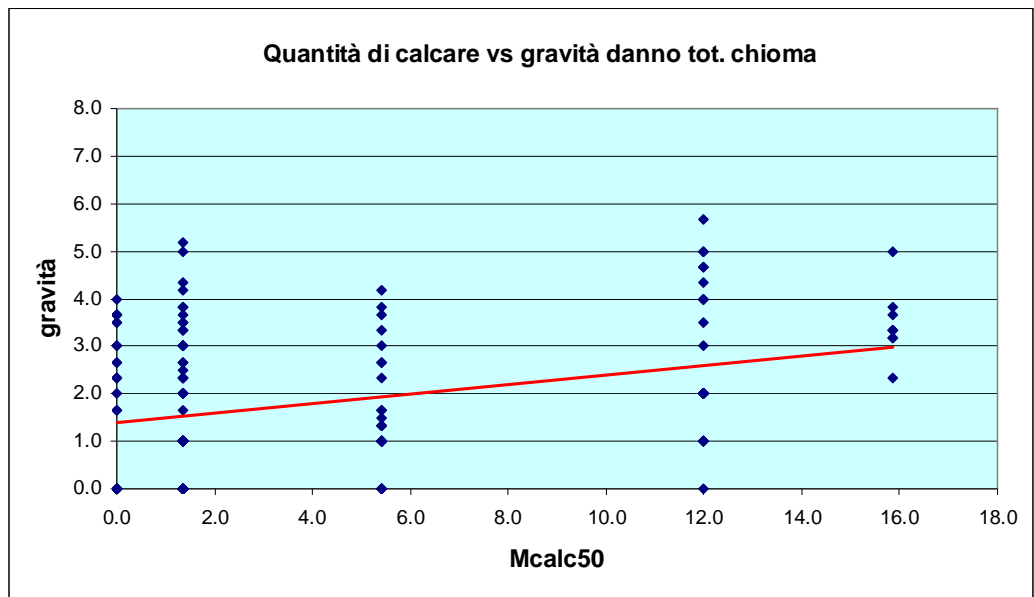


Figura 32. Regressione lineare tra la quantità di calcare e la gravità del danno totale alla chioma.

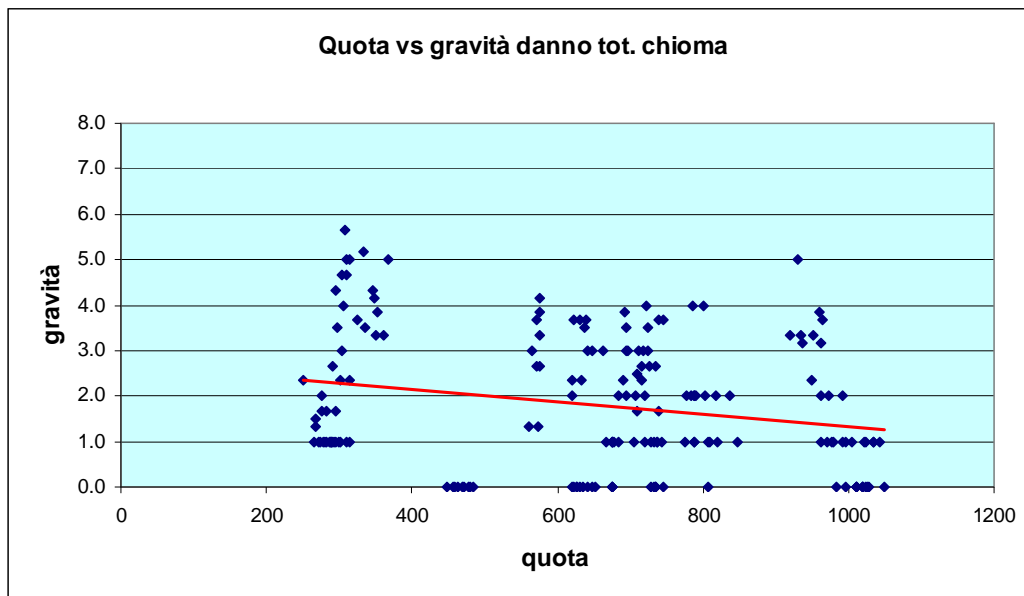


Figura 33. Regressione lineare tra la quantità di calcare e la gravità del danno totale alla chioma.

9.3.2 Dati meteo-ambientali, dati di monitoraggio, analisi di laboratorio - Pino nero

La regressione lineare multipla ha individuato sette predittori significativamente validi su nove testati nei vari modelli prodotti dall'analisi. La capacità delle variabili indipendenti di predire il danno è risultata essere altamente significativa ($F_{(7, 172)} = 44,99$; $p = 0,000$). Il valore di R^2 è pari a 0,65. I predittori validi sono risultati essere:

- la pioggia media mensile della stagione vegetativa del rilievo,
- la quantità di sostanza organica;
- la quantità di sabbia,
- la quantità di argilla,
- la quantità di calcare,
- la quota;
- la pendenza.

L'equazione prodotta dalla regressione è stata la seguente:

$$\text{Gravità danno tot. chioma} = (-0,196 * \text{pioggia media mensile della stagione vegetativa del rilievo}) + (-0,006 * \text{quota}) + (0,2 * \text{pendenza}) + (-3,466 * \text{quantità di sostanza organica}) + (0,266 * \text{quantità di sabbia}) + (-0,351 * \text{quantità di argilla}) + (0,6 * \text{quantità di calcare}) + 2,543.$$

In tabella si riportano i dati ottenuti dalla regressione.

Variabili	ANOVA regressione		Risultati regressione					
	$F_{(7, 172)}$	Significatività	R^2	t	Significatività	Test di Collinearità		
						Tolleranza	VIF	
PmedVR09	44.989*	0,000	0,647	-6.866*	0,000	0,421	2.375	
Quota				5.470*		0,344	2.909	
Mso50				-6.141*		0,487	2.054	
Msab50				6.943*		0,120	8.333	
Marg50				5.341		0,133	7.528	
Pendenza				2.456*		0,015	0,524	1.909
Mcalc50				1.983*		0,049	0,376	2.663
Variabili escluse								
TmedVR09				-0.597*	0,552	0,190	5.272	
TmedAR09				-0.716*	0,475	0,189	5.283	

* $p < 0,05$

Tabella 26. Risultati della regressione lineare multipla con metodo stepwise.

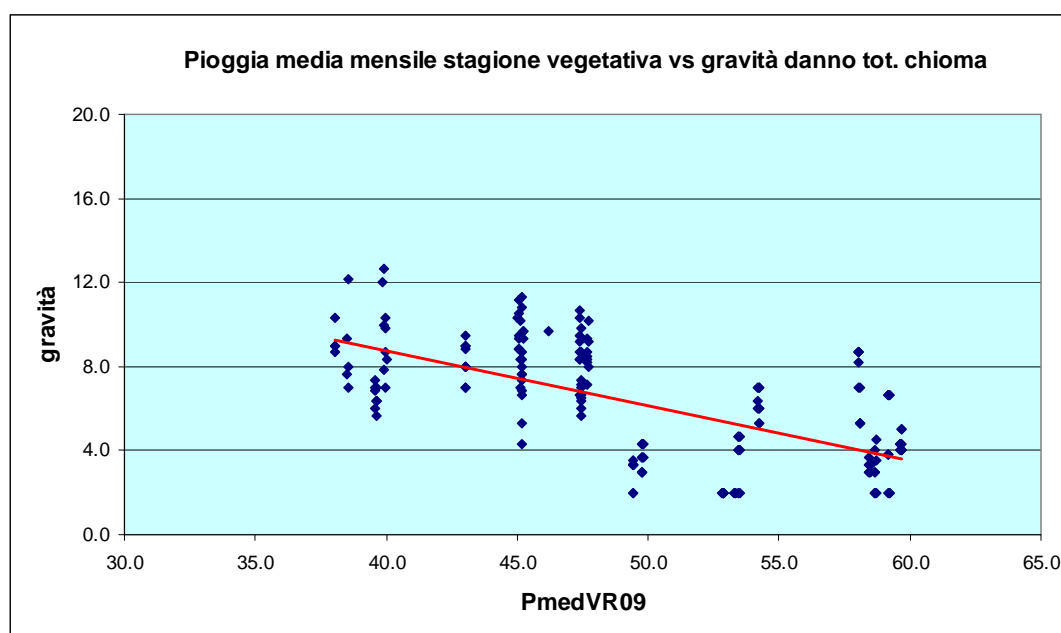


Figura 34. Regressione lineare tra la pioggia media mensile della stagione vegetativa del rilievo e la gravità del danno totale alla chioma.

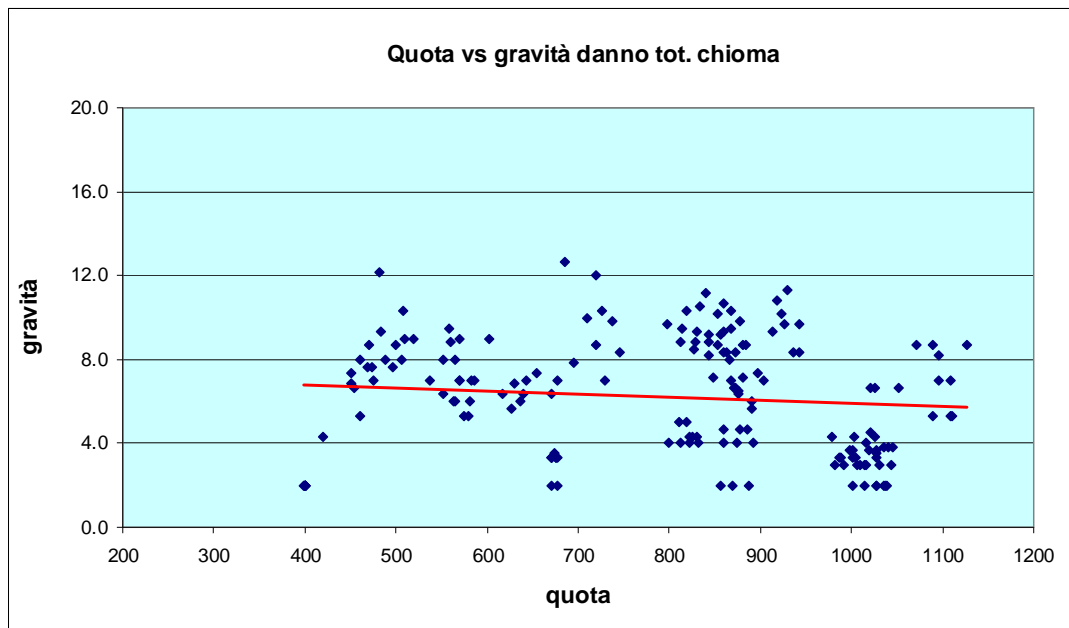


Figura 35. Regressione lineare tra la quota e la gravità del danno totale alla chioma.

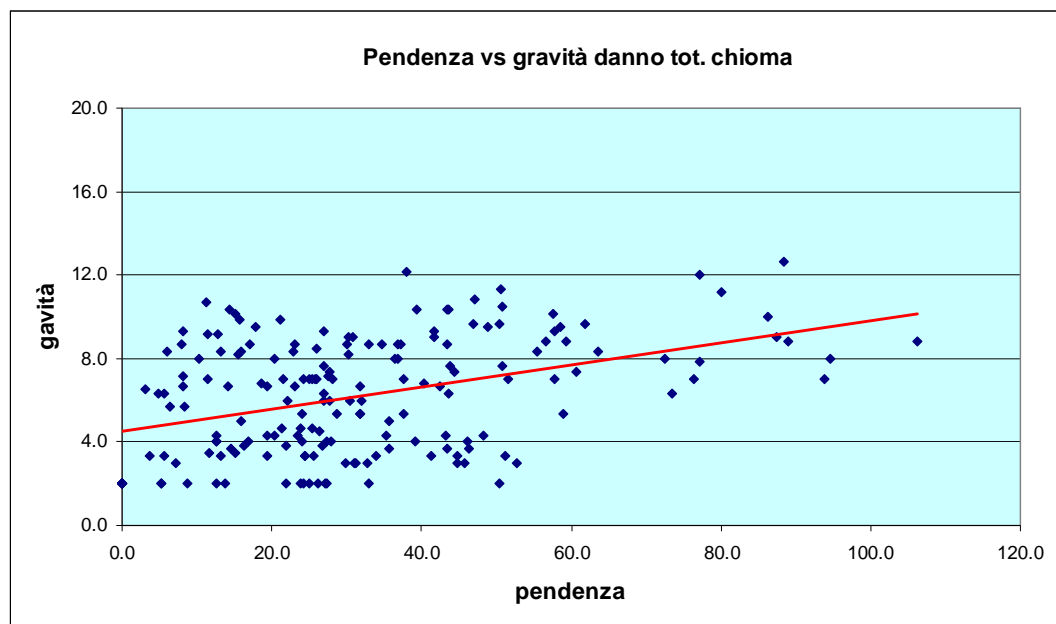


Figura 36. Regressione lineare tra la pendenza e la gravità del danno totale alla chioma.

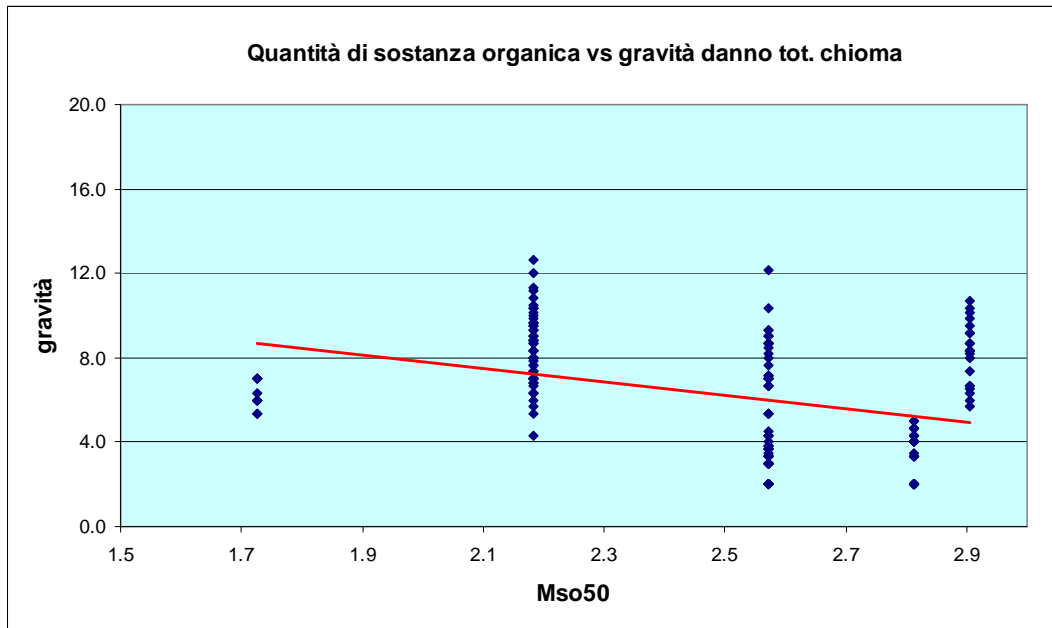


Figura 37. Regressione lineare tra la quantità di sostanza organica e la gravità del danno totale alla chioma.

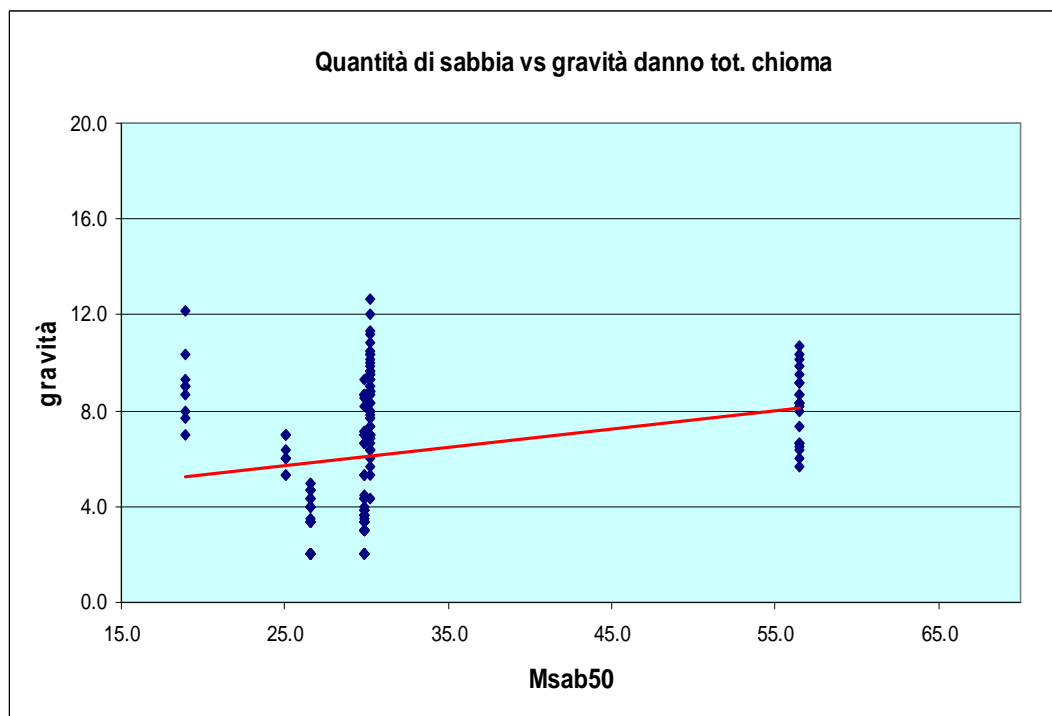


Figura 38. Regressione lineare tra la quantità di sabbia e la gravità del danno totale alla chioma.

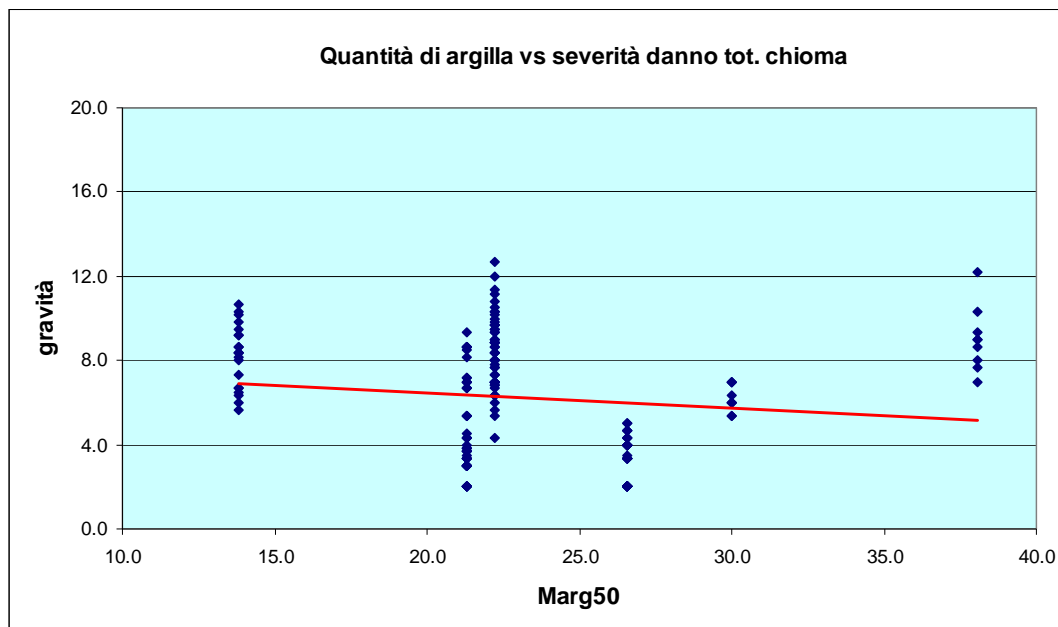


Figura 39. Regressione lineare tra la quantità di argilla e la gravità del danno totale alla chioma.

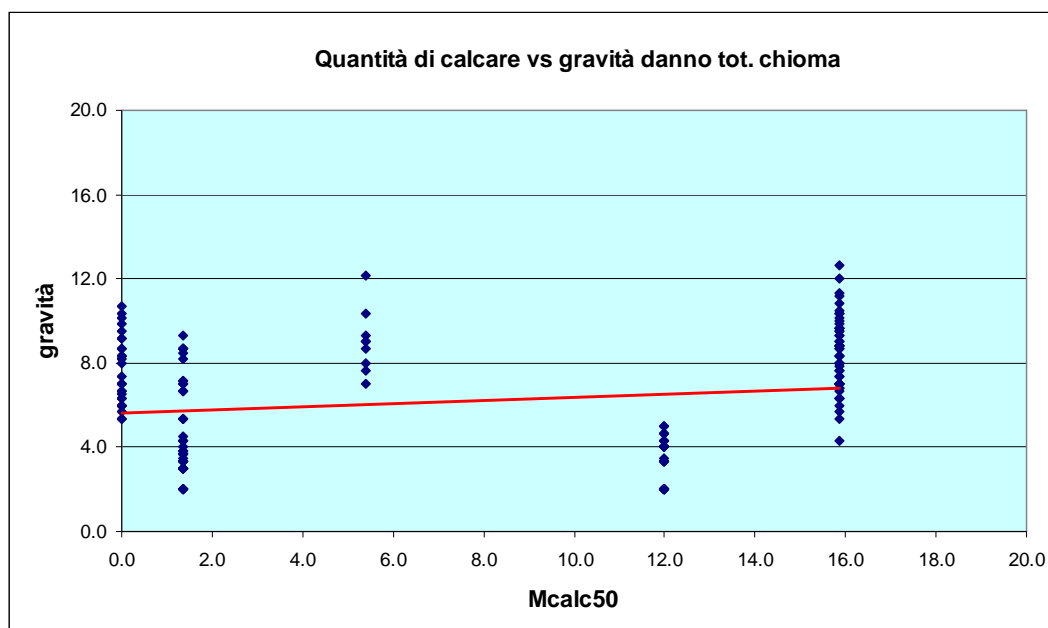


Figura 40. Regressione lineare tra la quantità di calcare e la gravità del danno totale alla chioma.

9.4 Discussione

Utilizzando i dati raccolti nelle vari fasi del lavoro è stato realizzato un sistema informativo territoriale contenente le informazioni geografiche, stazionali, geopedologiche, climatiche e fitosanitarie delle stazioni monitorate nelle province di Firenze ed Arezzo.

Mediante l'uso di strumenti statistici sono state inoltre esaminate le relazioni tra i dati registrati in campo ed i dati ricavati nelle precedenti fasi di lavoro. Le correlazioni ottenute

hanno messo in evidenza come numerose variabili pedo-climatiche siano connesse con i danni registrati. Successivamente sono stati ottenuti due algoritmi matematici, uno per ogni specie vegetale considerata, capaci di stimare il danno nei soprassuoli.

Cerro

L'analisi ha rivelato che i danni più intensi per i soprassuoli di Cerro sono legati sia alle variabili climatiche che di natura pedologica.

In particolare per i valori della pioggia media mensile del periodo vegetativo, della quota, del quantitativo di argilla e di sabbia è stata evidenziata una relazione inversamente proporzionale rispetto alla gravità dei danni, ossia al diminuire delle grandezze pedo-climatiche si ha un incremento dei danni registrati.

In modo opposto, è stata osservata una relazione direttamente proporzionale tra i valori di temperatura media del periodo gennaio-luglio e delle quantità di calcare, ossia all'aumentare dei valori dei due predittori si registra un aumento della gravità del danno.

Le correlazioni osservate e la loro natura (direttamente o inversamente proporzionale rispetto alla variabile studiata) mettono in evidenza l'importanza di una disponibilità idrica ottimale nei primi strati di suolo, cioè in quella porzione della rizosfera dove le piante hanno la maggior parte dell'apparato radicale, che permette loro di attingere alle risorse nutritive.

Un aumento della piovosità nel periodo vegetativo permetterebbe quindi alla pianta di sopportare improvvisi innalzamenti termici poiché, pur aumentando i tassi di evapotraspirazione, non si troverebbe in situazioni di carenza idrica.

La relazione individuata per la quota nei confronti del danno, conferma ulteriormente quanto precedentemente detto. Valori maggiori di quota influenzano positivamente sia i regimi termici che pluviometrici (temperature più miti nei periodi caldi e maggiori frequenze ed intensità dei fenomeni piovosi) delle stazioni, migliorando le condizioni vegetative dei soprassuoli.

Anche la relazione della temperatura convalida le precedenti osservazioni. Temperature più elevate nel periodo vegetativo comportano uno stress idrico per le piante e temperature invernali al di sopra delle medie stagionali sembra possano favorire la diffusione dei propaguli di *B. mediterranea* nell'ambiente (Vannini et al., 1996b) con evidenti conseguenze per la salute dei boschi di Cerro.

Le relazioni con i parametri pedologici suggeriscono che un semplice aumento della quantità di acqua (maggiori piogge) non è un fattore sufficiente a spiegare completamente

le relazioni con i danni registrati. La risorsa idrica oltre che abbondante deve infatti risultare disponibile e accessibile per la pianta.

Le correlazioni tra la quantità di argilla, sabbia, calcare e i danni registrati sembrerebbero confermare questa ipotesi. Un aumento di argilla infatti comporta anche una maggior capacità di ritenzione idrica e quindi un aumento dell'acqua per le piante. Naturalmente alti valori di argilla determinano anche un progressivo compattamento del suolo, fenomeno poco gradito al Cerro, che invece predilige terreni maggiormente sciolti (Bussotti, 2001; Bernetti, 1995). Questo spiegherebbe la relazione inversamente proporzionale trovata con le quantità di sabbia, che aumentando, prevede una diminuzione del danno. Aumentando invece le quantità di calcare si prevede un aumento del danno, questo sia perché il calcare non permette la conservazione di acqua nel suolo, sia perché il Cerro, pur non essendo eccessivamente selettivo nel confronto dei suoli, rifugge le matrici con elevate quantità di carbonato di calcio (Bussotti, 2001).

Pino nero

L'equazione ottenuta dalle precedenti analisi suggerisce che la gravità delle condizioni fitosanitarie dei soprassuoli di Pino nero è legata sia a fattori climatici che pedologici.

Le relazioni inversamente proporzionali tra la piovosità media del periodo vegetativo, la quota e la gravità dei danni, sottolineano, come nel caso del Cerro, che le carenze idriche svolgono un ruolo determinante nei confronti dei danni osservati. Piogge abbondanti e quote elevate determinano infatti un decremento dei danni osservati, poiché migliorano le condizioni vegetative delle piante.

A conferma di questa osservazione seguono anche quelle dei parametri pedologici.

Il modello matematico evidenzia un aumento della gravità dei danni all'aumentare dei valori di pendenza. Nei territori Appenninici inclinazioni maggiori comportano un aumento del fenomeno di scorrimento superficiale dell'acqua di pioggia ed una minor profondità dei suoli con evidenti effetti negativi sulle condizioni vegetative delle piante.

In modo analogo alle precedenti osservazioni le relazioni ottenute tra la gravità dei danni e le quantità di argilla, sabbia, calcare e quantità di sostanza organica, completano l'analisi.

Una maggiore quantità di argilla, determina un decremento dei valori di gravità e, al contrario, un aumento delle quantità di sabbia e calcare producono un'intensificazione dei danni.

Risulta evidente come i rapporti tra i tre sedimenti influenzino la capacità idrica dei suoli e determinino una maggiore o minore disponibilità di acqua per le piante e conseguentemente la loro capacità di tollerare i fattori di stress.

Infine l'analisi ha evidenziato una relazione inversamente proporzionale tra la gravità dei danni ed il contenuto di sostanza organica. Come già osservato in precedenti studi (Maresi et al., 2007; Wolynski et al., 2004), i soprassuoli di Pino nero diffusi sull'Appennino centrale, sono stati spesso realizzati in condizioni stazionali difficili (suoli poveri, fortemente acclivi, a quote ed esposizioni inappropriate). In queste situazioni una carenza di elementi nutritivi legata a scarsità nella componente organica può incidere negativamente sull'efficienza fisiologica delle piante, rendendole maggiormente suscettibili agli stress.

10. Conclusioni

La presente attività di ricerca si è posta come finalità lo sviluppo di un metodo di lavoro che permettesse l'individuazione e la quantificazione delle criticità ambientali (stress di natura abiotica) capaci di produrre un indebolimento dei soprassuoli forestali nei territori montani regionali.

Lo studio è nato in seguito al progetto affidato al Dipartimento di Biotecnologie Agrarie – Sezione Protezione delle piante da parte dell'Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione nel settore Agricolo forestale, nell'ambito del servizio META (Monitoraggio Estensivo dei boschi della Toscana a fini Fitosanitari). Nel corso degli anni, infatti, i dati del monitoraggio regionale hanno messo in evidenza un progressivo indebolimento di alcune formazioni forestali in seguito alle improvvise variazioni dei regimi termopluviometrici locali ed un aumento della presenza dei due patogeni considerati nei soprassuoli forestali regionali.

Per tali ragioni nel presente studio l'attenzione è stata concentrata sui popolamenti di Cerro (*Quercus cerris*), la specie più diffusa sul territorio regionale (249.669 ha, INFC, 2007) e di Pino nero (*Pinus nigra* subsp *nigra*), risultato dai dati del monitoraggio particolarmente sensibile alle variazioni climatiche e specie piuttosto diffusa lungo la dorsale appenninica in seguito ai numerosi impianti artificiali post bellici (18.427 ha, INFC, 2007). Le due specie, se indebolite dai fattori ambientali, risultano spesso attaccate da due patogeni opportunisti, *Biscogniauxia mediterranea* e *Diplodia pinea*, fortemente legati a fenomeni di stress abiotici ed in particolare di carenza idrica. Il lavoro è stato articolato in varie fasi svolte sia in campo che in laboratorio.

Inizialmente è stata progettata e realizzata una rete di monitoraggio specifica per questo studio che ha previsto la realizzazione di quaranta aree di monitoraggio permanenti (venti per ogni specie vegetale) distribuite nelle province di Firenze ed Arezzo, per un totale di 1080 piante. In esse sono stati individuati dei punti di rilievo monitorati nel secondo anno di attività per la raccolta d'informazioni in merito allo stato di salute delle piante. I dati raccolti sono stati quindi organizzati in un sistema informativo territoriale regionale contenente cartografia tematica finalizzata al presente studio.

Successivamente è stato possibile classificare le aree in base alla gravità dei danni registrati a livello della chioma (alterazione cromatiche degli aghi/foglie, microfillia, perdita precoce degli aghi/foglie, disseccamento dei rami di vari diametri) e su tale base selezionare quattro aree (due per ogni specie) nelle quali è stato prelevato del materiale vegetale per sottoporlo ad analisi di laboratorio sia con metodiche classiche che con tecniche di biologia molecolare.

Contemporaneamente sono state acquisite le serie storiche della banca dati agrometeorologica regionale utilizzate per il calcolo di dati aggregati di pioggia e temperatura sulla base delle esigenze del presente studio. Mediante l'utilizzo di software GIS è stato possibile realizzare delle spazializzazioni a livello regionale dei dati aggregati e successivamente applicare i risultati ottenuti ai punti di rilievo del monitoraggio. Infine tutti i dati sono stati integrati e sottoposti ad analisi statistica per la costruzione dei due modelli matematici.

Le osservazioni condotte in merito alle diverse situazioni fitosanitarie hanno messo in evidenza una gravità del danno complessivo alla chioma significativamente maggiore nei territori fiorentini sia per le piante di Cerro che per quelle di Pino nero. La maggior gravità delle condizioni fitosanitarie nei territori della provincia di Firenze rispetto a quelli aretini è probabilmente dovuta ai regimi termo-pluviometrici mediamente più asciutti nel capoluogo, rispetto a quelli della provincia considerata, come evidenziato già in altri studi condotti dal servizio agrometeorologico regionale ([ARSIA, 2008](#)). L'analisi condotta sui dati di gravità totale registrata per le aree di rilievo ha evidenziato un'indipendenza significativa tra i singoli siti ed ha permesso di realizzare delle classifiche che riportano le aree fiorentine come maggiormente colpite rispetto a quelle aretine sia per i popolamenti di Cerro che di Pino nero.

Nel caso del Cerro sembra che i danni registrati siano collegati sia alla struttura orizzontale del popolamento che ad alcune variabili pedo-climatiche.

La struttura delle chiome ed in particolare la compressione delle chiome sembra svolgere un ruolo significativo nel verificarsi dei danni osservati. Le piante con chiome maggiormente a contatto infatti presentavano un'intensità di danno inferiore. Questo potrebbe essere spiegato con una maggior umidità relativa al di sotto della copertura delle chiome che contribuirebbe a mitigare gli sbalzi termici al suolo e quindi a limitare la perdita di acqua dal terreno, determinando migliori condizioni vegetative per le piante.

I risultati ottenuti dalle relazioni ottenute tra la gravità dei danni ed i dati pedo-climatici portano a considerazioni simili. E' stato infatti osservato che la gravità dei danni aumenta al diminuire delle piogge nel periodo vegetativo, all'aumentare delle temperature medie mensili nel periodo gennaio-luglio ed al diminuire della quota, tutti fattori che concorrono ad una perdita di risorsa idrica a danno delle piante. Analogamente i dati pedologici evidenziano che suoli con quantitativi di argilla e sabbia maggiori consentono alle piante di disporre ed utilizzare l'acqua in modo ottimale, mentre suoli ricchi di calcare, elemento che contribuisce alla perdita di acqua per percolazione, risultano sfavorevoli e maggiormente siccitosi, generando stati di sofferenza per le piante.

Le analisi molecolari dei campioni prelevati nelle aree monitorate hanno permesso, sebbene solo in modo limitato, di appurare la presenza del patogeno opportunisto *B. mediterranea*. I risultati degli esami di laboratori concordano con le precedenti considerazioni poiché i campioni provenienti dalle aree maggiormente danneggiate hanno prodotto sia un maggior numero di campioni positivi agli isolamenti, sia quantitativi più elevati di DNA del fungo nei tessuti vegetali asintomatici. I test diagnostici condotti sui campioni provenienti dalle aree ritenute in migliori condizioni non hanno invece prodotto risultati positivi.

Lo studio messo a punto per il Pino nero ha messo in evidenza che la struttura verticale dei soprasuoli ha un effetto significativo nel verificarsi dei danni. E' stato osservato come piante di maggiori dimensioni sia diametriche che d'altezza, presentino danni minori. Questo fatto può essere legato alla struttura e all'ubicazione dei popolamenti di Pino nero, specie pioniera miglioratrice dei suoli a vantaggio di altre arboree maggiormente esigenti. I rimboschimenti appenninici sono stati realizzati su suoli piuttosto poveri e spesso ancora in via di formazione. La conquista dello spazio verticale ed orizzontale garantisce alla piante in queste condizioni un miglior accesso alle risorse disponibili permettendone la

vegetazione in condizioni favorevoli e aumentandone la resistenza agli stress ambientali. A queste considerazioni fanno seguito i risultati delle analisi tra la gravità registrata ed i parametri pedo-climatici che evidenziano un incremento dei danni al diminuire delle piogge del periodo vegetativo e della quota e all'aumentare del valore delle pendenze delle stazioni.

Si è osservato che anche la diminuzione della sostanza organica, con conseguente impoverimento della fertilità, o del quantitativo di argilla e quindi della capacità di conservare acqua nel suolo, comportano un incremento dei danni nelle stazioni. Aumenti nei quantitativi di sabbia e calcare, con conseguente perdita di capacità nella conservazione dell'acqua nel suolo, causano ugualmente un peggioramento delle condizioni di salute delle piante.

Le analisi di laboratorio condotte sui campioni asintomatici sia con tecniche tradizionali che di biologia molecolare, hanno messo in evidenza una diffusa presenza del patogeno opportunisto *D. pinea* nelle aree monitorate. In particolare l'analisi molecolare, in accordo a quanto già osservato in altre esperienze sul territorio italiano (Maresi et al., 2007) rivela che il fungo è già ampiamente diffuso nei soprassuoli di Pino nero e che probabilmente proprio le condizioni ambientali ne limitano l'azione patogena.

Tutte le precedenti considerazioni, su Cerro o Pino nero, mettono in evidenza quanto il fattore "ambiente" sia importante nelle interazioni tra le piante ed i patogeni di debolezza ed in particolare quelli presenti in fase latente negli ospiti vegetali, come evidenziato anche in altri studi (Desprez-Loustau et al., 2007).

Alla luce degli ipotizzati cambiamenti climatici che riguardano soprattutto i regimi termopluviometrici è possibile che in futuro, alle latitudini dell'Italia centrale, si assista ad un incremento del deperimento dei soprassuoli forestali, proprio a causa di questi microrganismi che potranno svolgere una maggior pressione selettiva nei confronti delle piante arboree, determinando un cambiamento delle consociazioni delle specie ed un conseguente mutamento della fisionomia del paesaggio, come osservato su piccola scala in altri studi (Vannini et al., 1996c).

Bibliografia

- AA.VV. 1994. Alberi della regione mediterranea guida per la valutazione delle chiome. Commissione delle Comunità Europee Commissione Economica per l'Europa delle Nazioni Unite. CEC – UN/ECE, Brussels, Geneva; pp160.
- Aber J. 2001. Forest processes and global environmental change: The effects of individual and multiple stressors on forests. *BioScience* 51: 735-751.
- Agnew M.D., Palutikof J.P., 2000. GIS-based construction of baseline climatologies for the Mediterranean using terrain variables. *Clim. Res.* 14: 115-127.
- Agrios G.N., 2005. Plant pathology. 5th edition. Academic Press, New York; pp 922.
- Aronoff S., 1989. Geographic Information Systems: A Management Perspective, WDL Publications, Ottawa, Canada; pp 294.
- ARSIA - Servizi agroambientali, vigilanza e controllo, 2008. Analisi dell'andamento meteorologico nell'annata 2008 in Toscana. URL: http://meta.arsia.toscana.it/FCKeditor/UserFiles/File/meta/News/2009/Andamento_meteo_2008.pdf :1-8.
- Attorre F., Alfo M., De Sanctis M., Francesconi F., Bruno F., 2007. Comparison of interpolation methods for mapping climatic and bioclimatic variables at regional scale. *International Journal of Climatology* 27: 1825-1843.
- Attorre F., Francesconi F., Valenti R., Collalti A., Bruno F., 2008. Produzione di mappe climatiche e bioclimatiche mediante Universal Kriging con deriva esterna: teoria ed esempi per l'Italia. *Forest@* 5: 8-19.
- Bachi P.R., Peterson J.L., 1985. Enhancement of *Sphaeropsis sapinea* stem invasion of pines by water deficit. *Plant Disease* 69: 798-799.
- Barbati A., Lamonaca A., Melini D., Nocentini S., Corona P., 2008. Valutazione multicriteriale della suscettività interventi di rinaturalizzazione dei rimboschimenti di Pino nero e dei soprassuoli di Cerro in Toscana. *Italia Forestale Montana* 4: 308-319.
- Belanger R.R., Manion P.D., Griffin D.H., 1990. Amino acid content of water-stressed plantlets of *Populus tremuloides* clones in relation to clonal susceptibility to *Hypoxylon mammatum* in vitro. *Can. J. Bot.* 68: 26-29.
- Belli G., 2007. Elementi di patologia vegetale. Piccin, Padova; pp 408.
- Bernetti G., 1995. Selvicoltura speciale. Utet, Torino; pp 415.
- Biocca M., Motta E., 1995. Aspects of latency of *Hypoxylon mediterraneum* in declining Turkey oaks (*Quercus cerris*). *Petria* 5: 171–176.

- Blasi C., Chirici G., Corona P., Marchetti M., Maselli F., Puletti N., 2007. Spazializzazione di dati climatici a livello nazionale tramite modelli regressivi localizzati. *Forest@* 4 (2): 213-219. URL:<http://www.sisef.it/forest@/>.
- Blodgett J.T., Bonello P., Stanosz G.R., 2003. An effective medium for isolating *Sphaeropsis sapinea* from asymptomatic pines. *For. Pathol.* 33: 395–404.
- Bohm J., Hahn A., Schubert R., Bahnweg G., Adler N., Nechwatal J., Oehlmann R., Oßwald W., 1999. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *Journal of Phytopathology* 147: 409–416.
- Bozic M., Antonic O., Pernanr R., Jelaska S.D., Krizan J., Cavlovic J., Kusan V., 2006. Modelling the damage status of silver fir trees (*Abies alba* Mill.) on the basis of geomorphological, climatic and stands factors. *Ecological modelling* 194: 202-208.
- Breda N., Huc R., Granier A., Dreyer E., 2006. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation process and long-term consequences. *Ann. For. Sci.* 63: 625-644.
- Burrough P.A., 1986. Principles of Geographical Information Systems for land resources assessment. Oxford University Press, New York; pp 193.
- Bussotti F., 2001. Il Cerro (*Quercus cerris* L.) famiglia *Fagaceae*. *Sherwood* 72: 41-44.
- Capelo J., Mesquita S., Costa J.C., Ribeiro S., Arsénio P., Neto C., Monteiro-Henriques T., Aguiar C., Honrado J., Espírito-Santo D., Lousa M., 2007. A methodological approach to potential vegetation modeling using GIS techniques and phytosociological expert-knowledge: application to mainland Portugal. *Phytocoenologia* 37: 399-415.
- Capretti P., Battisti A., 2007. Water stress and insect defoliation promote the colonization of *Quercus cerris* by the fungus *Biscogniauxia mediterranea*. *For Path.* 37: 129-135.
- Capretti P., Ragazzi A., 2009. Elementi di patologia forestale. Patron Editore, Quarto Inferiore, Bologna; pp 432.
- Cardoso J.E., Santos A.A., Rossetti A.G. Vidal J.C., 2004. Relationship between incidence and severity of cashew gummosis in semiarid north-eastern Brazil. *Plant Pathology* 53: 363-367.
- Carson R., 1962. *Silent Spring*. Boston; pp 261.
- Carson R., 1999. *Primavera silenziosa*. Feltrinelli editore, Milano; pp 336.

- Chapela I.H., Boddy L., 1988. Fungal colonization of attached beech branches. Early stages of development of fungal communities. *New Phytol* 110: 47-57.
- Chirici G., Corona P., Marchetti M., Travaglini D., Wolf U., 2002. Modello di valutazione dell'attitudine fisica del territorio per la realizzazione di piantagioni di noce comune e di douglasia in Italia meridionale. *Monti e Boschi* 6: 25-31.
- Collado J., Platas G., Gonzales I., Pelaez F., 1999. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol.* 144: 525–532.
- Dainelli N., Bonechi F., Spagnolo M., Canessa A., 2008. Cartografia numerica: manuale pratico per l'utilizzo dei GIS. Dario Flaccovio Editore, Palermo; 368.
- Dale V.H., Joyce L.A., McNulty S., Neilson R.P., Ayres M.P., Flannigan M.D., Hanson P.J., Irland L.C., Lugo A.E., Simberloff P.D., Swanson F.J., Stocks B.J., Wotton B.M., 2001. Climate change and forest disturbance. *Bioscience* 51 (9): 723-734.
- De Wet J., Wingfield M.J., Coutinho T.A., Wingfield B.D., 2000. Characterization of *Sphaeropsis sapinea* isolates from South Africa, Mexico, and Indonesia. *Plant Dis.* 84: 151–156.
- Desprez-Loustau M.L., Marcais B., Nageleisen L.M., Piou D., Vannini A., 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Ann. For. Sci.* 63: 597-612.
- Desprez-Loustau M.L., Robin C., Reynaud G., Déqué V.B., Piou D., Husson C., Marcais B., 2007. Simulating the effects of a climate-change scenario on the geographical range and activity of forest-pathogenic fungi. *Can. J. Plant. Pathol.* 29: 101-120.
- Devall B., 1980. The Deep Ecology Movement. *Natural Resources Journal* 20: 299-322.
- Devall B., 1991. Deep Ecology and Radical Environmentalism. *Society and Natural Resources* 4: 247-58.
- Eichhorn J., Roskams P., Ferretti M., Mues V., Szepesi A., Durrant D., 2010. Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests, Part IV, Visual Assessment of Crown Condition and Damaging Agents, UNECE, ICP Forests, Hamburg, 59 pp + Annexes URL:<http://www.icp-forests.org/Manual.htm>.
- Eyles A., Bonello P., Ganley R., Mohammed C., 2010. Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytologist* 185: 893-908.
- Fahey J.W., Dimock M.B., Tomasino S.F., Taylor J.M., Carlson P.S. 1991. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry. In

- Microbial ecology of leaves. Edito da Andrews J.H. e Hirano S.S.. Springer-Verlag, London, UK. pp. 401–411.
- Fiorenzo F., Mancino G., Borghetti M., Ferrara A., 2008. Metodi per l'interpolazione delle precipitazioni e delle temperature mensili della Basilicata. *Forest@* 5: 337-350. URL:<http://www.sisef.it/forest@/>.
- Flower J., Nuckles E., Hartman. J., Vaillancourt L., 2001. Latent infection of Austrian and Scots pine tissues by *Sphaeropsis sapinea*. *Plant Disease* 85: 1107-1112.
- Flowers J., Hartman J., Vaillancourt L., 2003. Detection of latent *Sphaeropsis sapinea* infections in Austrian pine tissues using nested-polymerase chain reaction. *Phytopathology* 93: 1471–1477.
- Forlani G., Scainelli D., 1995. Ingegneria genetica della risposta delle piante allo stress osmotico. Nuove strategie per la coltura di terreni aridi o affetti da elevate concentrazioni saline. *BioTec* 5: 55-64.
- Ganley R.J., Sniezko R.A., Newcombe G., 2008. Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. *Forest Ecology and Management* 255: 2751-2760.
- Garcia B., Diez J., 2003. Uso del metodo de rodales y sistematico para evaluar danos por *Shaeropsis sapinea* en *Pinus radiata* afectado por granizo en Bizkaia, Espana. *Biagro* 15: 3-16.
- Garcia B., Diez L., 2003. Uso del metodo de rodales y sistematico para evaluar danos por *Sphaeropsis sapinea* en *Pinus radiata* afectado por granizo en Bizkaia, Espana. *Bioagro* 15: 3-16.
- Garrett K.A., Dendy S.P., Frank E.E., Rouse M.N., Travers S.E., 2006. Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 489–509.
- Gellini R., Grossoni P., 1996. Botanica forestale I. Gimnosperme. Cedam, Limena, Padova; pp 267.
- Gellini R., Grossoni P., 1997. Botanica forestale II. Angiosperme. Cedam, Limena, Padova; pp 373.
- Ghezi E., Khodaparast S.A., Zare R., 2010. Distribution and severity of damage by *Chryphonectria parasitica* in the chestnut stands in Guilan province, Iran. *For. Path.* 40: 450-457.

- Graci G., Pileri P., Sedazzari M., 2008. Gis e ambiente: guida all'uso di ArcGIS per l'analisi del territorio e la valutazione ambientale. Dario Flaccovio Editore, Palermo; pp 268.
- Griffin D.H., Quinn K., McMillan B., 1986. Regulation of hyphal growth rate of *Hyphoxylon mammatum* by amino acids: stimulation by proline. *Experimental Mycology* 10: 307-314.
- Grossoni P., Bussotti F., 2000. Il Pino nero – *Pinus nigra* Arnold (famiglia *Pinaceae*). *Sherwood* 54: 33-38.
- Groth J.V., Ozmon E.A., Busch R.H., 1999. Repeatability and relationship of incidence and severity measures of scab of wheat caused by *Fusarium graminearum* in inoculated nurseries. *Plant Disease* 83: 1033-1038.
- Haugland R.A., Brinkman N., Vesper S.J., 2002. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using Real-time PCR analysis. *Journal of Microbiological Methods* 50: 319–323.
- Heijari J., Nerg A.M., Kainulainen P., Viiri H., Vuorinen M., Holopainen J.K., 2005. Application of methyl jasmonate reduce growth but increase chemical defence and resistance against *Hylobius abietis* in Scots pine seedlings. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115: 117-124.
- Heijari J., Nerg A.M., Kainulainen P., Viiri H., Vuorinen M., Holopainen J.K., 2008. Long-term effects of exogenous methyl jasmonate application on Scots Pine (*Pinus sylvestris*) needle chemical defence and diprionid sawfly performance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 128: 162-171.
- Henson J.M., French R., 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 31: 81–109.
- Hietala A.M., Eikenes M., Kvaalen H., Solheim H., Fossdal C.G., 2003. Multiplex real-time PCR for monitoring *Heterobasidion annosum* colonization in Norway spruce clones that differ in disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4413–4420.
- INFC, 2007 - Le stime di superficie 2005 - Seconda parte. Autori Tabacchi G., De Natale F., Di Cosmo L., Floris A., Gagliano C., Gasparini P., Salvadori I., Scrinzi G., Tosi V. *Inventario Nazionale delle Foreste e dei Serbatoi Forestali di Carbonio*. MiPAF – Corpo Forestale dello Stato - Ispettorato Generale, CRA - ISAFSA, Trento. URL: <http://www.infc.it>.

- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2007. Climate Change 2007: Synthesis report. URL:http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_synthesis_report.htm.
- Intini M., Panconesi A., Ben Jamâa M.L., Stanosz G.R., Smith D.R., 2005. First report of *Diplodia* canker of Cypress caused by *Diplodia pinea* f.sp. *cupressi* on Mediterranean Cypress in Tunisia. *Plant Disease* 89: 1246.
- Kozłowski G., Buchala A., Metraux J.P., 1999. Methyl jasmonate protect Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) seedlings against *Pythium ultimum* Trow. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 53-58.
- Krokene P., Nagy N.E., Solheim H., 2008. Methyl jasmonate and oxalic acid treatment of Norway spruce: anatomically based defence responses and increased resistance against fungal infection. *Tree Physiology* 28: 29-35.
- Lodge D.J., Fisher P.J., Sutton B.C., 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia* 88: 733–738.
- Logan J.A., Regniere J., Gray D.R., Munson A.S., 2007. Risk assessment in the face of a changing environment: gypsy moth and climate change in Utah. *Ecological Application* 17: 101-117.
- Luchi N., Capretti P., Pinzani P., Orlando C., Pazzagli M., 2005a. Real-time PCR detection of *Biscogniauxia mediterranea* in symptomless oak issue. *Letters in Applied Microbiology* 41: 61-68.
- Luchi N., Capretti P., Surico G., Orlando C., Pazzagli M., Pinzani P., 2005b. A real-time quantitative PCR assay for the detection of *Sphaeropsis sapinea* from inoculated *Pinus nigra* shoots. *J. Phytopathol.* 153: 37–42.
- Luchi N., Capretti P., Vettrano A.M., Vannini A., Pinzani P., Pazzagli M., 2006. Early detection of *Biscogniauxia nummularia* in symptomless European beech (*Fagus sylvatica* L.) by TaqMan™ quantitative real-time PCR. *Letters in applied microbiology* 43: 33-38.
- Madden L.V., Hughes G., van den Bosch F., 2008. The study of Plant Disease Epidemics – second printing. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A.; pp 421.
- Manion P.D., Griffin D.H., 1986. Sixty-five years of research on *Hypoxylon* canker of aspen. *Plant Disease* 70: 803-808.

- Maracchi G., Genesio L., Magno R., Ferrari R., Crisci A., Bottai L., 2005. Progetto DesertNet - Programma Interreg III B - MEDOCC - Asse 4 Misura 4, WP A10 - Azione pilota in Toscana "I diagrammi del clima in Toscana". Rapporto Finale Giugno 2005, LaMMA-CRES in collaborazione con il LAMMA, coordinati dal CNR-IBIMET.
- Maresi G., Luchi N., Pinzani P., Pazzagli M., Capretti P., 2007. Detection of *Diplodia pinea* in asymptomatic pine shoots and its relation to the Normalized Insolation index. *For. Path.* 37: 272–280.
- Martin R.R., 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* 38: 207-239.
- Mazzaglia A., Anselmi N., Gasbarri A., Vannini A., 2001. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) assay for the specific detection of *Biscogniauxia mediterranea* living a san endophyte in oak tissue. *Mycol. Res.* 105 (8): 952-956.
- McCartney H.A., Foster S.J., Fraaije B.A., Ward E., 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* 59: 129–142.
- Melini D., Travaglini D., 2006. Identificazione dell'attitudine a usi diversi delle aree forestali mediante un approccio sfocato su base GIS: il caso della Toscana. *Italia Forestale Montana* 5: 353-365.
- Migani M., Salerno G., 2008. Manuale ArcGIS: guida pratica all'utilizzo con esercizi svolti. Dario Flaccovio Editore, Palermo; pp 272.
- Minami M., 2000. Using ArcMap – GIS by ESRI™. Environmental Systems Research Institute, Inc., Redlands, U.S.A.: pp 515.
- Moriondo F., 1999. Introduzione alla patologia forestale – seconda edizione. UTET, Torino; pp 218.
- Moriondo F., Capretti P., Ragazzi A., 2006. Malattie delle piante in bosco, in vivaio e delle alberature. Patron Editore, Quarto Inferiore, Bologna; pp 238.
- Mullis K., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* April: 56-65.
- Mullis K., Faloona F., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 51: 263-73.

- Naess A., 1973. The Shallow and the Deep, Long-Range Ecology Movement. *Inquiry* 16: 95-100.
- Nevalainen S., 2002. The incidence of *Gremmeniella abietina* in relation to topography in Southern Finland. *Silva Fennica* 36: 459–473.
- Nicholls T.H., Ostry M.E., 1990. *Sphaeropsis sapinea* canker on stressed red and jack pines in Minnesota and Wisconsin. *Plant Disease* 74: 54-56.
- Ntoumanis N., 2001. A step by step guide to SPSS for sport and exercise studies. Routledge, London; pp 253.
- Palmer M.A., Nicholls T.H., 1985. Shoot blight and collar rot of *Pinus resinosa* caused by *Sphaeropsis sapinea* in forest tree nurseries. *Plant Disease* 69: 739-740.
- Palmer M.A., Nicholls T.H., Croghan C.F., 1986. Fungicidal control of shoot blight caused by *Sphaeropsis sapinea* on red pine nursery seedlings. *Plant Disease* 70: 194-196.
- Pardos M., Jiménez M.D., Aranda I., Puértolas J. and Pardos J.A. 2005. Water relations of cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings in response to shading and moderate drought. *Ann. For. Sci.* 62: 377-384.
- Paul P.A., El-Allaf S.M., Lipps P.E., Madden L.V. 2005. Relationships between incidence and severity of *Fusarium* head blight on winter wheat in Ohio. *Phytopathology* 95:1049-1060.
- Pedranzani H., Sierra-de-Grado R., Viglioccio A., Miersch O., Abdala G., 2008., Cold and water stresses produce changes in endogenous jasmonates in two population of *Pinus pinaster* Ait. *Plant Growth Regulator* 52: 111-116.
- Petri L., Adani A., 1916. Ricerche sopra una malattia dei coniferi del “*Pinus Pineae*”. *Annali della R. Accademia di Agricoltura di Torino*. Volume LIX: 1-24.
- Piedallu C., Gégout J.C., 2007. Multiscaling computation of solar radiation for predictive vegetation modelling. *Ann. For. Sci.* 64: 899-909.
- Piussi P., 1995. *Selvicoltura generale*. Utet, Torino; pp 454.
- Piussi P., Torta G., 1994. Osservazioni sulla lunghezza e sulla longevità degli aghi Pino domestico (*Pinus pinea* L.). *Giorn. Bot. Ital.* 128: 887-902.
- Poyatos R., Llorens P., Pinol J., Rubio C., 2008. Response of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and pubescent oak (*Quercus pubescens* Willd.) to soil and atmospheric water deficits under Mediterranean mountain climate. *Ann. For. Sci.* 65: 306-319.
- Ragazzi A., Dellavalle I., Mesturino L., 1989. The oak decline: a new problem in Italy. *Eur. J. For. Path.* 19: 105-110.

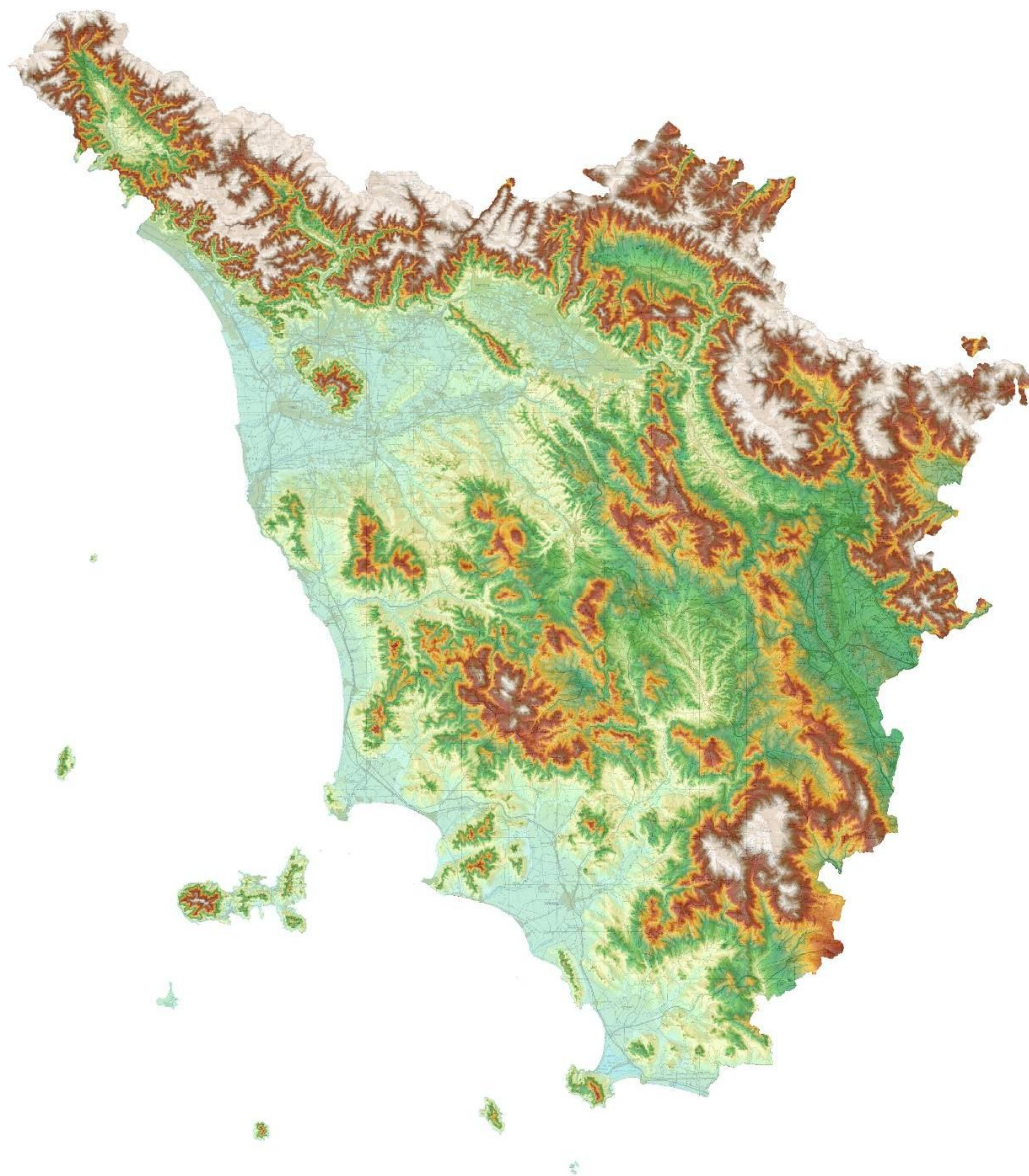
- Ragazzi A., Moricca S., Dellavalle I., 2004. Endophytism in forest trees. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze; pp 239.
- Regione Toscana - Giunta regionale, Dipartimento dello sviluppo economico, 1998. L'inventario forestale – serie boschi e macchie di Toscana. Edizioni Regione Toscana, Firenze; pp 219.
- Riolo F., Vittorio M., 2010. Manuale avanzato di ArcGIS 9 e 10: creare e gestire modelli GIS con il Model Builder. Dario Flaccovio Editore, Palermo; pp. 134.
- Ristaino J.B., Gumpertz M.L., 2000. New Frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. Ann. Rev. Phytopathol. 38: 541-576.
- Sánchez-Ballesteros J., González V., Salazar O., Acero J., Portal M.A., Julián M., Rubio V., Bills G.F., Polishook J.D., Platas G., Mochales S., Peláez F., 2000. Phylogenetic study of *Hypoxylon* and related genera based on ribosomal ITS sequences. Mycologia 92: 964–977.
- Sanesi G., 2000. Elementi di pedologia. I suoli, loro proprietà, gestione e relazioni con l'ambiente. Calderini Edagricole, Bologna; pp 390.
- Schaad N.W., Frederick R.D., 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. Canadian Journal of Plant Pathology 24: 250–258.
- Schena L., Nigro F., Ippolito A., Gallitelli D., 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonist fungi. European Journal of Plant Pathology 110: 893-908.
- Sessions G., 1987. The Deep Ecology Movement: a review. Environmental review 11: 105-125.
- Stanosz G.R., Blodgett J.T., Smith D.R., Kruger E.L., 2001. Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. New Phytol. 149: 531–538.
- Stanosz G.R., Carlson J.C., 1996. Association of mortality of recently planted seedlings and established sampling in red pine plantations with *Sphaeropsis* collar rot. Plant Disease 80: 750-753.
- Stanosz G.R., Smith D.R., Guthmiller M.A., Stanosz J.C., 1997. Persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in asymptomatic shoots of red and jack pines. Mycologia 89: 525-530.
- Stanosz G.R., Trobaugh J., Guthmiller M.A., Stanosz J.C., 2004. *Sphaeropsis* shoot blight and altered nutrition in red pine plantations treated with paper mill waste sludge. For. Path. 34: 245-253.

- Swart W.J., Knox-Davies P.S., Wingfield M.J., 1985. *Sphaeropsis sapinea*, with special references to its occurrence on *Pinus spp.* in South Africa. South African Forestry Journal 35: 1-8.
- Swart W.J., Wingfield M.J., 1991. Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. Plant Disease 75: 761-766.
- Swart W.J., Wingfield M.J., Knox-Davies P.S., 1987a. Factors associated with *Sphaeropsis sapinea* infection of pine trees in south Africa. Phytophylactica 19: 505-510.
- Swart W.J., Wingfield M.J., Knox-Davies P.S., 1987b. Conidia dispersal of *Sphaeropsis sapinea* in three climatic region of South Africa. Plant Disease 71: 1038-1040.
- Taylor E.J.A., Bates J., Kenyon D., Maccaferri M., Thomas J., 2001. Modern molecular methods for characterization and diagnosis of seed-borne fungal pathogens. Journal of Plant Pathology 83: 75–81.
- Tello M.L., Redondo C., Gaforio L., Pastor S., Mateo-Sagasta E., 2005. Development of a disease severity rating scale for plane tree anthracnose. Urban Forestry & Urban Greening 3: 93-101.
- Thomas F.M., Blank R., and Hartmann G., 2002. Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. For. Path. 32: 277–307.
- Thomas F.M., Hartmann G., 1996. Soil and tree water relations in mature oak stands of northern Germany differing in the degree of decline. Ann. Sci. For. 53: 697-720.
- Torres J.J., 1985. El *Hypoxylon mediterraneum* (DeNot.) Mill. y su comportamiento en los uncinare alcornocale nadaluces. Boletin Servicio Plagas 11: 185-191.
- Turco S., Napolitano R., Alberti G., Altobelli A., Ganis P., Bonfanti P.L., 2004. Analisi mediante tecniche GIS delle relazioni tra variabili ecologiche e vegetazione forestale nelle Prealpi Giulie. Forest@ 1 (2):88-99.
URL:<http://www.sisef.it/forest@/>.
- Vannini A., Biocca M., Paparatti B., 1996a. Contributo alla conoscenza del ciclo biologico di *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Mill. su *Quercus cerris*. Inf. Fitopatol. 56: 53–55.
- Vannini A., Lucero G., Anselmi N., Vettrai A.M., 2009. Response of endophytic *Biscogniauxia mediterranea* to variation in leaf water potential of *Quercus cerris*. For Path. 39: 8-14.
- Vannini A., Paganini R., Anselmi N., 1996b. Factors affecting discharge and germination of ascospores of *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Mill. Eur. J. For. Path. 26: 12-24.

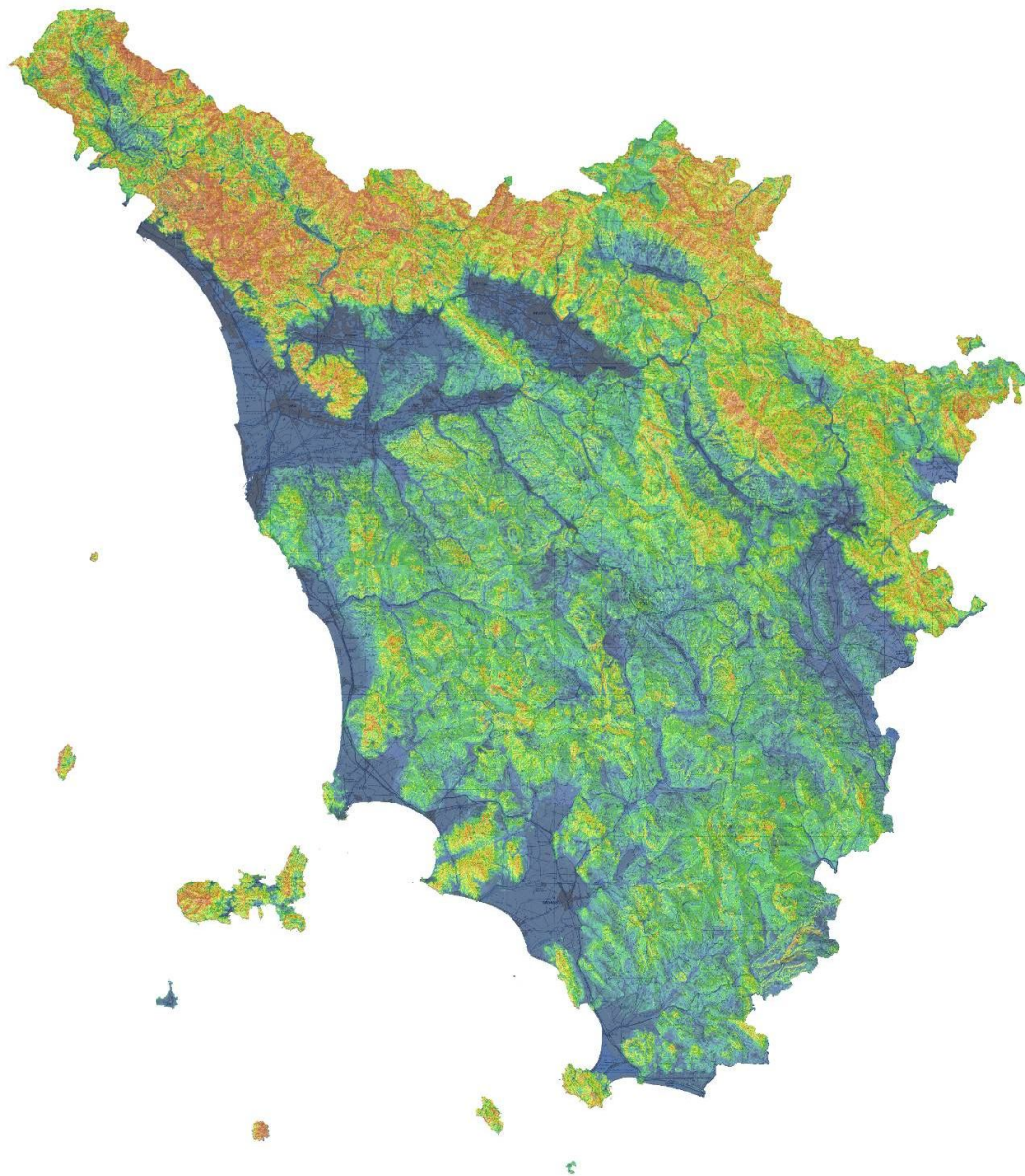
- Vannini A., Scarascia Mugnozza G., 1991. Water stress: A predisposing factor in the pathogenesis of *Hypoxylon mediterraneum* on *Quercus cerris*. Eur. J. For. Path. 21: 193-201.
- Vannini A., Valentini R., 1994. Influence of water relations on *Quercus cerris*-*Hypoxylon mediterraneum* interaction: a model of drought-induced susceptibility to a weakness parasite. Tree Physiology 14: 129-139.
- Vannini A., Valentini R., Luisi N., 1996c. Impact of climatic changes and secondary stress factor on oak decline: effect of drought and *Hypoxylon mediterraneum* in Mediterranean region. Ann. Sci. For. 53: 72–81.
- Verona O., 1950. Note sopra una malattia degli strobili di “*Pinus pinea*” prodotta da “*Sphaeropsis necatrix*”. Annali della Facoltà di Agraria di Pisa, Nova Serie 11: 193:236.
- Wang C., Lu Z., Haithcoat T.L., 2007. Using Landsat image to detect oak decline in the Mark Twain National Forest, Ozark Highlands. Forest Ecology and Management 240: 70-78.
- Wargo P.M., 1996. Consequent of environmental stress on oak: predisposition to pathogens. Ann. Sci. For. 53: 359-368.
- Warwick F., 2006. A Theory of General Ethics: Human Relationships, Nature, and the Built Environment. MIT Press; pp 392.
- Wilson D., 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition: Oikos 73: 274-276.
- Wingfield M.J., Knox-Davies P.S., 1980. Association of *Diplodia pinea* with a root disease of pines in South Africa. Plant Disease 64: 221-223.
- Winton L.M., Manter D.K., Stone J.K., Hansen E.M., 2003. Comparison of biochemical, molecular, and visual methods to quantify *Phaeocryptopus gaeumannii* in Douglas-Fir foliage. Phytopathology 93: 121–126.
- Winton L.M., Stone J.K., Watrud L.S., Hansen E.M., 2002. Simultaneous one-tube quantification of host and pathogen DNA with Real-time polymerase chain reaction. Phytopathology 92: 112–116.
- Wolynski A., Maresi G., Ambrosini P., Luchi N., Capretti P., 2004. *Sphaeropsis sapinea* e rimboschimenti di Pino nero in Trentino. Sherwood 102: 13-17.
- Zwolinski J.B., Swart W.J., Wingfield M.J., 1995. Association of *Sphaeropsis sapinea* with insect infestation following hail damage of *Pinus radiata*. Forest Ecology and Management 72: 293-298.

Allegati

Allegato I : Cartografia tematica - DEM (Digital ElevationModel).



Allegato II : Cartografia tematica - carta delle pendenze.



Allegato III : Cartografia tematica - carta pedologica. (Regione Toscana - Direzione Generali Sviluppo Economico, Settore Programmazione Forestale, modificato).



Allegato IV : Scheda di rilievo utilizzata per la raccolta delle informazioni qualitative-quantitative delle piante monitorate.

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie (Di.B.A.)
Sez. Difesa delle piante
Piazzale delle Cascine 28 – 50144 Firenze

SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° rilievo/nome area _____ Rilevatore _____ Data ____/____/____

Regione _____ Comune _____ Località _____

Lat-NORD _____ Long-EST _____ Esposizione N NE E SE S SO O NO

Altimetria _____ Pendenza % _____ Giacitura _____

Substrato geologico-pedologico _____ Profondità suolo _____

Pietrosità affiorante _____ Dimensioni _____

Governo e Trattamento _____

Composizione specifica piani arborei % _____

DESCRIZIONE DELLA STAZIONE

(indicare struttura orizzontale e verticale; % della copertura per ogni strato; età o stadi di sviluppo; presenza/assenza di rinnovazione, lettiera e materia morta; stato generale del soprassuolo; altre informazioni come la viabilità, tagli recenti, passaggio del fuoco, fenomeni erosivi, danni da agenti biotici o abiotici ...)
