



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Forestali e
Ambientali

Eutypella parasitica: primo rinvenimento e
monitoraggio in Friuli Venezia Giulia

Eutypella parasitica: first report and monitoring in Friuli Venezia Giulia

Relatore:

Prof. Lucio Montecchio

Correlatore:

Dott. Benedetto Teodoro Linaldeddu

Laureando

Carlo Bregant

Matricola n. 1154205

ANNO ACCADEMICO 2017/2018

INDICE

1. RIASSUNTO	5
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUZIONE.....	9
3.1 Importanza ecologica degli acero-frassineti	9
3.2 Gli acero-frassineti in Friuli Venezia Giulia	12
3.3 Inquadramento botanico degli acero-frassineti	14
3.3.1 Acero di monte	15
3.3.1a Areale e habitat	15
3.3.1b Caratteristiche e morfologia della specie	15
3.3.2 Acero campestre	16
3.3.3 Acero riccio	17
3.3.4 Frassino maggiore	18
3.3.5 Tigli	18
3.4 Principali avversità degli acero-frassineti	19
3.4.1 Avversità del frassino	19
3.4.1a Disseccamento del frassino	20
3.4.2 Avversità dell'acero	22
3.4.2a Cancro dell'acero da <i>Eutypella parasitica</i>	24
4. SCOPO DEL LAVORO	31
5. MATERIALI E METODI	33
5.1 Indagine di campo	33
5.2 Indagini di laboratorio	37
5.2.1 Isolamento in coltura pura	37
5.2.2 Identificazione degli isolati	38

5.2.3	Analisi filogenetiche	39
6.	RISULTATI.....	41
6.1.	Monitoraggio e campionamento	41
6.2.	Isolamento in coltura pura	44
6.3	Identificazione degli isolati	44
7.	CONCLUSIONI E DISCUSSIONE.....	47
8.	BIBLIOGRAFIA.....	51
9.	SITOGRAFIA.....	57
10.	ALLEGATI	59
11.	TABELLE E GRAFICI	79
12.	RINGRAZIAMENTI	89

1. RIASSUNTO

Nel luglio 2005 la NPPO (National Plant Protection Organization slovena ha informato l'EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) sulla scoperta, avvenuta nei pressi di Lubiana, di un nuovo patogeno, agente di cancro dell'acero (*Acer* spp.): *Eutypella parasitica* R.W. Davidson & R.C. Lorenz. Il fungo era già conosciuto nel Nord America per i danni causati a varie specie di acero presenti in Canada e negli USA. Negli anni seguenti è iniziata la ricerca di *E. parasitica* sia nel territorio sloveno che in quello degli stati limitrofi. Gli studi evidenziano la presenza della malattia in una vasta area dell'Europa Centro-Orientale: Slovenia, Croazia, Austria, Germania, Ungheria, Repubblica Ceca e Polonia. In Europa sono suscettibili diverse specie di acero sia nei centri urbani e sia nei popolamenti forestali. In particolare, a essere colpite sono le specie tra le più rappresentative delle nostre formazioni secondarie: *Acer pseudoplatanus* L., *A. campestre* L. e più raramente *A. platanoides* L. L'infezione del patogeno, agente di cancro nella parte bassa del fusto, è raramente letale su piante adulte, ma in fase di maturità può indebolire la resistenza meccanica allo schianto e compromettere le caratteristiche tecnologiche del legno. Nei prossimi anni, il cancro dell'acero da *Eutypella* potrebbe rappresentare una nuova avversità per una tipologia forestale, che si è sviluppata negli ultimi decenni in Europa: l'acero-frassineto.

La presenza di *Eutypella parasitica* in Italia viene per la prima volta descritta in questo lavoro di tesi, compiuto grazie ad un'attività di ricerca condotta su campo e in laboratorio e ai precedenti studi, già presenti in bibliografia sul patogeno. Il monitoraggio è stato eseguito lungo il confine tra l'Italia e la Slovenia nelle province di Gorizia e Udine. Ha riguardato sia l'ambiente urbano (parchi e viali) che quello forestale nelle valli del Natisone, Judrio e sul Collio Goriziano. Le attività d'isolamento e ricerca in laboratorio sono invece state attuate nei laboratori di Patologia vegetale del TeSAF di Legnaro. Lo scopo principale del lavoro è stato l'accertamento della presenza del patogeno in Italia mediante l'individuazione di piante sintomatiche, il prelievo di campioni di micelio dalle stesse, l'isolamento in coltura pura e l'analisi molecolare del DNA per l'identificazione e la filogenesi. Questo studio ha evidenziato una presenza della malattia piuttosto discontinua e frammentata sul territorio lungo il confine con la Slovenia. Ciò può essere dovuto sia alla copertura non continua dell'acero e sia alle difficoltà di rilevamento riscontrate in zone impervie, limitate da scarsa viabilità e caratterizzate da pendii molto ripidi in valli strette, che potrebbero anche limitare la

diffusione delle spore. Nelle zone infette la presenza di aceri sintomatici è piuttosto rada. La presenza di *Eutypella* è stata rilevata in esemplari di media o matura età di acero di monte e acero campestre. Durante l'attività in laboratorio *Eutypella parasitica* è stata isolata in 20 campioni.

L'analisi delle sequenze ITS4 degli isolati ha permesso l'identificazione precisa della specie. Il confronto tra le sequenze degli isolati italiani con il TYPE della specie depositato in GenBank (CBS 210.39) ha rilevato l'effettiva corrispondenza genetica.

L'analisi delle sequenze EF1 ha evidenziato l'appartenenza degli isolati italiani ed europei a un'unica popolazione ben differente da quella degli Stati Uniti.

Il confronto tra i risultati finali della ricerca e lo studio sulla *Chalara fraxinea* svolto nel 2009 da Floreancig, sugli stessi popolamenti delle Valli del Natisone, evidenzia una fragilità a nuove avversità fitosanitarie per gli acero-frassineti.

2. ABSTRACT

In autumn 2016, typical *Eutypella* canker symptoms were first observed on ca. 55-year-old *Acer pseudoplatanus* trees growing in a mixed ash-maple seminatural forest in northeastern Italy (Prapotnizza, Udine, 46°17'N, 13°64'E). In subsequent surveys carried out in 2017, the disease was observed in another 5 sites along a 36-km-long transect parallel to the Italian-Slovenian border (Drenchia to Gorizia). Symptomatic trees showed approximately 80-cm-long elongated cankers with the bark remaining firmly attached to the stem and with the presence of subcortical white mycelial fans and black perithecial necks. The morphological features of the sexual morph [perithecia (365-) 502 (-638) μm , asci (65.3-) 87.9 (-106.5) \times (7.3-) 9.0 (-11.5) μm and ascospores (7.8-) 9.3 (-11.2) \times (2.5-) 3.2 (-3.7) μm (n = 99)] matched the description of *Eutypella parasitica* in Davidson and Lorenz (1938). To isolate the pathogen, small fragments of mycelial fans and symptomatic inner bark and woody tissues (4–5 mm²) taken from the margin of 20 cankers were placed into Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA, 39 g/l, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK). All isolates developed white colonies with a dense mycelium appressed to the agar surface that became light gray after 20 to 25 days at 25 °C in the dark. The hyaline, filiform, irregularly curved and aseptate conidia were exuded in a yellow matrix and measured 37.8 μm (26.9 -48.5) \times 2.0 μm (1.4 - 2.6) (n = 50). A representative isolate was deposited in the Culture Collection of the Laboratory of Forest Protection at the Slovenian Forestry Institute (ZLVG) under Accession Number 667. Furthermore, a voucher specimen was stored in the Herbarium of the Slovenian Forestry Institute (Accession No. LJF 5226). The identity of the fungal isolates was confirmed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region of their rDNA. BLAST searches against GenBank showed 100% identity with reference sequences of *Eutypella parasitica*, including that of ex-type culture CBS 210.39 (GenBank accession number NR_145214). The sequence of the ITS region of the representative strain (667) was deposited in GenBank (accession number: KY312115). *E. parasitica*, probably native to North America, was reported for the first time in Europe in 2004 (Jurc et al. 2006) and thereafter reported in several European countries (Slovenia, Austria, Croatia, Germany, Hungary, Poland and the Czech Republic) (EPPO 2017). To the best of our knowledge, this is the first record of *E. parasitica* in Italy, where maple tree species (mainly *A. campestre*, *A. pseudoplatanus*, and *A. platanoides*) are naturally present in the mountain forests in the Alps and intensively cultivated for timber production. This result suggests an east-west spread

(likely related to the main local wind directions), with a spread risk in northern Italy estimated as very high to high, with a 42% probability, according to Ogris et al. (2006).

3. INTRODUZIONE

3.1. Inquadramento ecologico degli acero-frassineti

Le regioni del Nord Italia, lungo la fascia collinare ed esalpica, sono ricche di boschi di neo-formazione a successione secondaria. In seguito all'abbandono dell'attività pastorizia e agricola delle aree montane, nella seconda metà del '900 l'innescò del processo di ricolonizzazione della vegetazione ha favorito la nascita e lo sviluppo di questi popolamenti (Alberti et al, 2016). Secondo Piussi (2002), un bosco di neoformazione è "il rimboschimento spontaneo che ha luogo, sui terreni prima occupati dall'attività agricola, per effetto di una successione secondaria". Il Global Forest Resources Assessment (FAO, 2010) definisce successione secondaria la dinamica che porta alla rigenerazione naturale della foresta "dopo intense e prolungate azioni di disturbo antropico o naturale sulle originarie comunità forestali". Queste formazioni, oltre alla produzione di legname pregiato, sono molto importanti dal punto di vista ecologico, perché costituiscono una fase evolutiva fondamentale della successione forestale. L'Unione Europea riconosce a questi popolamenti una fondamentale funzione conservativa della biodiversità, collocandoli tra le aree Natura 2000 dell'habitat prioritario "Foreste di versanti, ghiaioni e valloni del *Tilio-Acerion* (Alberti et al, 2016). Nel processo di formazione del bosco, le specie forestali invadono i terreni con dinamiche diverse, spesso dipendenti da molti fattori: il grado di sviluppo del suolo, il clima, l'esposizione e soprattutto la disponibilità di seme presente nell'area.

In Italia la dinamica si differenzia secondo la zona considerata:

- Sulle Alpi e le Prealpi (Aceto et al, 2000; Chiesi, 1998; Motta e Nola, 2001; Pelleri e Fontana, 2003; Salbitano, 1987) prevale un processo rapido con colonizzazione immediata da parte di specie arboree forestali;
- Nell'Appennino e zone mediterranee, invece, la colonizzazione è generalmente più lenta, con lunghe fasi erbacee e arbustive.

Le modalità d'insediamento per questa tipologia forestale sono due (Salbitano, 1987):

- In campi abbandonati con presenza di muretti, cumuli di pietre, gradoni o terrazzi, la colonizzazione è piuttosto rapida e inizia dalle piante portaseme preesistenti che vivono in corrispondenza di questi manufatti;
- Nei terreni non sistemati, il primo colonizzatore è il nocciolo che, sfruttando cespugli preesistenti, generalmente in corrispondenza di muretti di confine o pietraie,

si diffonde rapidamente nell'area abbandonata. Poi, da nuclei anche distanti di acero e frassino arriva il seme, consentendo l'insediamento di un'abbondante rinnovazione di queste due specie. In breve tempo, il frassino e l'acero si affermano facendo arretrare la dominanza del nocciolo.

Le modalità d'insediamento della colonizzazione dipendono dalla disseminazione, dall'insediamento della rinnovazione, a partire dalle piante portaseme e dalla capacità di affermarsi, superando la competizione intra e inter specifica. La presenza di piante porta-seme è necessaria all'avvio del processo di colonizzazione ed è favorita, in particolar modo per l'acero-frassineto, dall'attività antropica (Alberti et al., 2009). Prima dell'abbandono dei terreni coltivati, l'uomo manteneva alcune specie utili, come le querce per le ghiande, il frassino, il tiglio e l'acero come foraggio o a funzione di siepe frangivento. A partire da questi nuclei preesistenti si è avviata la successione secondaria dei terreni abbandonati. (Piussi, 1998). La successione ecologica dei boschi di neoformazione è un sistema dinamico in continua evoluzione; il sistema è governato dai processi di migrazione di specie e di selezione naturale (Gleason, 1926; Kimmins, 1997). In queste dinamiche ecologiche di migrazione ed espansione della specie sono di fondamentale importanza, oltre alla produzione del seme, le sue caratteristiche morfologiche e la modalità di dispersione al di là della capacità pollonifera per la moltiplicazione vegetativa. Le specie tipiche dell'acero-frassineto (pioniere secondarie) hanno un seme alato che favorisce una disseminazione anemocora a distanze superiori rispetto a specie definitive, come la quercia o il faggio, che sono invece caratterizzate da un seme pesante a disseminazione barocora (Torta, 1997). Per gli acero-frassineti secondari delle Prealpi Orientali, Alberti et al. (2009) ha ricostruito l'evoluzione temporale della densità dei popolamenti di origine secondaria mediante tecniche dendrocronologiche e, sulla base di queste curve teoriche di avanzata del bosco, ha distinto cinque fasi nel processo successionale:

- I. Stadio di pre-abbandono: quando il prato è ancora falciato, ma possono esserci alberi isolati usati per la produzione di foraggio;
- II. Fase iniziale: quando, avvenuto l'abbandono, inizia il processo di successione secondaria;
- III. Fase di massima colonizzazione: nel momento in cui l'incremento annuo del numero di alberi è al massimo;
- IV. Fase di competizione: quando l'incremento annuo del numero di alberi decresce a causa della competizione tra gli individui e la chiusura delle chiome.

V. Fase di inizio della rinnovazione: quando negli spazi vuoti, derivati dallo schianto o dalla morte di singoli individui o gruppetti di alberi, l'ingresso della luce, attraverso la copertura, favorisce l'avvio del processo di rinnovazione delle specie ecologiche più esigenti o delle stesse specie pioniere secondarie, in virtù della fertilità del suolo e dell'intensità della perturbazione avvenuta.

Oltre ai fattori genetici ed ecologici, che regolano la riproduzione, i fattori ambientali, come suolo o il clima, e la competizione fra le specie sono importanti nell'influenzare la velocità e la dinamica del processo successionale (Alberti et al., 2016). La composizione dei boschi di neoformazione non è stabile nel tempo, ma evolve da una forma più primitiva -con specie pioniere colonizzatrici di suolo nudo- attraverso fasi intermedie fino alla copertura da parte di piante più esigenti in termini ecologici. Le prime specie pioniere sono caratterizzate da una rapida crescita iniziale, precoce fioritura, abbondante fruttificazione, disseminazione prevalentemente anemocora, eliofilia negli stadi giovanili, tolleranza degli stress ed elevata capacità di riproduzione vegetativa. Tra esse, definite pioniere primarie, si possono ricordare la betulla, il pioppo, l'ontano e il nocciolo. A queste, seguono le specie post-pioniere che presentano caratteristiche simili alle specie precedenti, sebbene meno marcate. Nelle regioni alpine italiane (Del Favero, 2004), le tipologie prevalenti sono costituite da acero-frassineti e acero-tiglieti, orno-ostrieti, betuleti e corileti, larici-cembreti, alnete.

Gli acero-frassineti, di norma, vedono la netta prevalenza del frassino maggiore (*Fraxinus excelsior* L.) o dell'acero (*Acer pseudoplatanus* L., *Acer platanoides* L.) e più raramente dei tigli (*Tilia cordata* Mill, *T. platyphyllos* Scop.). Queste specie sono considerate dalla letteratura forestale "latifoglie nobili" (Del Favero, 2004). Tuttavia questi popolamenti sono spesso consorzi misti, in cui partecipano altre latifoglie in relazione alle caratteristiche stazionali. Specie frequenti negli acero-frassineti sono l'ontano nero (*Alnus glutinosa* Gaertn), l'olmo (*Ulmus minor* Mill.), il faggio (*Fagus sylvatica* L.), il carpino nero (*Ostrya carpinifolia* Scop.) e, a quote più basse, l'acero campestre (*Acer campestre* L.), l'orniello (*Fraxinus ornus* L.), il ciliegio selvatico (*Prunus avium* L.) e la roverella (*Quercus pubescens* Willd). Questi consorzi sono tipici delle regioni esalpine e mesalpine (più raramente di quelle endalpine) e del piano collinare (Del Favero, 2004). La composizione erbacea della flora nei popolamenti di acero e frassino dipende molto dalle utilizzazioni precedenti, con un'abbondanza di entità non nemorali ma tipiche dei prati e dei suoli mesoidrici (Del Favero, 1998). Localmente abbondano *Allium ursinum* L. e *Petasites albus* (L.) Gaertn. Nei

popolamenti in cui la ricolonizzazione si è verificata da molto tempo (Thill, 1970) appaiono le geofite come *Anemonoides nemorosa* (L.) Holub, *Ficaria verna* Huds. e *Arum maculatum* L.

L'acero di monte può essere considerato anch'esso una specie colonizzatrice di suoli già evoluti. Le stazioni in cui vive sono, come nel caso del frassino, mesiche. Mentre il frassino è strettamente legato ad ambienti ecologicamente definiti, l'acero è più ubiquitario (Del Favero, 1998). Le caratteristiche ecofisiologiche diverse delle due specie rendono la composizione degli aceri-frassineti notevolmente variabile e dinamica. A seconda delle condizioni ottimali, una delle due specie prende il sopravvento. In molte stazioni la specie dominante è il frassino, anche se, durante i processi di ricolonizzazione, è spesso e per lungo tempo accompagnato dall'acero. Quando non sussistono le condizioni ottimali per il frassino la composizione può essere invece più varia, con prevalenza dell'acero sempre in relazione alle esigenze di luce e ai ritmi diversi di fruttificazione (Del Favero, 1998). Secondo Ellenberg (1988), i luoghi preferenziali in cui sono localizzate queste formazioni sono:

- Ripidi pendii o le forre, in ambienti freschi, su terreni poveri in terra fine, ma ricchi di humus, derivati da sfaldamenti di rupi o da accumuli di detriti calcarei.
- I depositi alluvionali, allo sbocco di valli laterali, in corrispondenza di profonde incisioni vallive, su suoli poveri di calcio ma generalmente fertili.
- La base di ripidi pendii, su suoli colluviali caratterizzati da un consistente accumulo di nutrienti e buona disponibilità idrica all'inizio della stagione vegetativa.
- I margini dei ruscelli, su versanti poco acclivi, non inondati, ma dilavati e spesso ringiovaniti da deboli smottamenti.

3.2. Gli acero-frassineti in Friuli Venezia Giulia

La regione Friuli Venezia Giulia presenta una grande varietà di ambienti con notevoli differenze in termini meso e microclimatici. L'arco delle Prealpi e della pedemontana limitrofa, con particolare riguardo al settore orientale delle Prealpi Giulie, è caratterizzato da una piovosità molto elevata con un forte incremento del gradiente pluviometrico dalle zone pianeggianti alle prime catene montuose. Tutta l'area delle Prealpi Giulie è compresa tra l'isoieta dei 2000 mm e quella dei 3000 mm annui di pioggia, con punte di quasi 3300 mm medi in corrispondenza della catena montuosa dei monti Musi (ALLEGATO 1B). A determinare questi livelli di precipitazione media annua, i più elevati della penisola italiana e tra i più elevati d'Europa, contribuisce in

modo decisivo la breve distanza tra il mare Adriatico e l'arco prealpino con orientamento est-ovest. Le correnti umide (di prevalente direzione sud/sud-occidentale), provenienti dal mare e dalle depressioni cicloniche presenti sull'Europa occidentale, sospinte da venti di scirocco, incontrano improvvisamente l'innalzamento altitudinale montuoso; sollevandosi si raffreddano e condensano provocando ingenti precipitazioni.

I suoli delle Prealpi Giulie nei comuni di Taipana, Lusevera, Attimis e Faedis sono caratterizzati, specie sotto i 1000 m, da substrati silicatici denominati "flyscioidi del Cenozoico" (Lupieri, 2004). Nelle valli orientali dello Judrio e del Natisone è anche presente questo tipo di formazione con affioramenti di flysch maasfrichtiano ("Flysch di Clodig", "Flysch di Cras", "Unità di Drenchia" e "Flysch dello Judrio"); una particolare formazione silicatica formata da alternanza di strati marnosi e strati arenacei (areniti o calco areniti) variabili in composizione e spessore (Tunis & Venturini, 1984). Questi suoli arenoso-marnacei, anche se ricchi di scheletro, sono caratterizzati da una fertilità molto elevata accentuata dalla forte impermeabilità che consente l'accumulo di nutrienti come l'azoto e il fosforo. Tale fertilità in certi casi è una conseguenza delle trascorse attività antropiche come la pastorizia o le coltivazioni agricole. Le condizioni ambientali di elevata piovosità e fertilità del suolo pongono le basi per l'insediamento ad esempio dell'acero e del frassino, di norma molto esigenti in termini stagionali. Nella regione Friuli Venezia Giulia i boschi di neo-formazione sono molto diffusi lungo la fascia prealpina, nelle valli del Natisone e del Torre e solo più localmente nelle Prealpi Carniche. La formazione più tipica è appunto quella dell'acero-frassineto (Alberti et al, 2016) (ALLEGATI 1A-2). Nella regione si trovano tre tipologie diverse di acero-frassineto: aceri-frassineto tipico, aceri-frassineto con ontano nero e aceri-frassineto con carpino nero (Lupieri, 2004). Gli acero-frassineti si localizzano di norma nei medio-bassi versanti e negli impluvi tra i 500 e i 1.200 metri di altitudine e dimostrano una certa indifferenza per la natura del substrato (Del Favero, 2004). La distribuzione di queste formazioni è legata alla presenza di abbondanti precipitazioni (maggiori di 1.500 mm all'anno) e di una buona e continua disponibilità di acqua al suolo, dal momento che, soprattutto il frassino, manifesta una scarsa efficienza nei confronti della trattenuta idrica. Mentre il frassino può costituire formazioni in cui è nettamente prevalente, l'acero ha spesso un ruolo di "accompagnatore" di altre specie in molti consorzi, dai castagneti agli abieteti (Alberti et al.,2016). Tuttavia, a scala di estremo dettaglio, la presenza o prevalenza di una specie sull'altra può dipendere dalla vicinanza di piante portaseme, dalla loro diversità nei ritmi di fruttificazione (Kerr, 1995) e delle esigenze

di luce (Urbinati e De Cillia, 1995). Su substrati silicatici l'acero-frassineto può essere contaminato dalla presenza del tiglio anche in piccoli boschetti puri o andare a formare l'acero-tiglieto (Del Favero, 2004). In Friuli Venezia Giulia popolamenti con netta prevalenza di tiglio sono molto rari e relegati soltanto alla valle dello Judrio e del Natisone (Del Favero, 2004).

Nella regione questi soprassuoli giovani, se gestiti correttamente con tecniche di selvicoltura moderna, per esaltarne le caratteristiche qualitative, potrebbero costituire un patrimonio forestale di notevole valore e interesse per il futuro. Data la loro origine, queste formazioni in Friuli hanno un'età di circa 40-60 anni e una forma di governo dominante a ceduo; raramente sono gestiti a fustaia. A causa della proprietà dei terreni molto frazionata, di una poca conoscenza della selvicoltura di queste formazioni o del mancato interesse dei proprietari, la gestione attiva è, tuttavia, molto rara; nonostante il pregio del legno di queste latifoglie "nobili", il soprassuolo è lasciato all'evoluzione naturale e le poche utilizzazioni sono finalizzate alla legna da ardere (Alberti et al, 2016).

3.3. Inquadramento botanico degli acero-frassineti

Il genere *Acer*, che comprende circa 150 specie prevalentemente dell'emisfero boreale, appartiene alla famiglia delle *Sapindaceae*. In Europa sono presenti 14 specie, metà delle quali vive spontanea in Italia. Sono tutte raggruppate in diverse sezioni secondo la classificazione di De Jong (Andreato, 2007):

- Sez. *Acer*: con gemme pluriperulate e foglie a 3-5 (7) lobi con margine intero o dentato grossolanamente, fiori gialli verdastri, con disco nettario di 8 stami nel bordo interno. Si dividono in serie *Acer* con foglie penta lobate, infiorescenza a pannocchia o a corimbo (Acero di monte – *Acer pseudoplatanus* L.) e serie *Monspessulana*, con alberi o arbusti a foglie lobate (3-5), infiorescenza a corimbo con lungo peduncolo (*Acer monspessulanum* L. e *Acer opalus* Mill.).

- Sez. *Platanoidea*: con gemme pluriperulate, foglie lobate a 3-5 (7) con margine intero o lievemente dentato, piccioli con lattice, fiori in corimbi eretti, disco con 8 stami al centro (*Acer platanoides* L. e *Acer campestre* L.).

3.3.1 Acero di monte (*Acer pseudoplatanus* L.)

3.3.1a Areale e habitat

La distribuzione dell'acero di monte è molto simile a quella del frassino, al quale la specie è spesso legato. Tuttavia il suo areale di distribuzione è più limitato e si ferma alle zone collinari della Francia, Belgio e Germania. A sud occupa la zona settentrionale della Penisola Iberica e l'Italia (isole comprese) e a est fino al Caucaso e al Mar Caspio. In Italia è frequente su tutto l'arco alpino e appenninico, sul Gargano, in Sicilia e Sardegna spesso fino al limite della vegetazione. L'acero di monte è una specie submontana che ha il suo climax tra il *Castanetum* e il *Fagetum*. (Sgarbossa, 2008)

3.3.1b Caratteristiche e morfologia della specie (ALLEGATO 3)

L'acero di monte è una specie arborea di prima grandezza, che può raggiungere altezze di 30-35 metri, ma solitamente non supera i 20-25 metri. La crescita in gioventù è rapida, raggiungendo i 2-3 metri in pochi anni. Presenta una chioma espansa e rotondeggiante (sferico-allungata), soprattutto negli individui isolati. Il fusto è cilindrico e dritto, simile a quello del frassino, con corteccia liscia di colore grigiastro in età giovanile e più grossolana in età matura, quando si sfalda in scaglie irregolari con sfumature rosate. I rami inferiori sono pesanti, spesso cadenti e conferiscono il portamento espanso alla specie. (Ticli, 2004) I rametti sono eretti e opposti con gemme ovoidali, perule verdi e margini cigliati. Le foglie, caduche, sono semplici con disposizione opposta e picciolo lungo 10-15 cm, palmate con 5-7 lobi poco acuti e lievemente dentati, verde lucido nella pagina superiore, glabre e più chiare in quella inferiore, con pubescenza lungo le nervature. Sono portate da un lungo picciolo scanalato. Il ritardo nella germogliazione e nella fioritura, rispetto al frassino, permette all'acero di proteggere foglie e fiori dalle gelate tardive. I fiori poligonali o unisessuali, con 5 petali gialli e 8 stami, sono raccolti in infiorescenze a racemo, lunghe fino a 15 cm, che compaiono dopo la fogliazione in aprile fino a maggio inoltrato (Ferrari & Medici, 2008). I frutti sono prodotti dai 20-40 anni di età, secondo la stazione e densità di crescita e sono delle disamare lunghe 3-6 cm, unite con angolo acuto di poco meno di 90°, di colore giallo scuro, prodotte in abbondanza ogni 1-2 anni e riunite in grappoli vistosi (Ticli, 2004). Cadono verso la fine di settembre e sono portate anche per lunghe distanze dal vento, durante tutta la stagione invernale. I semi hanno un'ottima germinabilità (40-80%). La rinnovazione, come per il frassino, è molto abbondante nei

primi mesi, ma, dopo la prima stagione vegetativa, è soggetta a una fortissima mortalità. L'apparato radicale è ben espanso con radici fittonanti che entrano in profondità a sviluppo verticale. La capacità pollonifera è elevata e ne consente il governo a ceduo (Bernetti & Padula, 1984; Bernetti, 1997; Gellini & Grossoni, 1997).

Il legno è duro, di colore bianco-giallastro, con grana molto fine e lucida. Viene utilizzato nella fabbricazione di mobili, per lavori di tornitura, per intagli e impiallacciatura. Le radici sono molto apprezzate per tranciati decorativi (Scortegagna, 2007). Molto noto il suo utilizzo in ebanisteria e liuteria per la produzione di violini e altri strumenti musicali (Ticli, 2004).

L'acero di monte è spesso utilizzato come specie ornamentale in parchi, giardini e viali cittadini. Esistono diverse cultivar di questa specie. La più conosciuta è la "*Atropurpureum*", con caratteri morfologici di colore rosso-violaceo. Importante anche il suo impiego come essenza da rimboschimento in zone pianeggianti e montane per l'uso artigianale del legno.

3.3.2 Acero campestre (*Acer campestre* L.)

All'interno di queste formazioni, di importanza più contenuta e a quote più basse, rispetto l'acero montano, è l'acero campestre; questo si sviluppa anche in altre formazioni secondarie del piano collinare e pianeggiante, misto al frassino ossifillo o all'orniello. L'acero campestre è un albero a distribuzione europeo-asiatica occidentale presente in tutte le regioni d'Italia. Cresce in boschi misti di latifoglie decidue, ai loro margini e nelle siepi miste. In passato era spesso utilizzato come tutore vivo per vigneti. Predilige di solito suoli calcarei, con ampia valenza ecologica, dal livello del mare alla fascia montana inferiore. È un albero caducifolia di modeste dimensioni: può raggiungere i 18-20 metri di altezza come massimo. Il fusto non è molto alto, con tronco spesso contorto e ramificato e chioma espansa, regolare ovoidale o rotondeggiante (Ferrari & Medici, 2008). Spesso ha anche caratteristiche di arbusto-cespuglio, alto pochi metri con ramificazioni e polimorfismo sin dalla base. La corteccia è bruno-chiaro, fessurata in placche rettangolari, con costolature in rilievo negli esemplari adulti. I rami sono sottili e pubescenti in giovane età. Le foglie sono semplici e opposte, a margine intero e ondulato, larghe circa 5-8 cm e lunghe 6-10 cm, a lamina espansa con 3 o 5 lobi ottusi e picciolate, di colore verde scuro nella pagina superiore e più chiaro in quella inferiore; ai margini delle nervature e nella pagina inferiore sono vellutate e lievemente tomentose. In autunno diventano gialle o rossastre

prima dell'abscissione. I fiori, unisessuali o ermafroditi, sono riuniti in infiorescenze erette a corimbo lunghe 6-8 cm, giallo-verdastri e piccoli, con calice e peduncolo pubescenti. Fiorisce all'inizio del periodo vegetativo contemporaneamente all'emissione delle foglie. I frutti sono disamare alate rossicce, portate orizzontalmente, lunghe 3-4 cm, cadono alla fine dell'estate (ALLEGATO 4).

Il legno è duro, compatto e omogeneo, ottimo per costruire attrezzi agricoli, piccoli oggetti e anche usato come combustibile (Ticli, 2004).

3.3.3 Acero riccio (*Acer platanoides* L.)

L'acero riccio è un albero di medie dimensioni, alto fino a 20 metri circa, con portamento espanso e chioma regolare-folta. In Europa è spontaneo ovunque, dai Pirenei fino agli Urali e al Caucaso, arrivando a nord fino ai limiti meridionali della Scandinavia. In Italia vegeta, piuttosto raro, sulle Alpi e sull'Appennino centro-settentrionale negli acero-frassineti collinari e submontani. Pianta ornamentale molto diffusa in parchi e giardini cittadini, perché resistente all'inquinamento atmosferico. Ecologicamente e morfologicamente è simile all'acero di monte. Il tronco è slanciato e diritto, ramificato nella parte medio - alta, con chioma ovale e rami che si allungano verso l'alto. La chioma è espansa, composta da foglie decidue lunghe fino a 10-15 cm, palmate a 5 lobi dentati, con punta arricciata, di spessore molto fine, glabre e di colore verde intenso. In autunno si colorano di giallo paglierino. Il picciolo è lungo fino a 6-9 cm, con sfumature colorate tendenti al rossastro, emette lattice quando reciso. Le gemme sono molto grandi, anch'esse con sfumature rossastre. La corteccia è liscia e grigia in età giovanile, si fessura longitudinalmente a maturità, ma non si sfalda in placche come nell'acero montano. Fiorisce prima della germogliazione con fiori giallo-verdastri, glabri, con 8 stami, riuniti in infiorescenze a corimbo. La fioritura inizia nel mese di aprile e si protrae fino a maggio. I frutti sono disamare peduncolate ad ali divergenti di 160°, larghe fino a 3-4 cm, maturano a settembre-ottobre (ALLEGATO 5).

L'acero riccio è una delle più importanti e diffuse piante ornamentali dei nostri centri cittadini e parchi, dove è presente con molte cultivar. Spesso è coltivato a scopo paesaggistico e ornamentale grazie all'effetto decorativo ed elegante del suo fogliame e portamento (Ferrari & Medici, 2008).

Il legno è duro e pesante, di grana fine e colore bianco o grigiastro; è utilizzato in lavori di tornitura e falegnameria (Ticli, 2004). Un tempo era ricercato anche in liuteria per la produzione di archi (Scortegagna, 2007).

3.3.4 Frassino maggiore (*Fraxinus excelsior* L.)

Albero di prima grandezza della famiglia *Oleaceae*. Esso ha un areale europeo - caucasico dal livello del mare fino alla fascia montana inferiore, con optimum nella fascia esalpica. L'areale del frassino si estende a ovest fino alle coste atlantiche, a nord raggiunge la Scozia, la Danimarca fino alle regioni meridionali di Svezia e Norvegia; a nord-est occupa le regioni Baltiche, la Polonia e la Russia fino ai Monti Urali (Bernetti, 1995; Gellini e Grossoni, 1997). A sud occupa la parte atlantica della Penisola Iberica, le Alpi e l'Appennino settentrionale e tutta la Penisola Balcanica. Nel limite meridionale e altitudinale del suo areale, è sostituito dal più termofilo frassino ossifillo. In Italia è molto comune sulle Alpi e Prealpi, collocandosi nella fascia collinare e montana della regione esalpica e mesalpica. Esso caratterizza i boschi alluvionali umidi, quelli di fondovalle su suoli colluviali e freschi e nelle forre spesso associandoci in acero-frassineto (Del Favero, 2004). E' una specie tollerante l'ombra in giovane età, più eliofila raggiunta la maturità. E' molto resistente alle basse temperature in dormienza, ma tollera poco le gelate tardive. L'acqua è il suo fattore limitante, ne consuma molta per la sua velocità di crescita e l'evapotraspirazione (porosità anulare dei vasi). A differenza dell'acero sopporta la sommersione delle radici per un tempo prolungato.

3.3.5 Tigli (*Tilia cordata* Mill., *Tilia platyphyllos* Scop.)

Negli aceri-frassineti vi può essere la presenza anche del tiglio, più o meno abbondante. Il tiglio è un albero della famiglia delle *Malvaceae* di prima grandezza, alto fino 40 metri e molto longevo. Il tiglio selvatico (*Tilia cordata* Mill.) tollera maggiormente l'ombra, mentre quello nostrale (*Tilia platyphyllos* Scop.) è mesofilo alla luce. Si sviluppa per lo più misto negli aceri-frassineti e nelle faggete, mentre sono osservabili raramente boschi puri. Esso vive preferibilmente nei terreni freschi e profondi a reazione neutra o sub-alcalina, prediligendo anche quelli nettamente alcalini, ma ben drenati e con scheletro grossolano. Rifugge invece i terreni acidi a matrice silicatica (Del Favero, 2004).

3.4. Principali avversità degli acero-frassineti

La quota rappresenta un limite altitudinale alla diffusione del frassino -poiché le gelate tardive possono determinare la morte dei semenzali o possono danneggiare la gemma apicale, determinando la presenza di numerosi individui biforcati già a pochi metri d'altezza (Del Favero, 2004). L'acero di monte invece si dimostra più plastico nei confronti di gelate, apporto idrico, acidità del suolo e contenuto di azoto, ma non sopporta la sommersione dell'apparato radicale per periodi prolungati (più di otto giorni circa). Notevoli possono essere i danni, anche nel caso di piante adulte, legati a fenomeni di gelicidio o di abbondanti nevicate (Del Favero, 2004, Alberti et al., 2016).

Gli acero-frassineti possiedono alcune problematiche dal punto di vista fitosanitario, dovute sia ad opera di insetti e animali sia di patogeni fungini. Inoltre, lo sviluppo della rinnovazione è spesso influenzato dalla predazione dei germogli da parte di erbivori, come il cervo e il capriolo, o da danni meccanici alle radici o al colletto, da parte del cinghiale e della lepre.

3.4.1 Avversità del frassino

Per quanto riguarda le principali avversità fito-sanitarie del frassino, danni alle gemme vegetative sono causati dall'acaro *Aceria fraxinivora* Nalepa (Anthony et al., 1983; 1988), che induce la produzione di galle vistose. Nei boschi mesofili e mesotermofili del Friuli Venezia Giulia è comune uno scoltide, il *Leperisinus varius* Fabricius, che può essere estremamente dannoso nel caso di indebolimento vegetativo delle piante, a seguito di periodi di siccità o in stazioni con suoli asciutti e permeabili (Stergulc e Frigimelica, 1996). Altri insetti dannosi per il frassino sono:

- il *Prociphilus fraxini* Fabricius o afide dei nidi di foglie, che causa vistose deformazioni con caratteristici nidi di foglie, all'interno dei quali sono visibili gli afidi di colore grigio rosato (Stergulc e Frigimelica, 1996; Masutti, 2003);

- il ciono del frassino o *Stereònychus fraxini* De Geer, curculionide defogliatore dei giovani rametti, responsabile della diminuzione della quantità di seme;

- la *Tinea curtisella* Don: un micro lepidottero le cui larve della prima generazione possono devastare le foglie, mentre quelle della seconda generazione svernano nelle gemme terminali, provocando deformazioni ai fusti, che si atrofizzano e biforcano (Thill, 1970).

- Cocciniglie possono infestare rami e vegetazione (ad. es. *Chionaspis salicis* L., *Eulecanium* spp., *Pulvinaria* spp.).

Altra malattia a cui è soggetto il frassino è la batteriosi causata da *Pseudomonas savastanoi pv fraxini* (Smith) Janse, che porta alla formazione di tumori irregolari molto evidenti e simili a cancri. Le lesioni della batteriosi possono seriamente compromettere la qualità tecnologica del legname e a volte la stabilità della pianta stessa (Lupieri, 2004). La malattia si manifesta con protuberanze sul fusto o sui rami, che aumentano progressivamente di volume. I tumori che ne derivano sono caratterizzati dalla presenza di scuri ammassi tissutali anomali e di consistenza spugnosa, che continuano a espandersi di anno in anno durante la stagione vegetativa (Stergulc e Frigimelica, 1996). Le formazioni tumorali della batteriosi non vanno, tuttavia, confuse con i cancri causati dal genere *Neonectria*. Nei cancri da *Neonectria*, infatti i cerchioni cicatriziali sono disposti più regolarmente rispetto ai tumori di *Pseudomonas* (Stergulc e Frigimelica, 1996). I primi sintomi sono le necrosi settoriali che originano cancri. Nel caso in cui l'infezione colpisce tutta la circonferenza -uccidendo il cambio- la porzione distale dissecca, se la circonferenza è colpita parzialmente, il cancro continua invece a espandersi, portando alla progressiva deformazione dell'asse della branca. La malattia, particolarmente dannosa per la rinnovazione, può essere favorita da periodi umidi e dalle basse temperature (Moriondo, 2006). Il coleottero *Leperòsinus varius* Fabricius potrebbe avere un ruolo attivo nella diffusione dei due precedenti patogeni (Duflot, 1995).

Il frassino è spesso colpito anche da oidio causato dal fungo *Phyllactinia guttata* Wallr.) Lév. e da antracnosi (ad esempio *Cercospora* spp., *Mycosphaerella* spp.).

3.4.1a Disseccamento del frassino

Il disseccamento del frassino è una malattia causata dal fungo ascomicete *Chalara fraxinea* Kowalski forma anamorfa di *Hymenosyphus fraxineus* Baralet al., un organismo di origine asiatica. La malattia, presente dagli anni '90 in Europa centro-orientale, è stata associata per la prima volta nel 2006 al patogeno del genere *Chalara*. La rapida diffusione del patogeno e i gravi danni all'arboricoltura e ai popolamenti naturali hanno reso la malattia la più grave del genere *Fraxinus* (Floreancig, 2009), con disseccamento totale o parziale di decine di migliaia di ettari di frassino in Europa centro-orientale. Il problema è stato riscontrato in molti paesi dell'Europa centrale e settentrionale. Nel 2009 anche in Italia è stata scoperta la malattia, che si è diffusa, a partire dal confine orientale con la Slovenia, in Friuli Venezia Giulia (Floreancig, 2009). In ricerche e studi successivi la malattia è stata rilevata diffusamente in Veneto e

Trentino Alto Adige (Maresi, 2014; Gioing, Oliveira Longa, Dal Maso, Montecchio & Maresi, 2017). Il tasso di colonizzazione ed espansione di questo patogeno è stimato in 50-60 km l'anno (Luchi et al, 2012). *Chalara* attacca il frassino maggiore e frassino ossifillo (*Fraxinus angustifolia* Vahl, 1804). Può essere suscettibile anche l'orniello (*Fraxinus ornus* L.), ma in misura assai minore (Gioing et al., 2017). Il deperimento del frassino in Italia è stato accertato nel contesto urbano, in vivaio, in piantagioni pure e nei popolamenti forestali (Floreancig, 2009). La predisposizione alla malattia non sembra essere correlata ad altitudine, età o substrato pedologico; al contrario fattori genetici e climatici potrebbero avere un ruolo importante nella comprensione delle sue dinamiche (Kowalski & Holdenrieder, 2009). Sulla base di recenti studi, è verosimile supporre che siano maggiormente suscettibili all'infezione i frassini aduggiati o che crescono in condizioni di eccessiva densità, vicino a corsi d'acqua o in condizioni di alta umidità di aria e suolo (Cech, 2008; Ogris, 2008). Il fungo presenta una forma teleomorfa, che si riproduce sessualmente (*Hymenoscyphus fraxineus* Baral et al.) e una anamorfa (*Chalara fraxinea* Kowalski), nome con cui il fungo stesso in genere viene comunemente indicato. La forma teleomorfa produce ascospore nelle foglie della lettiera, tramite apotecii, formati durante l'estate sui piccioli delle foglie, cadute l'anno precedente. Queste sono trasportate dal vento e originano nuove infezioni sulle foglie verdi durante l'estate, a partire dalle quali il fungo invade i tessuti legnosi della pianta. Per quanto riguarda il processo d'infezione si hanno poche informazioni. Alcuni autori hanno ipotizzato una penetrazione, che avviene attraverso le foglie oppure tramite infezione diretta di rami (Kirisits et al., 2009), piccioli o gemme, ma non dalle radici (Kowalski e Holdenrieder, 2008). Altri autori (Jankovský et al., 2009) hanno supposto che gli afidi *Prociphilus bumeliae* Schrank e *Prociphilus fraxini* Fabricius, facilitando la penetrazione del patogeno nei tessuti di foglie e corteccia, possano svolgere un importante ruolo nella predisposizione del frassino alla malattia. Altri fattori che causano ferite sono la grandine e altri agenti di danno meccanico. Il fungo produce un tipico strato nero di pseudosclerozi sulla superficie dei piccioli e sverna al loro interno. La fecondazione avviene attraverso conidi, che sono prontamente prodotti nei piccioli in autunno con basse temperature. Nell'estate della seguente stagione vegetativa si sviluppano nuovi apotecii e inizia così un nuovo ciclo d'infezione. Il deperimento coinvolge alberi di tutte le età, in foresta e in vivaio, indipendentemente dalle caratteristiche stazionali e dai metodi di rinnovazione. I sintomi iniziali della malattia comprendono macchie necrotiche sui rachidi fogliari, che progressivamente si allargano

e aumentano di dimensione, senza emissione di essudati (Przybyl, 2002; Kowalski e Lukomska, 2005 in Kowalski, 2006). Sulla chioma dei frassini deperenti sono evidenti numerosi sintomi, distribuiti in modo locale o diffuso: avvizzimento fogliare precoce con perdita delle foglie prematura, necrosi fogliari, delle gemme e sulla corteccia dei rametti giovani e cancri attivi sui germogli, rami e fusto (Przybyl, 2002; Barklund, 2005; Cech, 2006; Kowalski e Lukomska, 2005 in Floreancig, 2009). Altri sintomi evidenti sono lo scolorimento nerastro delle foglie, il disseccamento dei fusti, getti e rami, la necrosi dei tessuti corticali a forma di diamante e lo scolorimento grigio-nerastro del legno, spesso esteso in direzione longitudinale, al di là delle aree necrotizzate visibili sulla corteccia. Abbondante è l'emissione di rami epicormici (Halmschager e Kirisits, 2008 in Floreancig, 2009). Sotto la corteccia, una fascia necrotica si estende frequentemente all'interno del tessuto xilematico (Halmschager e Kirisits, 2008). Gli esemplari giovani di frassino possono andare incontro a morte anche nel corso di una stagione vegetativa, mentre alberi più vecchi sono interessati da un processo cronico (Kowalski e Holdenrieder, 2008; Floreancig et al., 2010; Kirisits e Cech, 2010; Skovsgaard et al., 2010).

Studi recenti (Alves, Linaldeddu, Deidda, Scanu & Phillips, 2014; Elena, León, Abad-Campos, Armengol & Mateu-Andrès, 2016) e altri ancora in corso hanno messo alla luce una maggiore complessità per quanto riguarda il declino del frassino. La malattia, infatti, non sarebbe legata soltanto al fungo *Chalara fraxinea*, ma a un sistema complesso di più organismi e patogeni con predominanza del genere *Diplodia*.

3.4.2. Avversità dell'acero

Le avversità parassitarie di tipo animale per l'acero sono le gallerie scavate dalle larve dei rodilegno nel fusto, branche e rami (*Cossus cossus* L. e *Zeuzera pyrina* L.), le defogliazioni causate dalle larve di lepidotteri arctidi (*Hyphantria cunea* (Drury), limantridi (*Lymantria dispar* L. e *Euproctis chrysorrhoea* L.) e altri lepidotteri (ad es. *Operophtera brumata* L., *Acronicta aceris* L. e *Malacosoma neustria* L.). Danni alla vegetazione sono provocati anche dagli afidi (*Periphyllus acericola* Walker, *Chaitophorus* spp., ecc.), il rincote *Metcalfa pruinosa* Say, che infesta la vegetazione imbrattandola di melata, le cicaline che decolorano le foglie (*Empoasca* spp. e *Typhlocyba* spp.), l'acaro eriofide *Artacris macrorhynchus* Nalepa che produce galle fogliari e la cocciniglia *Eulecanium corni* Bouchè che infesta i rametti (Ferrari & Medici, 2008).

Le principali avversità fungine dell'acero sono dovute principalmente a patogeni agenti di cancro del genere *Neonectria* (*Neo. cinnabarina* Tode: Fr. Fries; *Neo. coccinea* (Pers.) Fr.), *Dichomera* spp., *Phomopsis pustulata* (Sacc.) Died e *Diplodina acerina* (Pass.) B. Sutton (Ferrari & Medici, 2008). Il cancro da *Neonectria* si manifesta come una lenta lesione sulle branche o sul fusto, che non cicatrizza, ma rimane sempre aperta a causa dell'attività fungina. Essa degrada il callo cicatriziale durante la stasi vegetativa della pianta. La presenza del cancro può limitare e far avvizzire il ramo colpito che, data la lenta attività del fungo, può continuare a vivere per molti anni ancora. In condizioni di normale flusso idrico, la presenza di grossi cancri sul fusto non ha effetti sulla vitalità della pianta, se non quando l'asse è totalmente circondato (Stergulc & Frigimelica, 1996). Caratteristica peculiare per l'identificazione del cancro del genere *Neonectria* è la presenza di periteci di colore rossastro/violacei sulla superficie della lesione cancerosa all'interno dei quali maturano le ascospore (Rossman *et al.* 1999). La diffusione nell'ambiente avviene sia mediante le ascospore prodotte nei periteci e sia tramite varie forme conidiche, appartenenti nella maggior parte dei casi ai generi *Tubercolaria*, *Fusarium* e *Cylindrocarpon* (Stergulc & Frigimelica, 1996). Le spore e i conidi sono diffusi nell'ambiente dagli agenti meteorici (vento e pioggia) e l'infezione può avvenire solo se è presente una ferita (potatura, esbosco, punture d'insetto, lesioni da grandine o gelo) (Stergulc & Frigimelica, 1996). Le diverse specie di *Neonectria* presentano attitudini simili, con una bassa virulenza e un'attitudine saprofitaria, che causa danni importanti soltanto a piante già deperenti. Gli attacchi di *Neonectria* sono più intensi quando si verificano condizioni debilitanti per l'ospite, come: diminuzioni della fertilità del soprassuolo, eccessiva o carente presenza di acqua nel terreno o gelate e grandinate ricorrenti (Stergulc & Frigimelica, 1996). Notevole importanza sull'acero hanno anche le tracheovorticiliosi, malattie sistemiche causate da funghi del genere *Verticillium* (*V. albo-atrum* Reinke et Berthold; *V. dahliae* Kleb.), che provocano avvizzimenti diffusi degli organi legnosi. La presenza di queste patologie sull'acero può presentare periodi di intensificazione del processo infettivo, dovuta a variazioni repentine climatiche, come periodi di prolungata siccità e alte temperature (Kowalski e Materniak, 2006).

L'acero viene inoltre colpito facilmente dall'antracnosi da *Rhytisma acerinum* Fr. Questo ascomicete induce la comparsa sulle foglie di diverse specie del genere *Acer* (*A. campestre*, *A. pseudoplatanus*, *A. platanoides*), di macchie necrotiche crostiformi di forma irregolare, che a partire da zone localizzate si espandono sulla superficie delle

foglie e si uniscono in macchie più grandi scure. Sezionando la foglia in corrispondenza delle macchie si può notare il fitto micelio di ife nerastre, che ha sostituito interamente il mesofillo, rimanendo coperto dalla sola cuticola. La forma anamorfa colpisce le foglie ancora sugli alberi, causandone rapidamente l'ingiallimento e la caduta. Sulle foglie cadute al suolo si sviluppa la forma teleomorfa, che dà luogo alla formazione di ascospore. Queste, nel successivo ciclo vegetativo (primavera) saranno trasportate dal vento sulla pagina inferiore delle nuove foglie, dove germineranno infiltrandosi nel tessuto fogliare e dando luogo allo sviluppo di una nuova infezione. L'antracnosi causa la perdita anticipata delle foglie dell'albero; se l'attacco è ripetuto per diversi anni consecutivi può debilitare le piante giovani (Stergulc & Frigimelica, 1996). Altri agenti di antracnosi su acero sono *Gloesporium apocryptum* Ellis & Everh, *Cylindrosporium platanoides* (Allesch.) Died., *Venturia acerina* Plakidas ex M.E. Barr, *Septoria aceris* (Lib.) Berk. & Broome e *Phyllosticta* spp. (Ferrari & Medici, 2008). Altra malattia delle foglie dell'acero è il mal bianco o oidio, causato da funghi ascomiceti del genere *Uncinula* (*U. aceris* D.C). I sintomi sono rappresentati dalla presenza di un velo bianco sulla pagina superiore delle foglie e dall'apparizione, a fine stagione, di fruttificazioni (apotecii) di colore scuro sulla pagina inferiore delle foglie.

Comuni si manifestano marciumi radicali fibrosi causati da *Armillaria* sp. e marciumi delle radici assorbenti causati da *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) G.W. Wilson e *P. cinnamoni* Rands (Ferrari & Medici, 2008).

Le carie aeree delle banche e del fusto sono molto ricorrenti negli individui adulti e sono causate da varie specie fungine xilovore (*Ganoderma* spp., *Fomes* spp., *Coriolus* spp., *Polyporus* spp., *Phellinus* spp.) (Ferrari & Medici, 2008).

3.4.2a Cancro dell'acero da *Eutypella parasitica* (ALLEGATO 10).

Il termine "cancro" in patologia forestale è utilizzato per indicare un sintomo, causato dalla morte di una definita e generalmente localizzata area della corteccia e del cambio di una branca o del fusto di un albero. Molti alberi sono suscettibili a uno o più agenti causali di cancro. Questi possono essere classificati in due categorie: non infettivi o abiotici, come il gelo o la bruciatura del sole, e infettivi o biotici come i batteri, i virus e i funghi. Molti cancri sono causati da funghi ascomiceti. I funghi che causano cancri sono principalmente opportunisti. Ossia non riescono autonomamente a invadere il tessuto dell'ospite, ma hanno bisogno di una ferita o un' area di stress, che "interrompa" la copertura corticale di difesa ed esponga il tessuto interno. Sono rare le specie di

funghi che riescono attivamente a penetrare dagli stomi o dalle lenticelle nel tessuto cambiale. Il meccanismo d'invasione del patogeno è ancora in parte sconosciuto, ma è provata la produzione, da parte di certi funghi, di tossine ed enzimi extracellulari, che uccidono il tessuto ospite facilitando l'avanzata del micelio. I cancri sono generalmente di tre tipi: annuali, perenni e diffusi (Blanchard & Tattar, 1981). Nei cancri perenni, tra i più diffusi in patologia forestale, il fungo vive perennemente all'interno dell'ospite, causandone raramente la morte; in questi casi la virulenza del patogeno è molto bassa, poiché esiste un equilibrio tra l'attività dell'ospite e quella del patogeno. Durante la stagione non vegetativa dell'ospite (autunno e inverno) il micelio del patogeno cresce attivamente e invade il legno, uccidendo parte del tessuto cambiale sottocorticale. Nella stagione vegetativa successiva l'ospite produce un nuovo callo di compartimentazione per tentare di fermare l'avanzata del micelio. Il fungo sopravvive saprofiticamente nel tessuto morto, fino alla stasi invernale dell'ospite, quando riprende la sua avanzata nel nuovo tessuto cicatriziale e nel tessuto cambiale adiacente. Il processo alternato di formazione e uccisione del callo si sussegue negli anni e fa assumere al cancro la caratteristica forma a bersaglio. Sebbene i cancri perenni raramente uccidano l'ospite, l'area della lesione rende il fusto o la branca colpita più suscettibile a rotture da vento (Blanchard & Tattar, 1981). *Eutypella parasitica* è un agente di cancro perenne dell'acero.

Il cancro dell'acero è stato scoperto nella regione dei Grandi Laghi nel 1935. Nel 1938, la malattia è stata associata per la prima volta al fungo ascomicete *Eutypella parasitica* R.W. Davidson & R.C. Lorenz. Il fungo è un organismo del Phylum Ascomycota e appartiene alla famiglia delle *Diatrypaceae*. *E. parasitica* è quindi considerato l'agente patogeno responsabile della malattia; il parassita è nativo del Nord America (ALLEGATO 10), negli Stati Uniti (Connecticut, Illinois, Indiana, Maine, Massachusetts, Michigan, Minnesota, New Hampshire, New York, Ohio, Pennsylvania, Vermont, Wisconsin) e in Canada (Ontario, Quebec), dove è piuttosto diffuso e causa estesi cancri su varie specie di acero, come l'acero da zucchero (*Acer saccharum* Marsch) e l'acero rosso (*Acer rubrum* L.) nelle foreste naturali, l'acero riccio (*Acer platanoides* L.) e occasionalmente su altre specie (*Acer negundo* L., *Acer saccharinum* L., *Acer pseudoplatanus* L., *Acer pensylvanicum* L.) in viali e parchi. (Kliejunas & Kuntz 1974).

In Europa (ALLEGATO 6) *E. parasitica* è stata scoperta per la prima volta in Slovenia, nel maggio 2005, vicino Ljubljana dal Servizio forestale sloveno (Jurc et al.

2006). La presenza in Slovenia è molto importante e distribuita omogeneamente nelle foreste del paese, in particolare nel centro e nell'est. Nel dicembre 2006, la malattia è stata accertata in Austria (Cech, 2007) e nel settembre 2007 in Croazia lungo il confine con la Slovenia (Ogris et al. 2008). Gli ospiti su cui *E. parasitica* è stata rinvenuta in Slovenia e Croazia sono l'acero di monte, l'acero campestre e più raramente l'acero di Norvegia (EPPO, 2008). Tra il 2013 e il 2015 la malattia è stata trovata anche in Germania, con numerosi casi in Baviera molto distanti dai focolai rilevati in Austria (Cech, 2016). Come in Slovenia e in Croazia, anche in Austria e Germania l'ospite preferenziale del fungo è l'acero di monte (*Acer pseudoplatanus* L.). Sono stati tuttavia scoperti tre nuovi ospiti per la specie fungina, *A. cappadocicum* Gled., *A. heldreichii* ssp. *Trautvetteri* Orph. ex Boiss e *A. hyrcanum* Fisch. & C.A.Mey. Nell'agosto 2015 alcuni cancri molto vecchi ed estesi, associati a *E. parasitica*, sono stati rinvenuti in Ungheria vicino al fiume Mura su quattro esemplari di *A. pseudoplatanus* (Jurc et al., 2016). In Slovenia e nella parte settentrionale adiacente della Croazia, la presenza del cancro da *Eutypella* è diffusa su vasta area (ALLEGATO 7) (Ogris et al. 2006, 2008, 2009), mentre in Austria sembra essere rara e limitata a pochi alberi o a qualche sito forestale (Cech, 2007). Nel settembre 2015 la specie è stata trovata per la prima volta in Repubblica Ceca (NNPO of Czech Republic, 2015) e nel 2017 in Polonia (Černý et al, 2017). La presenza di *E. parasitica* al confine tra la Repubblica Ceca e la Polonia è stata registrata in ben 35 località, ai piedi dei monti Beskyd in foreste naturali su una superficie che copre 400 km² (Černý et al, 2017).

Dopo la prima segnalazione in Slovenia, nel 2005, il patogeno *Eutypella parasitica* è stato inserito formalmente nell'EPPO Alert list. La sua cancellazione dalla lista è avvenuta nel 2008, perché il patogeno non è risultato pericoloso e letale per le piante. Resta tuttavia da considerare ancora l'impatto della sua diffusione e la sua patogenicità.

E. parasitica è un patogeno da ferita, necessita cioè di un'interruzione del tessuto corticale per penetrare all'interno del tessuto vivo di cui si nutre. Generalmente negli ambienti naturali queste aperture sono causate da rotture di rami o branche, oppure da ferite meccaniche, come i danni da neve e ghiaccio, scottature del sole, cretti da gelo e morsi di roditori. Nei centri urbani e parchi, invece, le potature errate possono portare a una maggior suscettibilità delle piante all'infezione di *E. parasitica* (Kessler & Hadfield, 1972). In Slovenia sud-occidentale e nelle valli del Natisone le ferite possono verificarsi facilmente in seguito ai periodici ed intensi fenomeni di gelicidio, come quello avvenuto nel febbraio 2014. Spesso, specie su acero campestre, l'infezione da

Eutypella parasitica è evidente in prossimità di un'antica branca, anche a qualche metro di altezza. Su acero di monte è molto frequente al colletto. Il ciclo biologico (ALLEGATO 9) inizia tramite spore prodotte sulla corteccia di alberi infetti in corpi fruttiferi scuri tondeggianti (periteci). Le spore sono rilasciate dai periteci nell'aria durante e immediatamente dopo le precipitazioni. Non c'è alcuna relazione, tuttavia, tra la quantità di pioggia e l'intensità di rilascio delle spore; l'elevata umidità e le variazioni di temperatura estiva non sembrano influenzare il processo (Lachance, 1971). Negli studi di laboratorio condotti da Lachance, il rilascio delle spore dai grappoli, bagnati di periteci su campioni di corteccia messi in camera umida, era abbondante a 20°C, leggero a 12°C e nullo a 4°C. Sebbene la temperatura vicina al congelamento abbia inibito la scarica delle ascospore, l'esposizione al caldo dei periteci, precedentemente congelati, ha indotto rapidamente il rilascio delle spore. La germinazione è rapida su substrato agar, specie a temperature superiori a 20°C (a temperature inferiori cala drasticamente). Per quanto riguarda la durata delle spore questa è molto buona, se attuata a 4°C con bassa umidità, cala invece drasticamente a temperature di 20°C.

Da inoculazioni artificiali è emerso che il fungo invade preferibilmente il cambio e il floema dell'ospite, con la penetrazione da parte delle ife anche dell'alburno. La maggior direzione verticale di crescita suggerisce che l'invasione del floema è preferenziale (Blanchard & Tattar, 1981).

I sintomi iniziali della malattia sono la formazione di un callo attorno al punto d'infezione, che avviene in genere nella parte bassa del fusto, sotto i 3-4 metri di altezza dal terreno (ALLEGATO 11) (Blanchard & Tattar, 1981). La corteccia, in genere, rimane attaccata alla superficie del cancro. L'uccisione del tessuto cambiale, da parte del fungo, produce un'area depressa al centro della lesione, che con il passare del tempo e la crescita dell'infezione si espande concentricamente e preferibilmente in direzione verticale (Kessler & Hadfield, 1972; Blanchard & Tattar, 1981). Nei cancri più vecchi si notano delle cerchie concentriche, dovute alla produzione annuale di callo di compartimentazione da parte della pianta. Il callo viene poi ucciso dal fungo durante il periodo di stasi vegetativa e con l'alternanza del processo annuale il cancro assume la tipica forma a bersaglio (ALLEGATO 12). Gli alberi con cancri molto vecchi hanno la caratteristica distorsione, come risultato della crescita anomala dell'albero in risposta all'invasione del fungo, con un'alterazione del fusto e delle proprietà tecnologiche del legno. Negli anni, infatti, i cancri prendono una forma caratteristica a gobba, risultante

della reazione della pianta all'invasione del fungo. Viste da dietro, le aree a gobba spesso assomigliano al capo di un cobra, che sta per colpire (Kessler & Hadfield, 1972).

Negli individui più forti è frequente la formazione di rami epicormici sotto la lesione cancerosa, specie se questa interessa gran parte della circonferenza del fusto (ALLEGATO 13D-13E). La lesione cancerosa in genere segue la linea di contorno della ferita preesistente. L'avanzata del patogeno è comunque molto lenta ed è calcolata essere di circa 3 cm annui; cancri di diametro o lunghezza intorno al metro hanno un'età stimabile in almeno 30 anni (Jurc et al., 2016).

Asportando il tessuto corticale, che copre i cancri e le pieghe del callo di chiusura (fronte di sviluppo del patogeno), tra la zona morta uccisa dal fungo e la zona ancora viva, sono molto evidenti le strutture a ventaglio di micelio fungino di colore da bianco-giallastro a marroncino (ALLEGATO 14). La presenza del micelio sottocorticale è caratteristica per il riconoscimento della specie; nel cancro da *Neonectria* sp., infatti, simile a questo, non è presente il fitto ventaglio d'ife al margine della lesione e la riproduzione avviene asessualmente con la formazione di due tipologie di conidi in sporodochi biancastri, lungo il fronte d'avanzata del patogeno. I conidi di *Neonectria* sono poi diffusi dal vento o dall'acqua della pioggia. I periteci di colore rosso-scuro sono prodotti l'anno successivo in uno stroma, sempre al margine della lesione cancerosa, e diffondono le ascospore nell'ambiente grazie al vento. Il cancro causato dagli ascomiceti del genere *Neonectria* è, inoltre, più chiuso ai bordi, per maggior produzione di callo da chiusura da parte dell'ospite (Blanchard & Tattar, 1981).

Altro sintomo specifico della presenza di *E. parasitica* è la produzione, nel centro dei cancri vecchi, di numerosi periteci in abbondante stroma scuro. I corpi fruttiferi, con un collo lungo fino a 5 mm, si sviluppano nella zona centrale del cancro a partire da un tessuto stromatico fungino sulla superficie necrotizzata, in genere dopo 6-8 anni dall'infezione (U.S. Department of agriculture forest service, 1979; Blanchard & Tattar, 1981). Le ascospore prodotte nei periteci (8 per ogni asco) sono incolori e leggermente curve e costituiscono la causa maggiore di diffusione del patogeno. Le ascospore misurano circa $8.5 (5.5-12) \times 3 (2-4) \mu\text{m}$ mentre gli aschi $85.5 (61-117) \times 7.5(5-10) \mu\text{m}$ (Jurc et al. 2006) (ALLEGATO 16).

La fuoriuscita delle ascospore dai periteci è dovuta alla pressione meccanica. Essa sembra essere innescata soprattutto dalle precipitazioni e in misura minore dall'umidità e dalla temperatura dell'aria esterna (Blanchard & Tattar, 1981). La produzione e la diffusione delle ascospore hanno il loro optimum tra i 24 e i 28 °C (Johnson & Kuntz,

1979; Lachance, 1971). I test di laboratorio mostrano che non avviene la diffusione delle ascospore sotto i 4 °C e sopra i 36°C. Lo stesso range di temperatura caratterizza anche la germinazione delle spore. Anche la pioggia è fondamentale per indurre il rilascio delle ascospore; almeno 3 mm di pioggia devono penetrare nella chioma degli alberi per provocare il rilascio delle spore (Johnson & Kuntz, 1979; Lachance, 1971). Non è sufficiente avere un tasso elevato di umidità dell'aria. Isolando il fungo in coltura pura incubato a 25°C emerge un denso micelio biancastro. Carattere per riconoscere la specie è la produzione, dopo qualche settimana d'incubazione sulle cellule conidiofore (fialidi), di grandi quantità di cellule riproduttive asessuate o conidi di forma allungata, snelle e fortemente curve larghe da 1,3 a 1,8 µm e lunghe da 25 a 32 µm (U.S. Department of agriculture forest service, 1979). Lo stato asessuale del fungo non è molto importante nel ciclo biologico del patogeno, ma è fondamentale nel riconoscimento (ALLEGATO 17).

In America l'incidenza di *Eutypella parasitica* e la frequenza dei cancri negli aceri è generalmente bassa intorno al 2/20% degli aceri da zucchero in una stazione con locali infezioni più gravi anche del 60% (U.S. Department of agriculture forest service, 1979). La malattia colpisce preferibilmente piccoli alberi, ma occasionalmente è possibile individuare cancri molto vecchi su piante più grandi e mature. Il decorso della malattia è molto lento e non è quasi mai letale per le piante mature, ma può esserlo invece per quelle di piccolo diametro (7-13 cm o meno), dove il flusso della linfa può essere interrotto all'avanzare della malattia, con il disseccamento della porzione distale al cancro, a due anni dall'infezione. Piante molto grandi possono sopravvivere per molti anni, con grossi cancri, che raggiungono anche decine di centimetri in lunghezza fino ad arrivare ad un metro e mezzo (Blanchard & Tattar, 1981). La maggior parte degli alberi infetti presenta un solo cancro al tronco, ma è possibile trovare anche più cancri sullo stesso individuo (Kessler & Hadfield, 1972). La presenza di grossi cancri perenni su piante adulte limita la produzione e la qualità del legno ed è un elemento di debolezza, che aumenta la possibilità di schianto da vento o da neve, dovuto al troncamento del fusto (ALLEGATO 13). La perdita economica in genere riguarda soltanto i singoli esemplari, poiché la diffusione della malattia non è molto impattante nei popolamenti di acero (Blanchard & Tattar, 1981). La presenza del cancro da *Eutypella* può favorire l'ingresso nel fusto di altri organismi fungini come gli agenti di carie (Kliejunas & Kuntz, 1974).

Ogris & Jurc nel 2006 nella pubblicazione “Spread risk of *Eutypella* canker of maple in Europe” hanno presentato un modello per ipotizzare il rischio di diffusione di *E. parasitica* in Europa. Questo modello incorpora gli effetti della variabilità spaziale e temporale della suscettibilità dell’ospite, della riproduzione del patogeno e della trasmissione dello stesso, con particolare riferimento alla distribuzione delle specie ospiti e all’idoneità del clima. Le mappe della distribuzione delle specie ospite e le condizioni meteorologiche mensili sono state analizzate spazialmente su un sistema informativo geografico, sfruttando l’entità e la direzione dell’effetto di ciascuna variabile sulla diffusione della malattia. Il modello è stato calibrato utilizzando i dati sulla distribuzione naturale del cancro di *Eutypella* in America settentrionale. Le previsioni del rischio di diffusione sono state calcolate per ogni mese e raggruppate per generare una mappa di rischio cumulativa (ALLEGATO 8). I risultati fanno emergere quattro aree di rischio per la diffusione della patologia sul continente europeo: rischio molto elevato, elevato, moderato e basso.

L’area di maggior rischio è quella dove la presenza di *E. parasitica* è già stata accertata e le zone limitrofe dove la distribuzione dell’acero potrebbe essere favorevole a una rapida diffusione del patogeno, per le condizioni climatiche di temperatura e piovosità adatte a *E. parasitica*. Anche l’Italia, in particolare le Prealpi e l’Appennino, dove è diffusa la presenza dell’acero, è zona ad alto rischio (>42%). Le aree meno a rischio sono quelle dove l’acero è meno diffuso e le condizioni climatiche sono più sfavorevoli alla diffusione del patogeno.

4. SCOPO DEL LAVORO

La finalità del lavoro di tesi è stato il monitoraggio della presenza di *Eutypella parasitica* in acero-frassineti nel territorio italiano, lungo il confine tra Friuli Venezia Giulia e Slovenia, noti i rinvenimenti in Slovenia (Jurc & Ogris, 2005; Ogris & Jurc, 2007), Austria (Cech, 2006; Cech et al., 2016), Croazia (Ogris et al., 2008; Ivic, Sever & Tomic, 2017), Germania (Cech et al., 2016) e Ungheria (Jurc et al., 2016).

A un monitoraggio di campo è seguita un'indagine di laboratorio per confermare la diagnosi e l'identificazione del parassita al fine di comparare geneticamente le popolazioni italiane con quelle isolate nel resto d'Europa e valutare le possibili dinamiche di espansione della malattia verso ovest.

5. MATERIALI E METODI

Il primo passo della ricerca è stato un attento lavoro di studio della malattia, con la lettura delle precedenti pubblicazioni e delle ricerche del patogeno, eseguite sia negli Stati Uniti e sia in Europa, disponibili in bibliografia e nella biblioteca ad Agripolis.

Il giorno 14 dicembre 2016 insieme al Prof. Lucio Montecchio del Dipartimento TeSAF dell'Università degli Studi di Padova e al Prof. Dušan Jurc del Dipartimento di Protezione delle Foreste di Lubiana (Gozdarski Institut Slovenije) è stata effettuata un'attività di training in Slovenia occidentale nella zona del monte Korada. Durante l'uscita è stato possibile riconoscere e identificare i sintomi della malattia, con l'osservazione dei cancri da *Eutypella* e il confronto con quelli causati da *Neonectria*. È stata inoltre illustrata la procedura da effettuare per un efficace campionamento di tessuto dai cancri stessi. Durante la giornata sono state descritte le caratteristiche principali di questa malattia e la storia delle ricerche effettuate in Slovenia ed Europa su *E. parasitica*. In questo training in Slovenia sono stati prelevati campioni di tessuto da un acero di monte (46° 3'45.63"N, 13°33'45.05"E) e un acero campestre (46° 3'44.78"N, 13°33'45.06"E). I campioni sono stati portati ai laboratori di Patologia forestale del TeSAF dell'Università degli Studi di Padova, per l'isolamento in coltura pura su Potato destrosio agar (PDA). Le colonie sono rimaste circa 15 giorni in un termostato a 25°C, per sviluppare la produzione del micelio e dei conidi. In seguito, come ulteriore attività conoscitiva, le colonie fungine pure sono state osservate al microscopio, per imparare a riconoscere la morfologia del micelio e delle strutture riproduttive asessuali (conidi falciformi), caratteri peculiari della specie per una rapida identificazione.

5.1. Indagine di campo

L'attività di campo, che ha compreso la ricerca di piante asintomatiche, l'osservazione dei sintomi specifici e il campionamento è stata effettuata durante la primavera, l'estate e l'autunno 2017.

L'area di ricerca è stata piuttosto vasta e irregolare, situata completamente nella parte orientale della regione Friuli Venezia Giulia, compresa su una superficie di circa 750 km² e lungo 80 km del confine di stato, dal comune di Gorizia a quello di Taipana (ALLEGATO 18). Ricerche puntuali sono state effettuate anche più a nord nei comuni di Resia e di Tarvisio.

L'attività di monitoraggio è partita nei pressi del confine con la Slovenia, lungo le principali arterie stradali, su alcuni sentieri escursionistici e nei parchi e viali dei principali centri abitati. La quota è stata molto variabile, da circa 50 mslm delle zone più a sud fino a 1400 m circa sui rilievi montuosi più elevati. Dalle aree più vicine al confine l'attività di monitoraggio si è espansa verso ovest (per uno sviluppo massimo di circa 35km), nei centri abitati e seguendo la distribuzione territoriale dei popolamenti in cui è presente l'acero. La ricerca ha interessato il territorio di due province italiane: Udine e Gorizia.

Non conoscendo la reale presenza e distribuzione della malattia nel territorio considerato e non essendoci una continuità affermata tra le aree popolate ad acero, non è stato possibile definire un reticolo geografico ordinato di campionamento e un numero di campioni minimo necessario allo studio. La ricerca è iniziata dalle aree boschive italiane limitrofe alla presenza del patogeno in Slovenia e dalle alberature cittadine della città di Gorizia. In quest'area il monitoraggio è stato svolto nella seconda metà di aprile 2017 su tutte le alberature stradali e di aree verdi della città di Gorizia, controllando accuratamente, con metodo puntuale albero per albero. Lo studio si è concentrato inizialmente sulla città di Gorizia, perché si trova al confine con la Slovenia (area di focolaio) e non presenta ostacoli montuosi importanti alla direzione del vento prevalente, che proviene dalla valle del Vipacco. Inoltre, a poche centinaia di metri dal confine con l'Italia, a Nova Gorica (nella via "Ulica Gradnukove brigade") è stata accertata dalle ricerche slovene la presenza di un *Acer platanoides* positivo a *E. parasitica*. Successivamente il monitoraggio si è spostato nelle Valli del Friuli Orientale, ad est di Cividale del Friuli, nei territori dei comuni di Drenchia, Stregna, Prepotto, Grimacco, San Leonardo, San Pietro al Natisone, Savogna, Pulfero, Taipana, Lusevera, Nimis, Tarcento e Cividale, dove è diffusa la presenza di acero-frassineti. In questa area la ricerca è stata condotta da metà del mese di aprile 2017 ad agosto 2017 e nel mese di ottobre e di novembre 2017. L'individuazione delle aree boschive con abbondante presenza di acero nel Friuli Orientale è stata effettuata grazie allo studio di Alberti et al. del 2016 "Linee guida per la gestione selvicolturale di boschi misti di acero e frassino di origine secondaria: aspetti economici, selvicolturali e tecnologici".

Lo studio descrive dettagliatamente l'abbondante presenza di questi popolamenti nelle Valli dello Judrio, del Natisone e del Torre. La carta regionale del Friuli Venezia Giulia delle tipologie forestali, elaborata con il sistema informativo geografico QGIS, e i dati scaricati dal sito della regione evidenziano la distribuzione degli aceri-frassineti

nel territorio, con una maggior frequenza lungo la fascia orientale friulana, in particolare sulle Prealpi Giulie (ALLEGATO 1A). La ricerca di *Eutypella parasitica* si è sviluppata a partire da questa mappa GIS e da una carta topografica escursionistica 1:25000 per evidenziare le arterie stradali principali e secondarie, nonché i sentieri escursionistici.

Il territorio di studio presenta un'orografia piuttosto accidentata, con l'alternanza di profonde valli dai pendii molto inclinati, forre ed aspre elevazioni montuose. La morfologia del territorio è data dalla presenza ancora in atto di una forte dinamica tettonica di sovrascorrimento tra rocce flyshoidi più giovani e rocce carbonatiche più antiche e da un clima fresco e molto piovoso (1500/2500 mm annui). La forte piovosità dell'area determina la dinamica e l'erosione ancora in atto di queste valli, caratterizzate da strette forre, salti di roccia, cascate e ripidi pendii. I venti dominanti nella zona soffiano da E-NE con tendenza ai quadranti meridionali nei giorni di pioggia.

Il monitoraggio fitosanitario è stato attuato sia mediante metodo speditivo lungo le principali arterie stradali sia con campionamento puntuale in parchi o località precise, osservando ogni albero. Il monitoraggio fitosanitario è una procedura condotta in un tempo ben definito, per determinare la presenza di uno o più patogeni e valutare la diffusione, la gravità e l'evoluzione di una determinata malattia. A seconda della modalità di campionamento è possibile effettuare diversi tipi di monitoraggio: speditivo, per aree di saggio e per aree permanenti. A causa della difficoltà di movimento in aree impervie e della mancata conoscenza sull'effettiva presenza e distribuzione della malattia, è stato stabilito a priori di effettuare un monitoraggio speditivo lungo le vie di comunicazione principali, per individuare facilmente eventuali focolai, dove ricercare più approfonditamente alberi sintomatici. Individuato un possibile focolaio si è proceduto tramite un controllo visivo e tramite il rilievo fitosanitario dei sintomi (cancro del fusto) e dei segni del patogeno (micelio sottocorticale e presenza di corpi fruttiferi). Dalla prima pianta individuata la ricerca si è espansa alle piante limitrofe in un raggio di circa 200-300m. Come detto in precedenza, non conoscendo l'effettiva distribuzione della malattia, non è stato possibile definire a priori un numero di campioni rappresentativo e un'area di studio precisa.

Durante la ricerca in aree urbane, invece, sono stati percorsi tutti i viali e i parchi popolati ad acero, verificando la presenza dei sintomi su ogni albero. La ricerca in aree urbane ha interessato la città di Gorizia e i paesi limitrofi, Cormons, Cividale del Friuli e più speditamente il centro urbano di Udine. Per la città di Gorizia è risultato molto

utile consultare il libro “Alberi a Gorizia” (Guzzon, 1996), per verificare la presenza dell’acero nelle alberature della città.

I campioni sono stati raccolti da piante con cancri, asportando la corteccia al confine tra la parte necrotica e quella ancora vitalizzata del tessuto dell’ospite, ove è effettivamente presente il micelio bianco-giallastro (ALLEGATO 14), e prendendo porzioni di tessuto infetto. Il prelievo del campione è stato compiuto inizialmente utilizzando un coltello, un martello e uno scalpello piatto, e successivamente sperimentando l’uso di uno scalpello a taglio circolare. Tale scelta è stata effettuata in seguito sia per testare lo strumento e sia per cercare di limitare i danni meccanici alle piante, dovuti allo scortecciamento della lesione. Gli strumenti sono stati opportunamente puliti e disinfettati con alcool o tramite il fuoco a ogni utilizzo su piante diverse, per non contaminare i campioni raccolti e diffondere il patogeno su altri alberi sani. I tessuti prelevati sono stati riposti in sacchetti di plastica, umidificati con un dischetto di cotone non imbibito e opportunamente sigillati e contrassegnati con la data e la località di prelievo. Ogni campione è stato geolocalizzato con le coordinate GPS tramite Google Maps sul cellulare. I campioni sono stati poi conservati in frigo a 4°C in attesa delle operazioni di laboratorio.

La stima dell’incidenza e frequenza della malattia è stata calcolata nelle due aree focolaio di Gorizia (loc. Peuma) e Cormons (loc. Plessiva), tramite il conteggio approssimativo degli alberi di acero, presenti in un raggio di 200-300 m dalle piante infette, comprese nel calcolo. Nel primo caso, gli aceri all’interno dell’area considerata sono risultati essere 132. Nel secondo caso, invece, gli alberi di acero sono risultati 109. Nel conteggio sono stati considerati come individui anche i singoli polloni delle ceppaie. La stima è stata effettuata rapportando il numero di piante sintomatiche con il numero di piante totali esaminate. Nel comune di Drenchia e in quello di Prepotto non è stato possibile stimare il numero di individui di acero a causa della modalità di monitoraggio speditivo e dell’orografia molto accidentata.

In un secondo momento, in data 13/05/2018, è stata effettuata una seconda campagna di campionamento su alcune delle piante con cancri già precedentemente analizzati, dove era certa la presenza di *Eutypella parasitica* da identificazione molecolare. Questo secondo campionamento è stato eseguito per verificare la presenza di altri patogeni, oltre *E. parasitica*, sulla lesione cancerosa. Il prelievo di tessuto è stato eseguito sul margine della lesione necrotica più in profondità (ALLEGATO 14B-14C) e non dalla zona superficiale, dove è evidente il micelio biancastro di *E. parasitica*.

5.2 Indagine di laboratorio

5.2.1. Isolamento in coltura pura

I campioni raccolti sono stati conservati in frigo a 4° al fine di non alterare le caratteristiche e la qualità degli stessi con la formazione di muffe, batteri o funghi saprofitici. I giorni seguenti i campioni sono stati trasportati ai laboratori di Patologia forestale del TeSAF dell'Università degli Studi di Padova a Legnaro per l'isolamento. Un'attenta analisi visiva di ognuno dei campioni in laboratorio ha permesso di evidenziare la loro buona conservazione in vista dell'isolamento delle colonie pure a partire dagli stessi.

Il passo successivo è stato quello di preparare il substrato di coltura; per ogni campione sono state previste 5 capsule Petri da 90mm contenenti PDA (Potato dextrose agar, DIFCO™), un substrato zuccherino utilizzato per l'isolamento, la coltura e il conteggio di specie fungine in Petri. La preparazione di questo substrato di coltura prevede la sospensione, in una beuta da 2 litri, di 39,0 g di polvere PDA in 1 litro di acqua deionizzata e il mescolamento tramite agitatore magnetico. Nel passo successivo la beuta, contenente il preparato ben mescolato, è stata messa in autoclave a 120 ± 1 °C per 15 minuti. Dopo l'ulteriore tempo di sfiato della pressione dell'autoclave, di circa 60 minuti, la beuta è stata lentamente raffreddata fino a circa 40/45°C. Raggiunta la temperatura ottimale sono stati aggiunti 5ml/l di Streptomicina, un antibiotico batteriostatico, che rallenta o blocca l'attività batterica all'interno della Petri, permettendo così la crescita indisturbata della colonia fungina. L'operazione si è conclusa con la distribuzione, tramite pescante e siringa da 20 ml, di 10 ml del composto, in ciascuna Petri, sotto la cappa a flusso laminare verticale. Alla fine dell'operazione le Petri sterili sono state lasciate raffreddare e solidificare. Avvolte nel nylon in gruppi di 10, sono state riposte in frigorifero dove è avvenuta la loro conservazione in attesa dell'utilizzo.

L'operazione seguente, di isolamento dei campioni nelle piastre da 90 mm, ha avuto luogo in seguito: o sotto la cappa laminare a flusso orizzontale oppure sotto quella a flusso verticale. L'operazione ha previsto, con l'aiuto di un microscopio stereoscopico, il distacco di frammenti di micelio dai campioni di tessuto, con delle pinzette e delle anse, sterilizzate sotto fiamma a ogni prelievo. Sono stati inseriti all'interno di 5 petri, per ogni campione, 4-5 frammenti di micelio staccati dal tessuto di campo. Il numero di Petri, previsto per ogni campione, è stato scelto in virtù della previsione che, in un

primo isolamento da materiale di campo, la probabilità di avere la crescita di altri funghi indesiderati sarebbe stata molto alta.

I campioni raccolti in campo, prima di un'eventuale eliminazione, sono stati conservati in cella frigorifera per qualche settimana, in attesa dell'esito dell'isolamento appena effettuato.

Le piastre Petri, preparate con i campioni di tessuto, sono state mantenute costantemente a una temperatura di 21 ± 1 °C e monitorate giornalmente nelle settimane seguenti, al fine di osservare e controllare la comparsa del micelio desiderato e poi di trasferirlo in una fase successiva in coltura pura. Un attento monitoraggio visivo di ciascuna Petri ha permesso di valutare, nel caso della presenza di funghi indesiderati a crescita più veloce, se procedere subito al trapianto del micelio in una nuova piastra oppure alla loro eliminazione.

La fase successiva ha previsto il trapianto del micelio cresciuto in nuove piastre Petri da 60 mm su PDA, per ottenere la colonia pura. Anche queste Petri sono state poste a 21 ± 1 °C in cella termostata e controllate giornalmente, al fine di verificare la crescita del micelio. Trascorsi circa 20-25 giorni è stato possibile osservare un buono sviluppo del micelio fungino e in qualche piastra anche la produzione di conidi. Il micelio e le strutture riproduttive sono stati osservati al microscopio ottico, per riconoscere le strutture anatomiche del fungo *Eutypella parasitica* e quindi confermare la diagnosi.

Le riprese successive sono state incubate a 25 ± 1 °C, per verificare un'accelerazione nella crescita del micelio, della produzione di conidi e per ridurre il deposito di condensa interno alla Petri. Johnson & Kuntz (1977) affermano che la produzione di conidi è più rapida in condizioni di crescita con la luce (16 giorni a 28°C). Le colonie pure sono state trapiantate su nuovo substrato sempre in Petri da 60mm ogni circa 2-3 mesi, per una migliore conservazione delle stesse.

5.2.2. Identificazione degli isolati

Tutte le colonie fungine ottenute nel corso delle indagini sono state identificate su base genetica attraverso l'analisi delle sequenze nucleotidiche dell'intera regione degli spaziatori interni trascritti (ITS1 e ITS2), incluso il gene 5.8S del rDNA e una porzione del gene del fattore di allungamento della traduzione EF1- α .

L'estrazione del DNA fungino è stata effettuata da colonie pure su PDA di 4-7 giorni di età, utilizzando il kit Instagene Matrix (BioRad Laboratories, Hercules, CA), secondo le istruzioni della casa produttrice. Gli estratti sono stati quindi conservati a -20 °C fino

al loro successivo utilizzo. Con la reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata amplificata la regione ITS, utilizzando i primers universali ITS1 e ITS4 (White et al., 1990) e una porzione del gene EF1- α attraverso l'impiego dei primer EF446f and EF1035r (Inderbitzin et al., 2010). Per l'identificazione del campione N1 sono stati invece impiegati i primers BTUB-T1 e BTUB-T2 o BTUB-T22 (O'Donnell and Gigelnik, 1997). La reazione è stata realizzata in un volume totale di 50 μ l contenente: 18,7 μ l di H₂O; 10 μ l di Buffer 5x; 5 μ l di dNTPs; 5 μ l di BSA; 5 μ l di ciascun primer; 0,3 μ l di GoTaq polymerase (Promega); 1 μ l di DNA.

La reazione d'amplificazione è stata eseguita con un termociclatore (Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler), utilizzando i cicli termici riportati da Linaldeddu et al. (2013). Aliquote di 5 μ l di ciascun prodotto di amplificazione e dello standard costituito dal 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™) sono stati fatti migrare mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% in tampone TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3), usando come tracciante molecolare il SYBR-Safe (Invitrogen™). La dimensione degli ampliconi (bp), così come la loro concentrazione (ng/ μ l), è stata determinata attraverso il Gel documentation systems, VWR® Imager2. I prodotti PCR sono stati quindi purificati, utilizzando il Kit EUROGOLD Gel Extraction (EuroClone), seguendo le istruzioni riportate dalla casa produttrice.

I purificati sono stati quindi quantificati ed una aliquota è stata spedita presso i laboratori della BMR Genomics s.r.l. (www.bmr-genomics.it), spin-off dell'Università di Padova per essere sequenziata. Gli elettroferogrammi delle sequenze ottenute, sia in forward che in reverse, sono stati letti separatamente e poi confrontati, al fine di ottenere una sequenza consenso, attraverso il programma FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc.; <http://www.geospiza.com/finchtv>). La sequenza consenso di ciascun isolato è stata infine confrontata con le sequenze disponibili nel database online GenBank utilizzando il programma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

5.2.3 Analisi filogenetiche

Le sequenze ITS di 20 isolati sono state combinate e inserite in un data-set con altre 46 sequenze rappresentative di alcune specie di Diatrypaceae conosciute (TAB. 8). Le sequenze sono state allineate, utilizzando il programma ClustalX v 1.83 (Thompson et al., 1997), con i seguenti parametri: pairwise alignment parameters (gap opening = 10, gap extension = 0,1) e multiple alignment parameters (gap opening = 10, gap extension = 0,2, transition weight = 0,5, delay divergent sequences = 25 %).

Le sequenze EF di 18 isolati sono state combinate e inserite in un data-set con altre 6 sequenze rappresentative di *Eutypella parasitica* conosciute (TAB. 9). Le sequenze sono state allineate, utilizzando il programma ClustalX v 1.83 (Thompson et al., 1997), con i seguenti parametri: pairwise alignment parameters (gap opening = 10, gap extension = 0,1) e multiple alignment parameters (gap opening = 10, gap extension = 0,2, transition weight = 0,5, delay divergent sequences = 25 %).

La ricostruzione filogenetica è stata eseguita secondo il principio della massima verosimiglianza o maximum likelihood (ML; Felsenstein, 1981), utilizzando il programma MEGA7 (Kumar et al., 2016). All'analisi è stato applicato il general time-reversible model (Rodriguez et al., 1990), che include la stima dei siti invariabili, assumendo una distribuzione gamma discreta con sei categorie (GTR + G + I). Tutti i gaps sono stati inclusi nelle analisi. La robustezza degli alberi ML è stata testata tramite 1000 repliche di bootstrap (Felsenstein, 1985). Gli alberi sono stati visualizzati con il programma TreeView (Page, 1996).

6. RISULTATI

6.1. Monitoraggio

La prima pianta rilevata con i sintomi da cancro di *Eutypella parasitica* (ALLEGATO 20, TAB. 2) è stata campionata il giorno 08/04/2017 nel parco dell'Isonzo, in località Peuma, nel comune di Gorizia (C1: 45°57'19.07"N, 13°36'41.29"E) Si tratta di un esemplare di acero campestre di media grandezza, in buona salute, con un cancro appena sopra il colletto. Scortecciando al margine della lesione è apparso in abbondanza il micelio del patogeno, che ha permesso l'identificazione come sospetto cancro da *E. parasitica*. Al centro del cancro nella zona ormai necrotizzata era evidente lo stroma fungino scuro con i periteci. Un'attenta e dettagliata ricerca, su altri alberi limitrofi della stessa specie, non ha portato un buon esito, nonostante la ricca presenza di aceri. Intorno all'albero sintomatico era presente solo un altro acero campestre con una lesione del fusto simile a un cancro. Dopo una pronta analisi, osservata l'assenza del micelio sottocorticale e della produzione di corpi fruttiferi, si è concluso che probabilmente la lesione fosse causata da un altro parassita o da un danno meccanico. Poche centinaia di metri più a nord, sempre nel medesimo parco, è stato individuato e campionato un altro esemplare di acero con cancro da *Eutypella parasitica* (C2: 45°57'26.48"N, 13°36'40.56"), diagnosi confermata in seguito alle analisi molecolari. L'esemplare in questione, un acero di monte lungo un filare ornamentale, presentava una lesione al colletto di natura cancerosa molto estesa tipica da *E. parasitica*. La ricerca, durante la settimana successiva al primo rinvenimento, su tutti i viali e i parchi cittadini di Gorizia, non ha avuto riscontro positivo. In alcuni viali popolati ad acero (*Acer platanoides* L., *A. negundo* L., *A. saccharinum* L., *A. pseudoplatanus* L., *A. campestre* L., *A. buergerianum* Miq., *A. palmatum* Thunb.) sulle piante erano presenti lesioni sospette nella parte bassa del fusto che ad un'analisi successiva di dettaglio sono state rivelate soltanto lesioni da danni meccanici provocati da lavori stradali o dal traffico stesso.

Nonostante l'abbondante presenza di popolamenti di acero, nelle valli del Friuli Orientale, cancri da *Eutypella parasitica* sono stati trovati soltanto nelle zone più orientali e meridionali al confine con la Slovenia nei comuni di Drenchia e di Prepotto (16 piante infette). L'area con una maggiore densità di piante sintomatiche è risultata essere quella del comune di Drenchia, alle falde dei rilievi prealpini del Kolovrat, in particolare lungo la SP45, tra la frazione di Prapotnizza e la località di San Volfango

(circa 700mslm) e nell'immediato fondovalle a ovest, presso la località di Paciuch (ALLEGATI 21-22-23, TAB. 3). In quest'area la ricerca di *Eutypella* ha dato esiti positivi per la presenza di diverse piante (aceri campestri e aceri di monte) con i sintomi della malattia.

In località Prapotnizza, in contemporanea alla mia ricerca, era stata già individuata, dall'Istituto forestale sloveno, una pianta sintomatica (PR1: 46°10'20.94"N, 13°38'30.50"E). Questa pianta, affetta da un cancro molto vecchio e rappresentativo al colletto, accertata dalle analisi come positiva a *Eutypella parasitica*, è stata scelta come primo report in Italia della malattia. Successivamente, lungo la SP45, tra Prapotnizza e San Volfango, sono state individuate altre diverse piante sintomatiche (ALLEGATI 21-22).

Presso la località Paciuch (46°10'17"N 13°37'50"), in una forra molto stretta e profonda, popolata a ceduo di acero-frassino lungo il torrente Cosizza, la presenza di piante sintomatiche è risultata essere più densa (ALLEGATO 23). Il campionamento in questa località è stato effettuato il giorno 23/04/2017, dopo aver ipotizzato a priori su carta topografica lo spostamento della malattia verso ovest, dalle zone già campionate di Prapotnizza e San Volfango. Lungo una strada comunale chiusa al traffico, che segue parallelamente il corso d'acqua, sono state infatti individuate e campionate 4 piante sintomatiche. In un'analisi successiva si è evidenziata la presenza anche di altri cancri assimilabili a *E. parasitica*, nonché di polloni di acero spezzati alla base a causa del cancro. In questa località il giorno 09/05/2017 è stato organizzato un incontro, tra il TeSAF dell'Università di Padova e l'Istituto Forestale Sloveno dell'Università di Ljubljana, per osservare e discutere sui primi rilevamenti effettuati in Italia. Alcuni cancri in questa zona sono piuttosto grandi (GRAFICO 1), segno che possano avere anche 25-30 anni di età. In questa zona sono stati trovati diversi individui di acero di monte, giovani o di matura età, morti a causa del cancro, sia per uccisione del cambio lungo tutta la circonferenza e sia per schianto a causa della rottura del fusto (ALLEGATO 13).

L'esplorazione di piante infette, nelle valli parallele più occidentali (Cras, Trusgne, Topolò e il Monte San Martino) e in quelle meridionali opposte all'alveo del torrente (Peternel, Podlach, Clodig, Lombai, Tribil), non ha tuttavia portato a buoni risultati. Solo nel comune di Grimacco sono stati individuati durante il secondo monitoraggio altre due piante con cancro associabile a *E. parasitica*.

Nel comune di Taipana e zone limitrofe, l'area della regione dove sono maggiormente presenti gli acero-frassineti, l'attenta ricerca di piante sintomatiche, lungo le principali vie di comunicazione, non ha dato risultato, nonostante l'abbondante presenza dell'acero di monte. In queste località, tuttavia, sono molto diffusi fenomeni di disseccamento del frassino e danni estesi alla vegetazione, dovuti a fenomeni di gelicidio. Anche il monitoraggio attento delle alberature stradali e di parco della città di Cividale (14/09/2017) e di Udine (21/10 e 28/10/2017) non ha dato alcun frutto. Nel luglio 2017 un monitoraggio puntuale con metodo speditivo nell'area di Tarvisio, proprio nelle zone in cui Floreancig nel 2009 ha isolato *Chalara fraxinea*, non ha avuto alcun riscontro. In quest'area è stata trovata un esemplare di faggio con cancro macroscopicamente simile a quelli provocati da *E. parasitica*; successive analisi di laboratorio hanno escluso si trattasse di un nuovo ospite per la specie.

Riscontrata l'assenza, ad un campionamento speditivo, di piante sintomatiche nelle zone più a nord dell'area di studio, la ricerca si è sviluppata maggiormente nelle zone meridionali. La presenza di *Eutypella parasitica* è stata constatata in 4 alberi di *Acer pseudoplatanus* sintomatici nel settembre 2017 in località Plessiva (ALLEGATO 24, TAB 4), nel comune di Cormons (Gorizia). Le piante hanno un'età di circa 25/30 anni e sono interrate in un vialetto di ingresso al parco comunale "Bosco di Plessiva" alle pendici del monte Quarin (45°58'37.1"N 13°29'50.7"E). Le piante presentano tutte un cancro al colletto di simili dimensioni, orientato verso nord e con evidente produzione di periteci nella zona necrotizzata. Una ricerca attenta nei popolamenti intorno, caratterizzati da una ricca presenza di acero campestre, e sulle altre piante di acero ornamentali presenti nel parco, non ha evidenziato la presenza di altre piante sintomatiche. Anche in questo caso il focolaio è risultato isolato e relegato a pochi individui.

La quarta area dove è stata rilevata la presenza di piante sintomatiche è lungo la valle dello Judrio, nel comune di Prepotto presso la località Cladrecis (ALLEGATO 25, TAB. 5). Il monitoraggio, lungo una strada secondaria a est del paese, ha rilevato la presenza del patogeno piuttosto diffusa in un'area popolata a ceduo di acero e frassino, con abbondante presenza di tiglio e carpino nero. Lungo la strada e nell'immediato interno del popolamento, sono state individuate molte piante con sintomi di *Eutypella*. Nella zona è presente anche una certa mortalità di esemplari in età giovanile specie di acero campestre colpiti da questa malattia. Questa zona risulta essere collocata nel lato

opposto della stessa valle rispetto al monte Korada, la zona in Slovenia più vicina all'Italia dove *Eutypella parasitica* è diffusa.

In località Peuma (comune di Gorizia), la frequenza della malattia è risultata essere dello 1.5% (2 piante positive su 132 individui considerati). In località Plessiva (comune di Cormons), invece, la presenza di 4 piante positive a *Eutypella parasitica* su 109 individui considerati ha determinato una frequenza dello 3.6%. Data la bassa mortalità l'incidenza della malattia è comunque bassa e in linea con la letteratura (U.S. Department of agriculture forest service, 1979).

Data la scarsa densità delle piante malate, nei luoghi in cui *Eutypella* è stata individuata, sono state campionate tutte le piante vive con cancro sospetto. Le piante totali campionate e con sintomi ascrivibili a *Eutypella parasitica* sono risultate essere 22. La lunghezza media longitudinale dei cancri campionati è risultata di $67.68 \pm 27,41$ cm.

6.2. Isolamento in coltura pura

Le successive indagini di laboratorio hanno permesso di isolare dai campioni raccolti il micelio di *Eutypella parasitica*. L'isolamento di *E. parasitica*, a partire dal materiale di campo, è sempre stato semplice ed efficace, a causa dell'abbondante presenza sottocorticale del micelio puro del fungo. In coltura pura il micelio appare piuttosto compatto e denso, di colore trasparente nelle fasi iniziali e poi bianco-giallastro (ALLEGATO 15). La crescita del fungo nel termostato a 21 ± 1 °C in condizioni di buio è molto lenta e la produzione di conidi (forma imperfetta del fungo) avviene in genere dopo 25 giorni di incubazione. L'incubazione delle riprese successive, a 25 ± 1 °C in condizioni di buio, ha evidenziato una crescita del micelio più rapida ma sempre una tendenza alla produzione di conidi dopo i 20-25 giorni. In coltura pura non è avvenuta invece la produzione di periteci dello stato teleomorfo, come riportato anche in letteratura da Johnson & Kuntz (1977).

A partire da un isolato sono stati estratti i conidi falciformi di *E. parasitica* per fotografarli (ALLEGATO 17) tramite microscopio ottico computerizzato Leika. Successivamente sono stati scelti 50 conidi per misurare lunghezza e larghezza e per analizzare i dati tramite programma Excel XLSTAT (TAB. 6; GRAF. 2-3). La lunghezza dei conidi è risultata di (26,897) 33,022 - 42,491 (48,540) µm e la larghezza di (1,416) 1,723 - 2,241 (2,584).

6.3. Identificazione degli isolati

L'identificazione degli isolati di *Eutypella parasitica* è stata confermata dall'analisi delle sequenze delle regioni ITS (528 bp) ed EF1- α (364 bp). Per entrambe le regioni geniche la *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con la sequenza dell'ex-coltura tipo di *Eutypella parasitica* (CBS 210.39) depositata in GenBank (accession number: NR_145214.1) (TAB. 7).

Le analisi filogenetiche hanno consentito di chiarire la sistematica degli isolati. Nello specifico l'analisi ML condotta utilizzando le sequenze della regione ITS, ha prodotto un albero filogenetico con una distribuzione spaziale dei clade in funzione delle differenti specie esaminate (ALLEGATO 26). Tutti gli isolati ottenuti in questo studio si raggruppano in un solo clade (bootstrap 99%) con l'isolato tipo della specie (CBS 210.39).

Mentre l'analisi ML delle sequenze EF ha consentito di evidenziare l'esistenza di due *lineages* evolutivi all'interno della popolazione di *Eutypella parasitica* (ALLEGATO 27). In particolare, gli isolati ottenuti in questo studio si raggruppano nello stesso sub-clade con gli isolati provenienti da Polonia, Repubblica Ceca, Slovenia e Ungheria, mentre i due isolati americani formano un sub-clade separato.

Di seguito si riportano le sequenze ITS e EF in formato FASTA di un isolato rappresentativo di *Eutypella parasitica* ottenuto in questo studio:

>Eutypella parasitica_CI ITS

```
GATCATTACAGAGTTATCTAACTCCCAAACCCATGTGAACCTACCTATGTTGCCTCGGCGGGGAAGCCTACCCGGTAC
CTACCCTGTAGTTACCCGGGAGCGAGCTACCCTGTAGCCCGCTGCAGGCCTACCCGCCGAAGGACTGTTAACTCTGT
TATTTTATGGAATCTGAGTTATTATACTTAATAAGTAAAACTTTCAACAACCGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCCCC
CATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTCGAGCGTCATTTCAACCCCTAAGCCCTAGTTGCTTAGTGTGGGAACCTAC
CCTGTAGGTAGTTCCTTAAATATATCGGCGGAGTCGTGATGACCCTAAGCGTGTAGTAAATCTTTCTCGCTTCAGTGGT
TCAGCGCTGACGTTTAGCCGTTAAACCCCTATTTTCTAGTGGTTGACCTCGGATCAG
```

>Eutypella parasitica_EF1

```
CATCGAGAAGTTCGAGAAGGTCAGTCGATTCTATGATACGAGCACTTCTTTAACCAAATCCCCATCTACAAGAAAAA
GTGCCTACAAAATTTAACACCACACACACACTGGTACTTTCTTTTATCTCCGTTCCCCCTACTGFAAATATT
TGTCCACCCGCCCTTCACTTCGCCCTCAAGATTGACCCCTCCCCCACCACCTGATTTTCCCCCTCATGTGCGGTTT
TTTCAGTGGACCCCTTATCTAAGACAATCAACCCTAACGCCCACTTTTATATCTGCCAAGCAATACGGTCAGCAATA
TGGTCAGCATTACTGACGCCTCCTATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGG
```

Nel secondo campionamento oltre a *E. parasitica* sono state ottenute colonie appartenenti a un'altra specie fungina. In particolare, dal campione N1, scelto come rappresentativo, il prelievo effettuato dal margine della lesione necrotica ha condotto

all'isolamento di una specie a rapida crescita dal micelio inizialmente bianco e successivamente virante all'arancione.

L'identificazione di questa specie è stata effettuata attraverso l'analisi delle sequenze nucleotidiche della regione BT2 di un isolato rappresentativo (N1). Attraverso la reazione a catena della polimerasi per l'isolato N1 è stata ottenuta una sequenza di 593 bp. La *Blast analysis* ha evidenziato una similarità del 100% con la sequenza di *Neonectria punicea* (J.C. Schmidt) Castl. & Rossman (CBS 119525) depositata in GenBank (accession number: DQ789825). Di seguito si riporta la sequenza in formato FASTA dell'isolato considerato:

>Neonectria_punicea_N1

```
GGAGATTGT AAGT AATCCGCCTCTTGCGATGCTCTGCGGTGCTCGTGCCCGTCTCCAACGACGCGTCCGAAAACCTGC
CCAGCCGCTGCTGCCCTGATTCTACCCCGCCGAACCATTTCCACCGCCTCCAGCAGAGCAACATT CGGGACTCCGAA
CACGACGTGATTTCTGGACATGATAGCTGACTGCTCTCTCTGCAAATATAGGTCCACCTTCAGACCGGCCAGTGC
GTAAGTGCTTCTCTGCTCCGTGGCCGAATGTGCGGGCATTCACTGACAATGCGTGGATAGGGCAACCAAATCGGT
GCTGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGCGAGCATGGCCTTGACAGCAACGGTGTCTACGCCGGCAACTCCGAGCTCCAG
CTCGAGCGCATGAGCGTCTACTCAACGAGGTTCGTGGAGAAATCATCTCATCTGTTCATCTCCTAGAAAACGCCAAAC
TCAACACACAGGCTTCTGGCAACAAGTATGTTCTCGCGCCGTCTCGTCTCGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGC
TGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGCCAGCTCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTCGGTCAT
```

7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le ricerche effettuate nell'ambito di questa tesi hanno consentito di accertare per la prima volta la presenza di *Eutypella parasitica* sul territorio italiano. L'incidenza della malattia, nelle aree di studio, è risultata relativamente limitata e in linea con quanto riportato in letteratura. Solo nel sito di Paciuch (comune di Drenchia), sembrerebbe più elevata.

Le analisi filogenetiche effettuate utilizzando le sequenze EF, hanno consentito di evidenziare per la prima volta l'esistenza di differenze intraspecifiche per questa specie e di accertare che la popolazione europea di *Eutypella parasitica* appartiene a un aplotipo differente da quello americano.

L'ulteriore diffusione del patogeno in Italia potrebbe essere favorita dalla ricca presenza nelle zone d'indagine di formazioni ad acero. I risultati ottenuti concordano con il modello di diffusione del patogeno proposto da Ogris & Jurc nel 2006 "Spread risk of *Eutypella* canker of maple in Europe". Tale modello, costruito in conformità a quello proposto per la *Phytophthora ramorum* (Werres et al.) in California, il quale prevede l'interpolazione di dati riguardanti le variabili climatiche e stazionali, la suscettibilità delle specie ospiti e la biologia del fungo.

Sulla base dei dati raccolti in questa indagine, è stata allestita una mappa con le aree a maggiore e minore rischio di diffusione della malattia (ALLEGATO 8). Nello specifico la zona prealpina del Friuli Venezia Giulia, dove è stata effettuata la ricerca, in funzione della ricca presenza di piante di acero (in particolare *Acer pseudoplatanus*, considerato la specie più suscettibile in Europa) e dei fattori climatici favorevoli al patogeno (in particolare il regime pluviometrico e la temperatura), è collocata dal modello tra quelle ad alto rischio di diffusione (> 42%).

La presenza di un'area ad alto o a moderato rischio su tutta la fascia prealpina del Nord-est potrebbe favorire nel futuro la diffusione del patogeno verso ovest. Il fenomeno di espansione, tuttavia, come evidenziato dalla ricerca, sembra essere attualmente rallentato o addirittura bloccato, a causa sia della frammentarietà dei popolamenti di acero con variazioni anche improvvise delle tipologie forestali rispetto a quelle della Slovenia centro-occidentale e della zona d'Oltralpe sia dall'orografia del territorio (caratterizzato da valli molto chiuse, strette, con diversa esposizione e da catene montuose più elevate verso nord ovest, rispetto alle aree focolaio individuate nello studio).

Per le aree più settentrionali del Friuli Venezia Giulia, pur essendo in comunicazione diretta con la Slovenia a est, si può ipotizzare che la diffusione delle spore di *E. parasitica* sia stata limitata dall'orografia molto accidentata del territorio: catena del Gran Monte e del Monte Stol a nord e massiccio del monte Matajur a est, con creste e vette che superano il limite della vegetazione arborea. Allo stesso tempo la zona nord-occidentale della Slovenia, non costituisce attualmente un focolaio della malattia per la presenza di catene montuose molto elevate (oltre i 2000-2500m).

In virtù dei minori ostacoli, dovuti all'orografia e alla presenza di correnti dirette di vento di bora dalle zone infette della Slovenia, in future indagini potrebbe essere interessante approfondire le ricerche sulla diffusione di *Eutypella parasitica* a sud nel Carso Isontino e in provincia di Trieste. In quest'area, infatti, è diffuso sia l'acero campestre (ospite accertato) che l'acero minore (*Acer monspessulanum* L.), specie potenzialmente suscettibile.

Degno di nota è il rinvenimento della specie *Neonectria punicea* dal margine delle lesioni necrotiche dei cancri tipici di *Eutypella parasitica*. Il fungo *Neo. punicea* appartiene al gruppo della *Neonectria coccinea* (Pers.) Rossman & Samuels, alla quale è molto vicina geneticamente (Castlebury, Rossman and Hyten, 2006). Questo gruppo di patogeni ha una diffusione cosmopolita, pur essendo più frequentemente isolato da piante sintomatiche nell'emisfero Nord. In particolare, la *Neo. punicea* è diffusa in Asia, Europa e Nord America (Hirooka, Rossman, Zhuang, Salgado-Salazar & Chaverri, 2013). Per questa specie finora non è stata accertata la patogenicità su acero. La maggior parte dei campioni raccolti per lo studio di questa specie derivava da rami o fusti appena disseccati, facendo presupporre un ruolo di questo microrganismo nel processo di patogenesi.

Neonectria punicea è una specie diffusa in gran parte del mondo, su varie specie dei generi *Acer*, *Fagus*, *Prunus*, *Quercus*, *Rhamnus*, *Ilex* e soprattutto sulla specie *Frangula alnus* Mill (Booth, 1959; Castlebury, Rossman and Hyten, 2006; Hirooka et al., 2013). I risultati ottenuti suggeriscono l'importanza di accertare in futuro una possibile azione sinergica tra i due organismi fungini nell'eziologia della malattia.

In conclusione, la progressiva diffusione nei boschi dell'Europa di patogeni alieni come *Eutypella parasitica*, costituisce un ulteriore motivo di preoccupazione per la conservazione delle aree verdi naturali delle zone temperate del pianeta. Sebbene *Eutypella parasitica* sia un patogeno caratterizzato da un basso livello di virulenza, nel

lungo periodo la sua ulteriore diffusione può rappresentare una minaccia per le formazioni di acero-frassineto.

8. BIBLIOGRAFIA

- Acero, F. J., González, V., Sánchez-Ballestrós, J., Rubio, V., Checa, J., Bills, G. F., Salazar, O., Platas, G., e Peláez, F. (2004). Molecular phylogenetic studies on the *Diatrypaceae* based on rDNA-ITS sequences. *Mycologia* 96:249-259
- Aceto, P., Pividori, M., e Siniscalco, C., (2000). Dinamica evolutiva di popolamenti forestali di neoformazione nel piano montano. *Monti e Boschi* 51, 4–12.
- Alberti, G., (2016). Linee guida per la gestione selvicolturale di boschi misti di acero e frassino. Regione autonoma Friuli Venezia Giulia.
- Alberti, G., Peressotti, A., Piuissi, P., & Zerbi, G., (2009). Structure and stand development of secondary forests in Eastern Prealps (Italy). *Dendrochronologia* 27, 173–181.
- Alves, A., Linaldeddu, B.T., Deidda, A., Scanu, B. & Phillips, A.J.L., (2014). The complex of *Diplodia* species associated with *Fraxinus* and some other woody hosts in Italy and Portugal. A. et al. *Fungal Diversity* (2014) 67: 143. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0282-9>
- Andreato, R., (2007) Dinamiche evolutive in aceri-frassineti in località Montalbieri (Castelvecchio-Valdagno VI); Tesi di laurea in Tecnologie Forestali ed Ambientali, Università degli Studi di Padova, A.A.2006-2007
- Booth, C., (1959). Studies of *Pyrenomycetes*: IV. *Nectria* (Part I). *Mycological Papers*, 73: 1-115
- Castlebury, L.A., Rossman, A.Y. & Hyten, A.S., (2006). Phylogenetic relationships of *Neonectria/Cylindrocarpon* on *Fagus* in North America. *Systematic Botany & Mycology Laboratory, USDA*. 1417-1433
- Cech, T. L., (2007a): First record of *Eutypella parasitica* in Austria. *Forstschutz Aktuell* 40, 10 –13 (in German).
- Cech, T. L., (2007b): Maple stem canker (*Eutypella parasitica* R. W. Davidson & R. C. Lorenz). Vienna: Federal Research and Training Centre for Forests, Natural Hazards and Landscape (BFW), leaflet, 6 pp. (in German).
- Chiesi, M., (1998). Insediamento ed affermazione del novellame di specie legnose in rimboschimenti spontanei sottoposti a ceduzione nelle Prealpi Orientali (prov. di Udine). Università di Firenze.
- Davidson, RW & Lorenz, RC. (1938). Species of *Eutypella* and *Schizoxylon* associated with cankers of maple. *Phytopathology* 28, 733-745.

- Del Favero, R., (2004). I boschi delle regioni alpine italiane. CLEUP, Padova.
- Del Favero, R., Bortoli, P., Dreossi, G., Lasen, C. & Vanone, G., (1998). La vegetazione forestale e la selvicoltura nella regione Friuli Venezia Giulia. Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia. Direzione Regionale delle Foreste, Servizio Selvicoltura.
- Elena G., Leon M., Abad-Campos P. & Armengol, J., (2018) First report of *Diplodia fraxini* causing dieback of *Fraxinus angustifolia* in Spain.
- Elleberg, H., (1988). Vegetation ecology in Central Europe. Cambridge University Press.
- FAO, (2010). Global Forest Resource Assessment 2010 - Main Report. Roma.
- Ferrari, M. & Medici, D. (2008). Alberi e arbusti. Manuale di riconoscimento delle principali specie ornamentali. Edagricole – Editrice Agricole de Il Sole 24 ORE Business Media S.r.l.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 17: 368-376.
- Felsenstein, J., (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- French, WJ., (1969). Eutypella canker on *Acer* in New York. Syracuse, New York, USA: State University of New York: New York State College of Forestry Technical Publication 94.
- Giongo, S., Oliveira Longa, C.M., Dal Maso, E., Montecchio, L. & Maresi, G., (2017). Evaluating the impact of *Hymenoscyphus fraxineus* in Trentino (Alps, Northern Italy): first investigations. iForest 10: 871-878. – doi: 10.3832/ifor2486-010 [online 2017-11-06]
- Gleason, H., (1926). The individualistic concept of plant association. Bull. Torrey Bot. Club 53, 7–26.
- Gross, H. L., (1984a). Defect associated with *Eutypella* canker of maple. For. Chron. 60, 15 –17.
- Gross, H. L., (1984b). Impact of *Eutypella* canker on the maple resources in the Owen Sound and Wingham forest districts. For. Chron. 60, 18–21.
- Guzzon, G. (1996). Alberi a Gorizia. Edizioni della Laguna. 220 pp.
- Johnson, D. W. & Kuntz, J. E., (1979): *Eutypella* canker of maple: ascospore discharge and dissemination. Phytopathol. 69, 130–135.

Jurc, D.; Ogris, N.; Slippers, B. & Stenlid, J., (2006). First report of *Eutypella* canker of *Acer pseudoplatanus* in Europe. Plant Pathol. 55, 577 (New Dis. Rep., 2005, 12, 37).

Kerr, G., (1995). Silviculture of ash in southern England. Forestry 68, 63–70.

Kimmins, J., (1997). Forest ecology. A foundation for sustainable management, 2nd Editio. ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Kliejunas, J. T. & Kuntz, J. E., (1974). *Eutypella* canker, characteristics and control. For. Chron. 50, 106–108.

Kumar S., Stecher G. & Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. Molecular Biology and Evolution 33:1870-1874.

Hirooka, Y, Rossman, A.Y., Zhuang, W, Salgado-Salazar, C & Chaverri, P. (2013). Species delimitation for *Neonectria coccinea* group including the causal agents of beech bark disease in Asia, Europe, and North America. Mycosystema. 32. 485-517.

Inderbitzin P., Bostock R.M., Trouillas F.P. & Michailides T.J. (2010). A six-locus phylogeny reveals high species diversity in *Botryosphaeriaceae* from California almond. Mycologia 102: 1350-1368.

Lachance, D., & Kuntz, J. E., (1966). *Eutypella* canker of sugar maple. Phytopathology 56:885-886.

Linaldeddu, B.T., Deidda, A., Scanu, B., Franceschini, A., Alves, A. & Phillips, A.J.L., (2016). Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae*, *Diatrypaceae* and *Gnomoniaceae* associated with branch canker and dieback of hazelnut in Sardinia (Italy). Eur J Plant Pathol DOI 10.1007/s10658-016-0912-z

Linaldeddu, B.T., Franceschini A., Alves A. & Phillips A.J.L., (2013). *Diplodia quercivora* sp. nov.: a new species of *Diplodia* found on declining *Quercus canariensis* trees in Tunisia. Mycologia 105 (5): 1266-1274.

Luchi N., Montecchio L. & Santini A., (2012). Situation with ash in Italy: stand characteristics, health condition, ongoing work and research needs. In: Interim Report from the Meeting “*Chalara fraxinea*, FRAXBACK” (Mainprize N, Hendry S, Weir J eds). Vilnius (Lithuania) 13-14 Nov 2012. Forestry Commission, Bristol, UK, pp. 25-26

Luque, J., Sierra, D., Torres, E. and Garcia, F., (2006). *Cryptovalsa ampelina* on Grapevines in N.E. Spain: Identification and Pathogenicity. Phytopathol. Mediterr. (2006) 45, S101–S109.

Lupieri, A., (2004). Gli acero-frassineti delle Prealpi Giulie. Not. ERS 1, 23–27.

Mehrabi, M., Hemmati, R., Vasilyeva, L.N. and Trouillas, F.P., (2006) *Diatrypella macrospora* sp. nov. and new records of diatrypaceous fungi from Iran. DOI: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.252.1>.

Motta, R., & Nola, P., (2001). Growth trends and dynamics in sub-alpine forest stands in the Varaita Valley (Piedmont, Italy) and their relationships with human activities and global change. *J. Veg. Sci.* 12, 219–230.

Nei, M. and Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York

O'Donnell, K. & Cigelnik, E. (1997) Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 103. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>

Ogris, N., Jurc, D., & Jurc, M. (2005). *Eutypella* canker (*Eutypella parasitica*: Ascomycota: Fungi) on sycamore maple and field maple: characteristics and differences. *Gozd. Vestn.* 63:411-418.

Ogris, N.; Jurc, D., & Jurc, M., (2006): Spread risk of *Eutypella* canker of maple in Europe. *EPPO Bull.* 36, 475–485.

Ogris, N.; Diminic, D.; Piskur, B. & Kraigher, H., (2008): First report of *Eutypella parasitica* causing cankers on field maple (*Acer campestre*) in Croatia. *Plant Pathol.* 57, 785 (New Dis. Rep., 2008, 16, 39).

Page, R.D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357-358.

Pelleri, F., & Fontana, S., (2003). Valorizzazione di acero-frassineti di neoformazione. *Sherwood* 91, 7–14.

Piskur, B.; Ogris, N. & Jurc, D., (2007): Species-specific primers for *Eutypella parasitica*, the causal agent of *Eutypella* canker of maple. *Plant Dis.* 91, 1579–1584.

Piussi, P., (2002). Rimboschimenti spontanei ed evoluzioni post coltura. *Monti e Boschi* 2 3, 31–37.

Rodriguez, F., Oliver, J.F., Marin, A. & Medina, J.R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitutions. *Journal of Theoretical Biology* 142, 485-501.

Santini, A., Ghelardini, L., De Pace, C., Desprez-Loustau, M. L., Capretti, P., Chandelier, A.; Cech, T., Chira, D., Diamandis, S., Gaitnieks, T., Hantula, J., Holdenrieder, O., Jankovsky, L., Jung, T., Jurc, D., Kirisits, T.; Kunca, A., Lygis, V., Malecka, M., Marc ais, B., Schmitz, S., Schumacher, J., Solheim, H., Solla, A., Szabo, I., Tsopelas, P., Vannini, A., Vettraino, A. M.; Woodward, S., Webber, J. & Stenlid, J., (2013): Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. *New Phytol.* 197, 238–250.

Salbitano, F., (1987). Vegetazione forestale ed insediamento del bosco in campi abbandonati in un settore delle Prealpi Giulie (Taipana, Udine). *Gortania* 9.

Scortegagna, U., (2007). Alberi: le Colonne del Cielo. Come riconoscere 100+1 alberi dell'ambiente montano. 2007 Duck Edizioni- CSC CAI Mirano.

Sgarbossa, A., (2008). Studio su acero-frassineti di neoformazione in comune di Frisanco (Pordenone). Università di Padova.

Stergul, F., & Frigimelica, G., (1996). Insetti e funghi dannosi ai boschi nel Friuli Venezia Giulia. Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia. Direzione Regionale delle Foreste, Servizio Selvicoltura, Udine.

Thill, A., (1970). *Le Frene et sa Culture*. Editions Duculot, Gembloux

Ticli, B., (2004). Enciclopedia degli alberi d'Italia e d'Europa. Editrice De Vecchi. DVE Italia S.p.A.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.

Torta, G., (1997). Cambiamenti del paesaggio e dinamica della vegetazione in coltivi abbandonati dell'Appennino settentrionale (Comune di Firenzuola). Università di Firenze

Trouillas, F.P., Peduto Hand, F., Inderbitzin, P. and Gubler, W.D, (2015). The genus *Cryptosphaeria* in the western United States: taxonomy, multilocus phylogeny and a new species, *C. multicontinentalis*. *Mycologia*. 2015 Nov-Dec;107(6):1304-13. doi: 10.3852/15-115. Epub 2015 Sep 9.

Urbinati, C., & De Cillia, A., (1995). Analisi della distribuzione spaziale e dell'associabilità di *Acer pseudoplatanus* L. e *Fraxinus excelsior* L. in aceri-frassineti secondari delle Prealpi venete. *Monti e Boschi* 4, 44–51.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplified and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego, pp 315-322

9. SITOGRAFIA

APS Journals: <https://apsjournals.apsnet.org/loi/pdis>

Bing Maps: <https://www.bing.com/maps>

BMR Genomics s.r.l: <https://www.bmr-genomics.it/>

ClustalX: <http://www.clustal.org/>

European and Mediterranean Plant Protection Organization: <https://www.eppo.int/>

Ersa FVG – Agenzia regionale per lo sviluppo rurale: <http://www.ersa.fvg.it/>

FinchTV: <http://www.geospiza.com/finchtv>

Google Earth: <https://www.google.com/earth/>

Google Maps: <https://www.google.com/maps>

Index fungorum: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations:

<http://www.fao.org/home/en/>

MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis: <https://www.megasoftware.net/>

Mycobank database: <http://www.mycobank.org/>

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Osservatorio Meteorologico Regionale – ARPA Friuli Venezia Giulia

<http://www.osmer.fvg.it/home.php>

Quantum GIS: <https://qgis.org/it/site/>

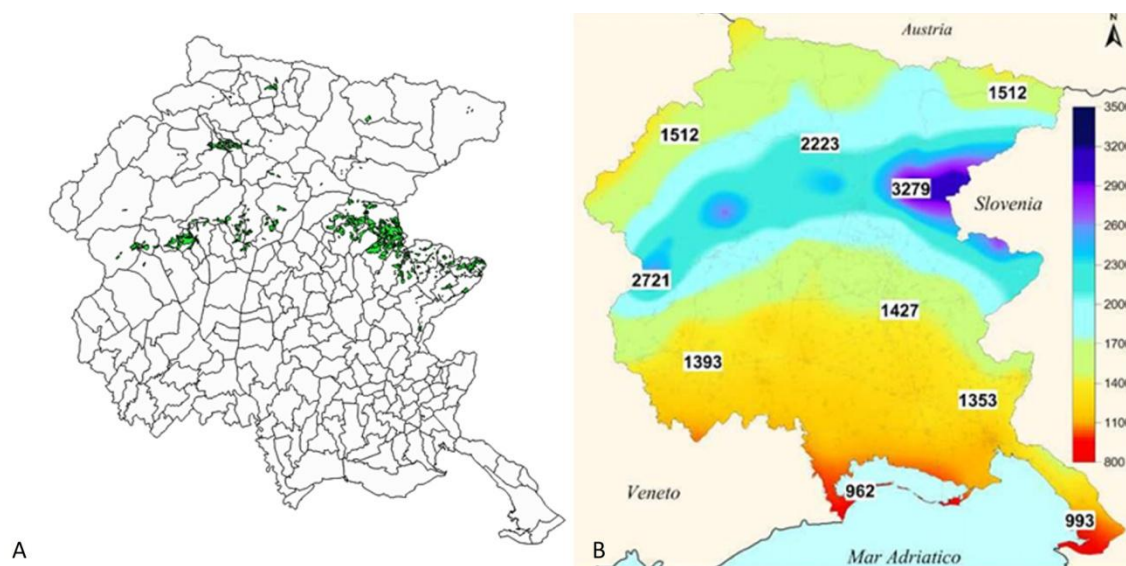
Progetto KeytoNature Dryades. Università degli Studi di Trieste:

http://dbiodbs.units.it/carso/chiaavi_pub00

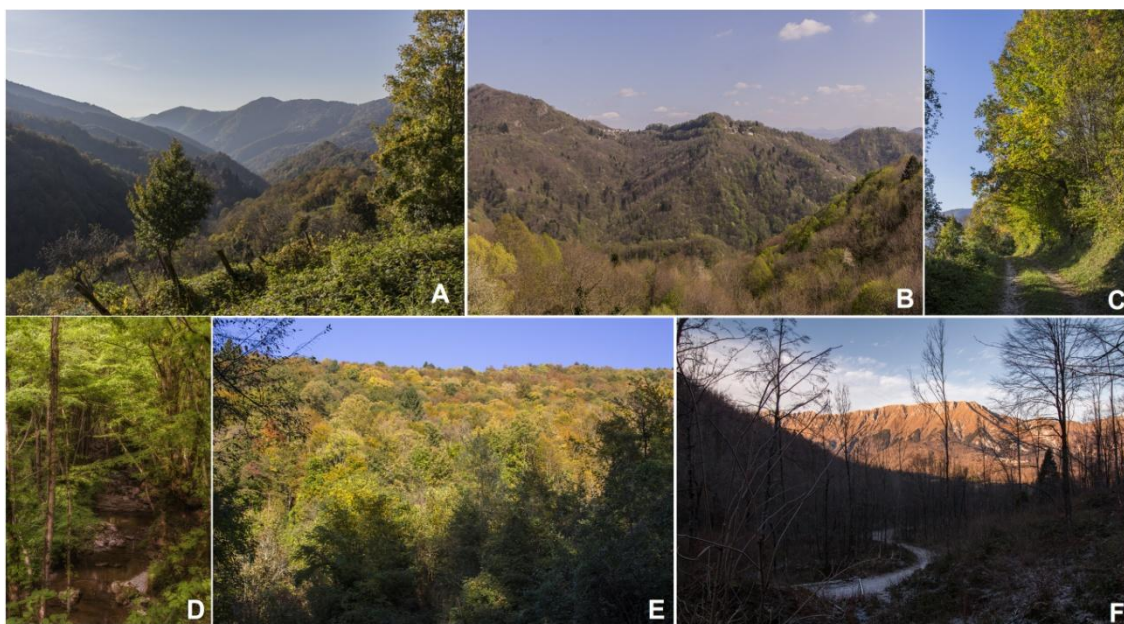
Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia:

<http://www.regione.fvg.it/rafvfg/cms/RAFVG/>

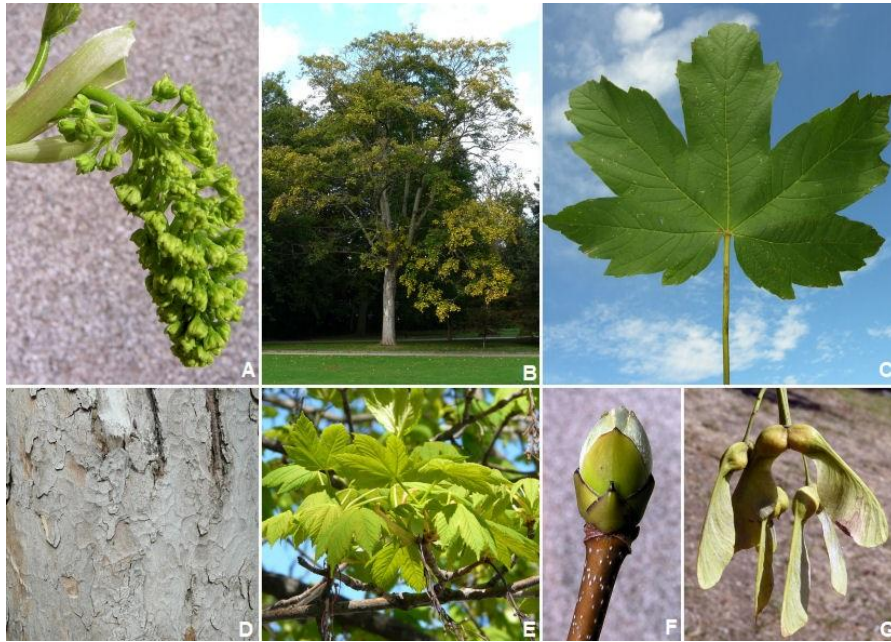
10. ALLEGATI



ALLEGATO 1 - Friuli Venezia Giulia – A. Distribuzione degli acero-frassineti (Alberti et al, 2016); B. Precipitazioni medie annue (Dati rete meteorologica regionale 1961/2013 - OSMER ARPA FVG)



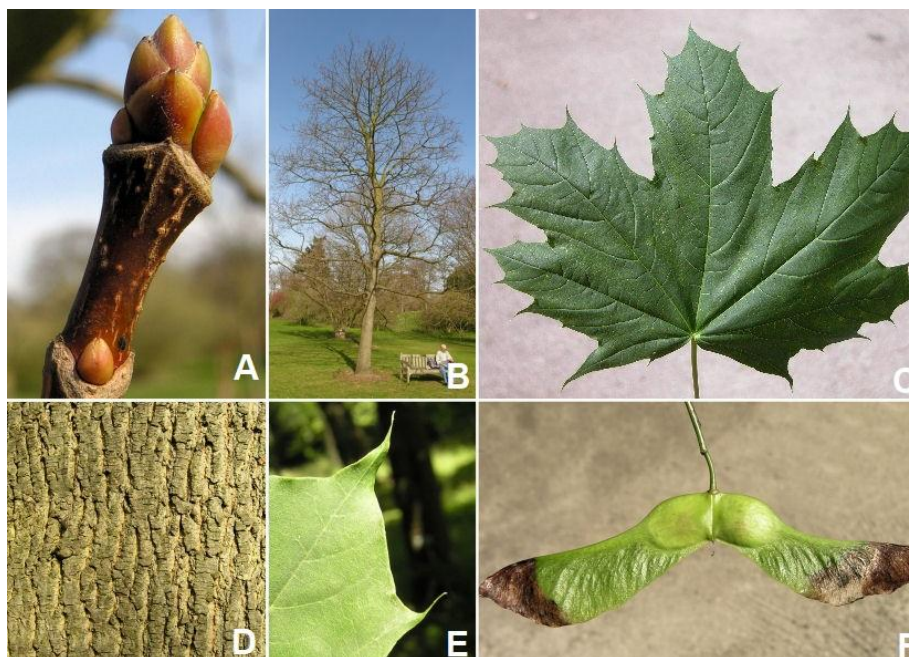
ALLEGATO 2 - Acero-frassineti nelle valli del Natisone – foto Carlo Bregant. A,B,D,E. Valli del Natisone e ambiente tipico di acero-frassineti a successione secondaria; C. Acero-frassineto a ricolonizzazione secondaria su antico pascolo; D. Acero-frassineto tipico di forra



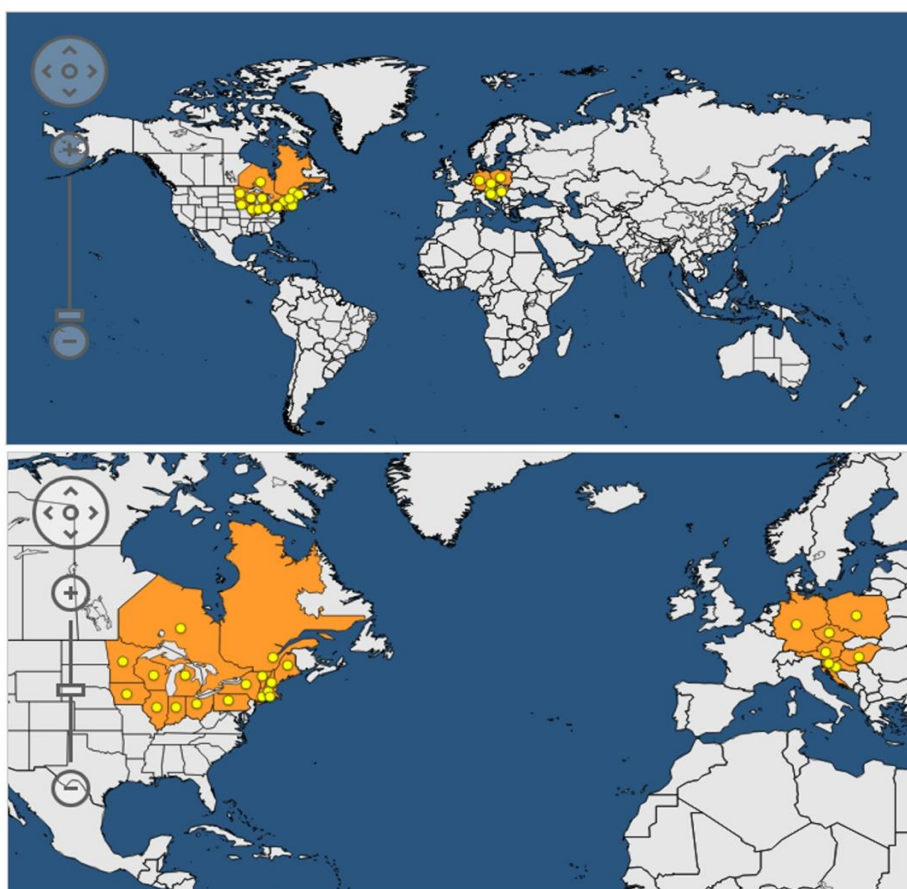
ALLEGATO 3 -Particolari morfologici dell'acero di monte (*Acer pseudoplatanus* L.) – Foto di Andrea Moro - Dryades (Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste). A. Infiorescenza; B. Portamento di un esemplare adulto; C. Foglia palmata; D. Corteccia; E. Particolare di un rametto primaverile; F. Gemma apicale; G. Infruttescenza (disamara).



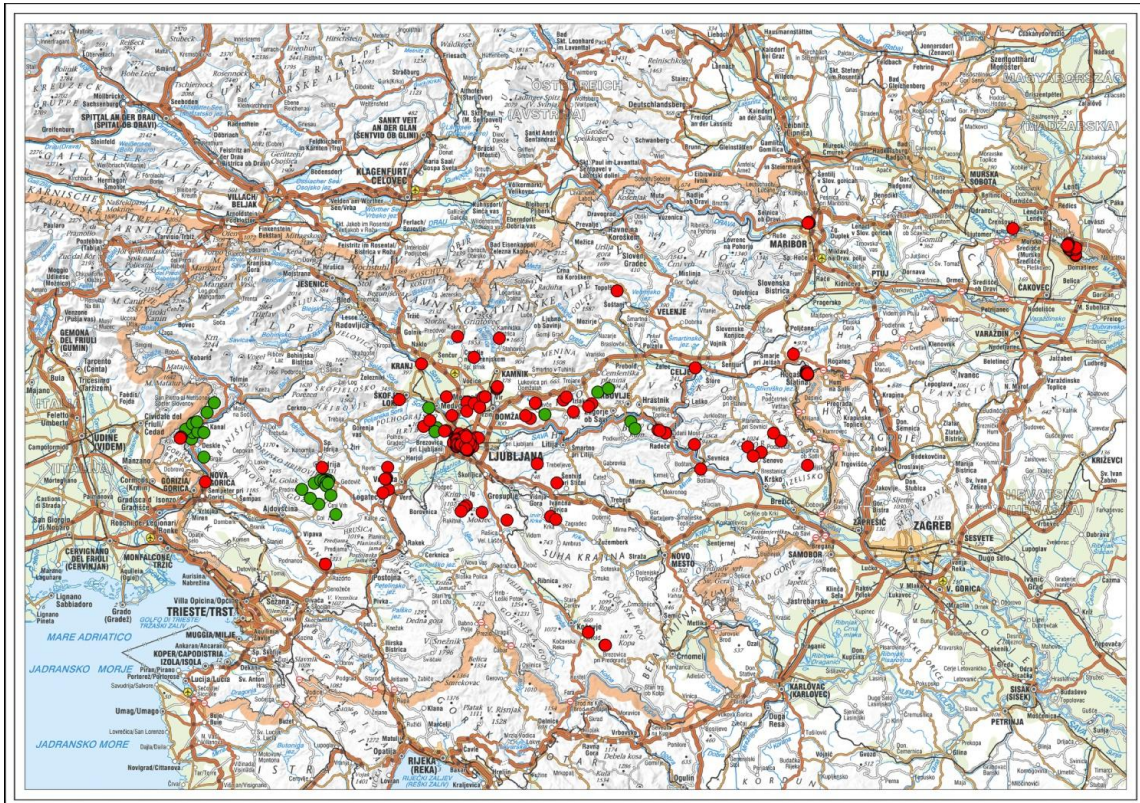
ALLEGATO 4 - Particolari morfologici dell'acero campestre (*Acer campestre* L.) – Foto di Andrea Moro - Dryades (Dipartimento di Scienze della Vita dell'università di Trieste). A. Particolare del fiore; B. Portamento di un esemplare adulto; C. Foglia palmata; D. Gemma; E. Disamara; F. Particolare della corteccia; G. Infiorescenza.



ALLEGATO 5 – Particolari morfologici dell’acero riccio (*Acer platanoides* L.) – Foto di Andrea Moro - Dryades (Dipartimento di scienze della Vita dell’Università di Trieste). A. Particolare della gemma; B. Portamento di un esemplare adulto; C. Foglia; D. Particolare della corteccia; E. Apici arricciati delle foglie; F. Disamare.



ALLEGATO 6 - Paesi dove è presente *Eutypella parasitica* (EPPO)



Data sources: SFI - Slovenian Forestry Institute, SFS - Slovenian Forestry Service. Basemap: The Surveying and Mapping Authority of the Republic of Slovenia. Map prepared by dr. Nikica Ogris, Slovenian Forestry Institute, 2018.

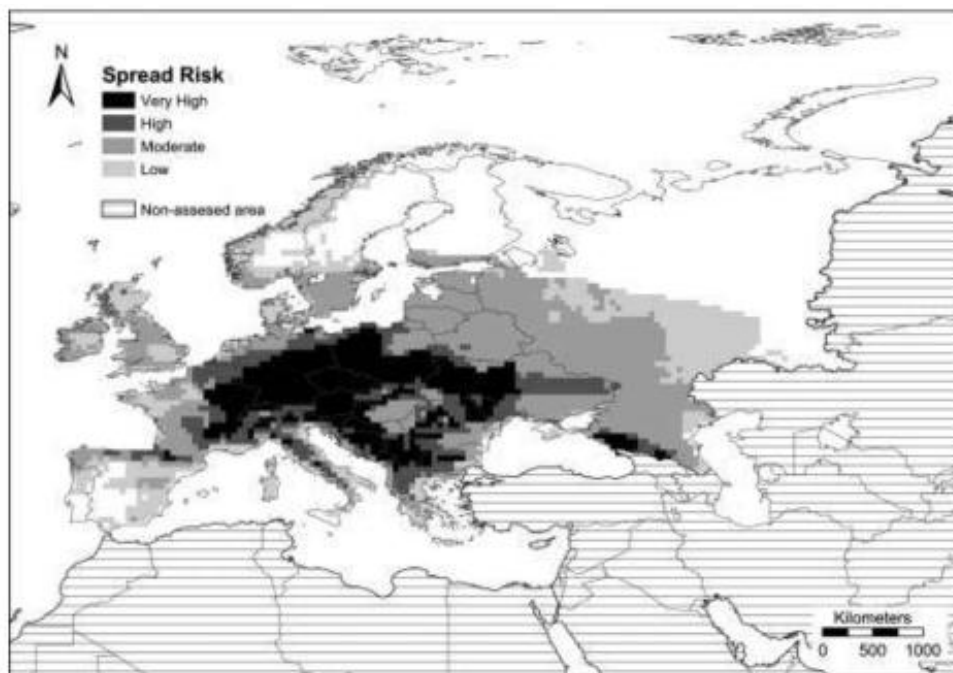
Eutypella parasitica

- SFI
- SFS

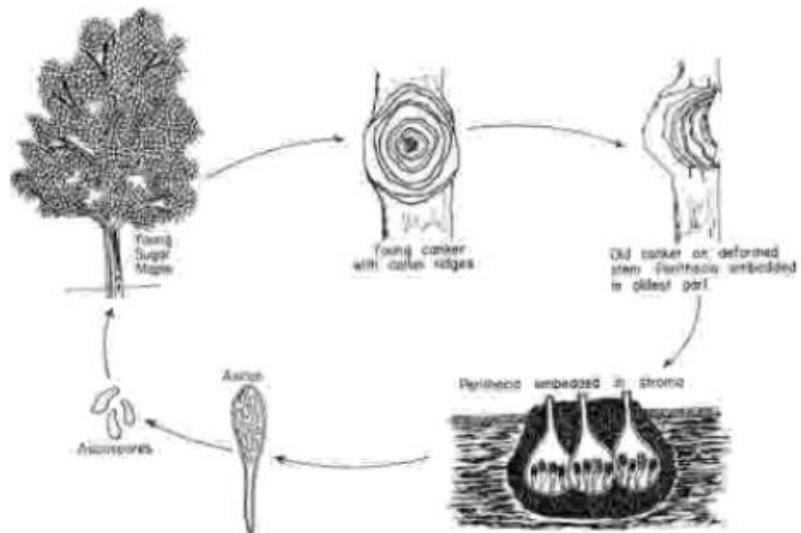


0 10 20 40 km

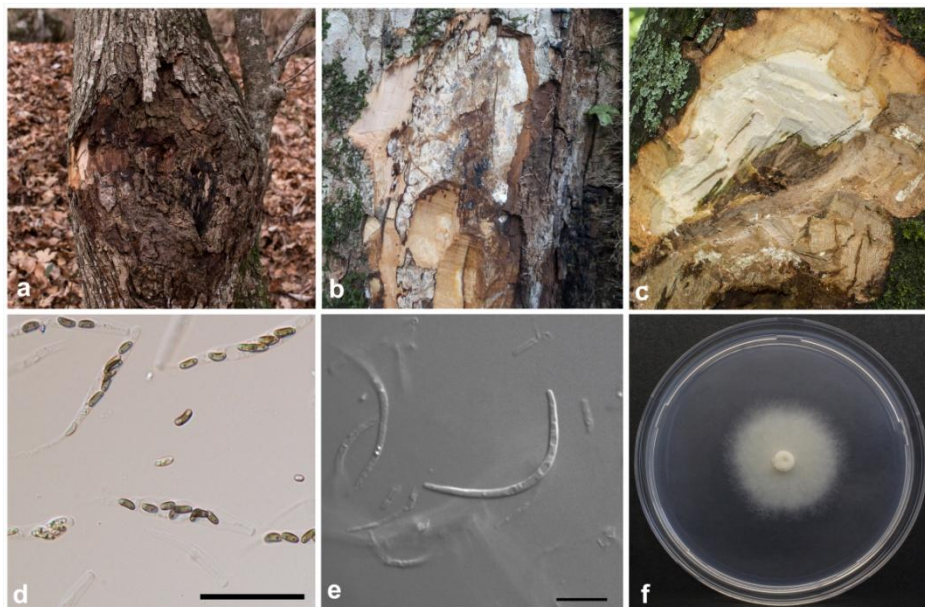
ALLEGATO 7 - Mappa di distribuzione di *Eutypella parasitica* in Slovenia



ALLEGATO 8 - Mappa di rischio sulla diffusione di *E. parasitica* in Europa (Ogris & Jurc, 2006)



ALLEGATO 9 – Ciclo biologico di *Eutypella parasitica* - Blanchard & Tattar, 1981



ALLEGATO 10 – a) Cancro su *Acer campestre* con una larga area necrotica sulla corteccia, depressa al centro con un visibile anello di callo di compartimentazione; b.) ventaglio bianco giallastro di micelio del fungo *Eutypella parasitica* visibile quando la corteccia è stata rimossa; c) cancro depresso e attivo nel tronco che mostra un'ampia lesione necrotica dei tessuti dello xilema; d) aschi lunghi e clavati; e) conidi filiformi curvi e ialini; f) Morfologia della colonia di *Eutypella parasitica* dopo 7 giorni su PDA (Petri di 90 mm di diametro) a 25°C in condizioni di buio. Scale bars = 50 µm in d; 10 µm in e.



ALLEGATO 11 – Lesioni cancerose in fase iniziale su acero campestre



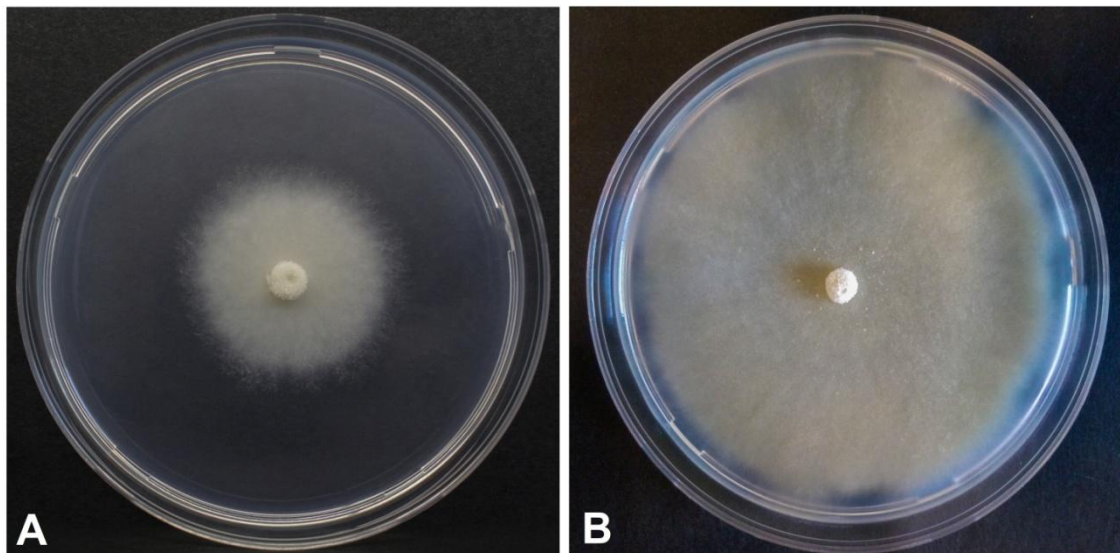
ALLEGATO 12 – Cancri da *Eutypella parasitica*



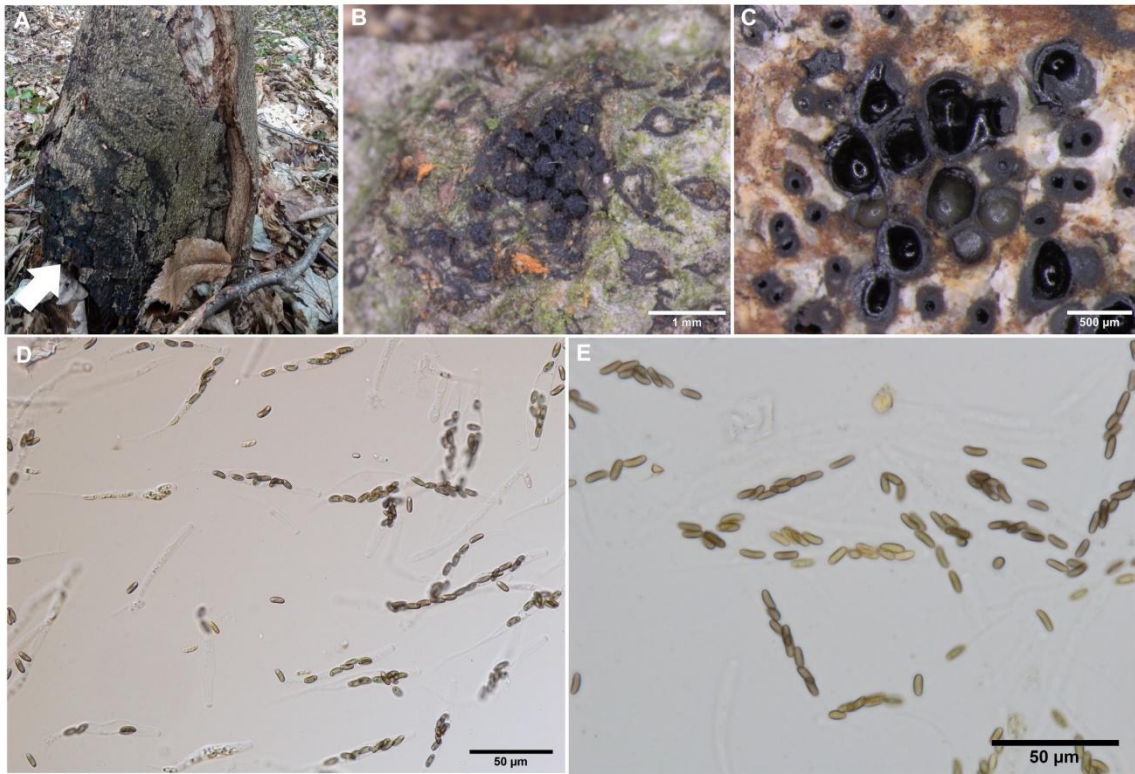
ALLEGATO 13 – Mortalità da *E. parasitica* - A. Ceppaia di acero di monte crollata a causa di un esteso cancro da *Eutypella* al colletto ma ancora in vita; B,C. Grosso pollone di acero di monte crollato con punto di rottura sulla zona del cancro a qualche metro dal suolo; D. Giovane pollone di acero campestre seccato da *E. parasitica* con emissione abbondante di rami epicormici alla base del cancro; E. Particolare immagine precedente. F. Giovane acero campestre crollato a causa del cancro.



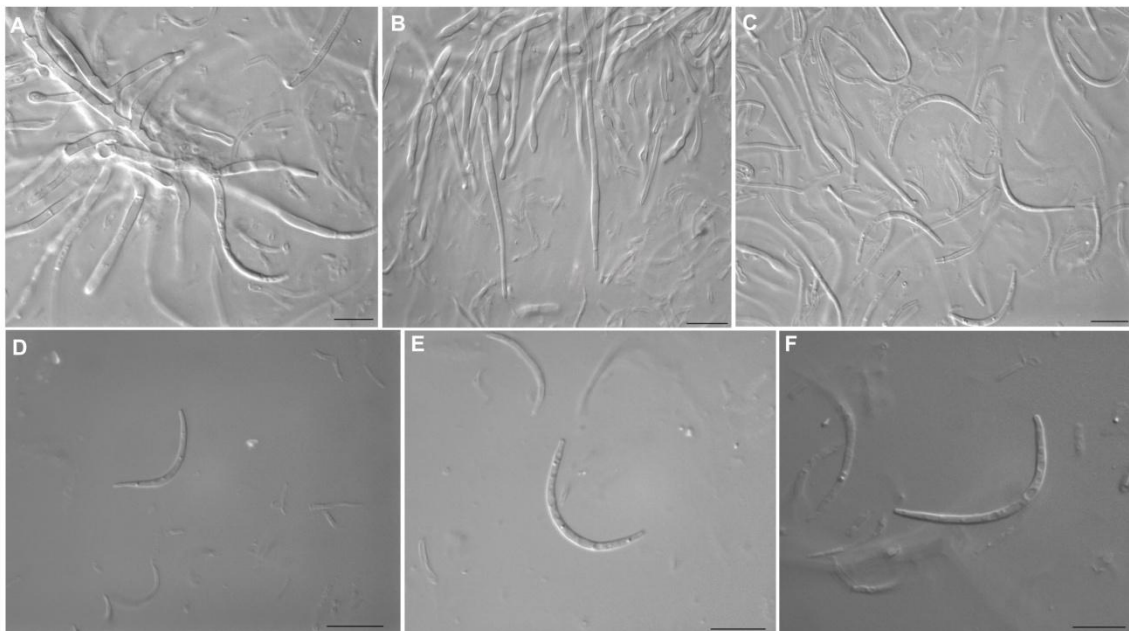
ALLEGATO 14 – Particolari della lesione necrotica – A) Cancro e zona necrotica superiore scortecciata; B,C) Zona di avanzamento del patogeno; D,E,F) Micelio sottocorticale di *E. parasitica*.



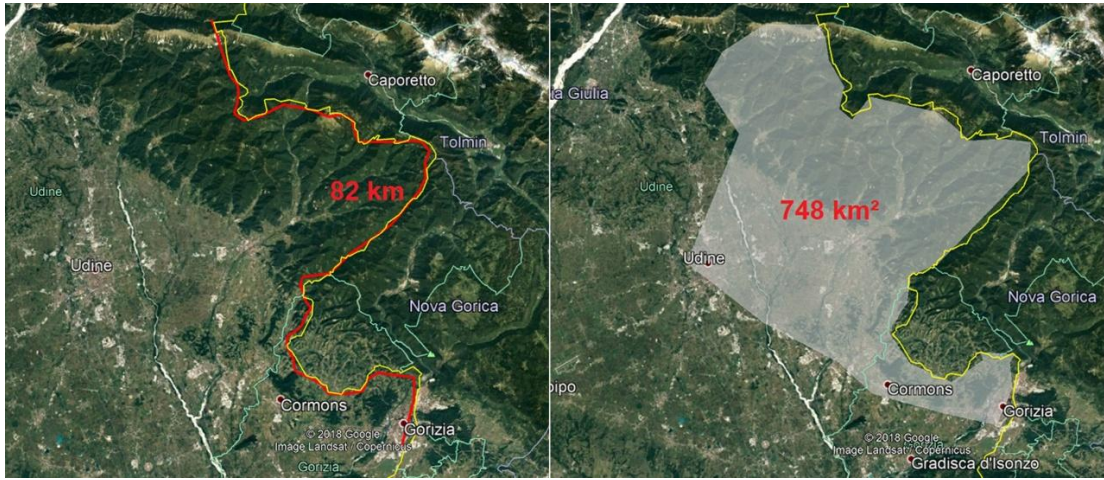
ALLEGATO 15 – Morfologia della colonia di *E. parasitica* (Petri di 90 mm di diametro). A) Dopo 7 giorni su PDA a 25°C in condizioni di buio; B) Dopo 14 giorni su PDA a 25°C in condizioni di buio.



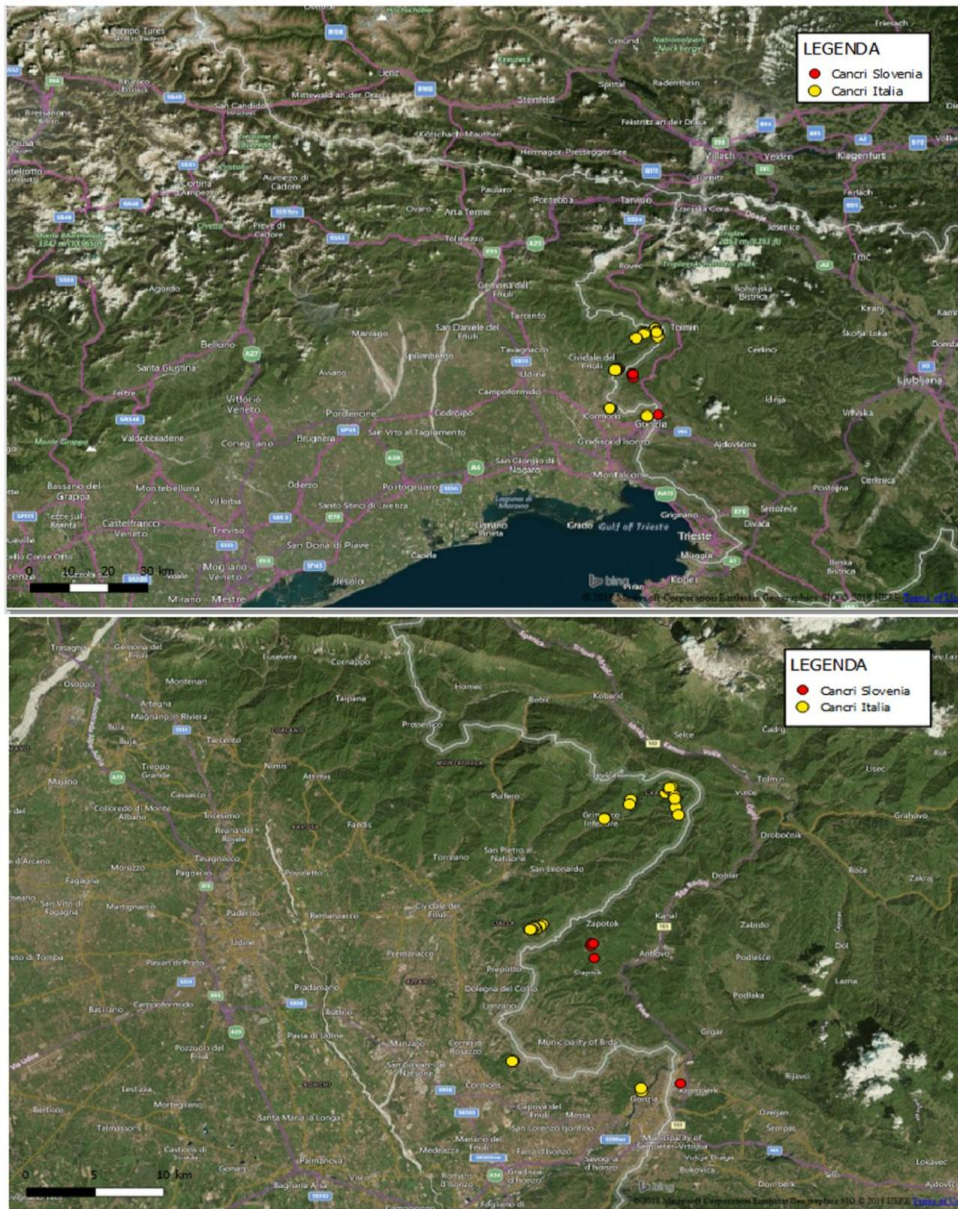
ALLEGATO 16 – A) Lesione cancerosa da *E. parasitica* con stroma fungino nero, foto Carlo Bregant; B,C) Periteci di *E.parasitica*, foto Nikica Ogris; D,E) Ascospore di *E. parasitica*, foto Nikica Ogris.



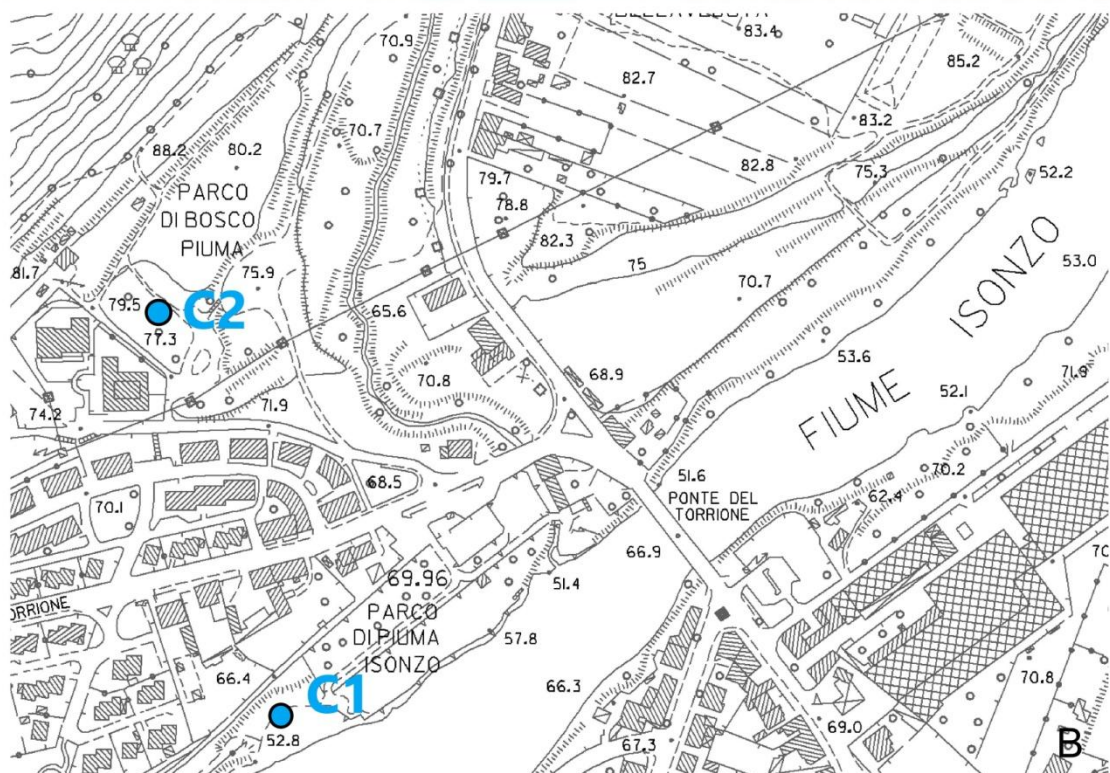
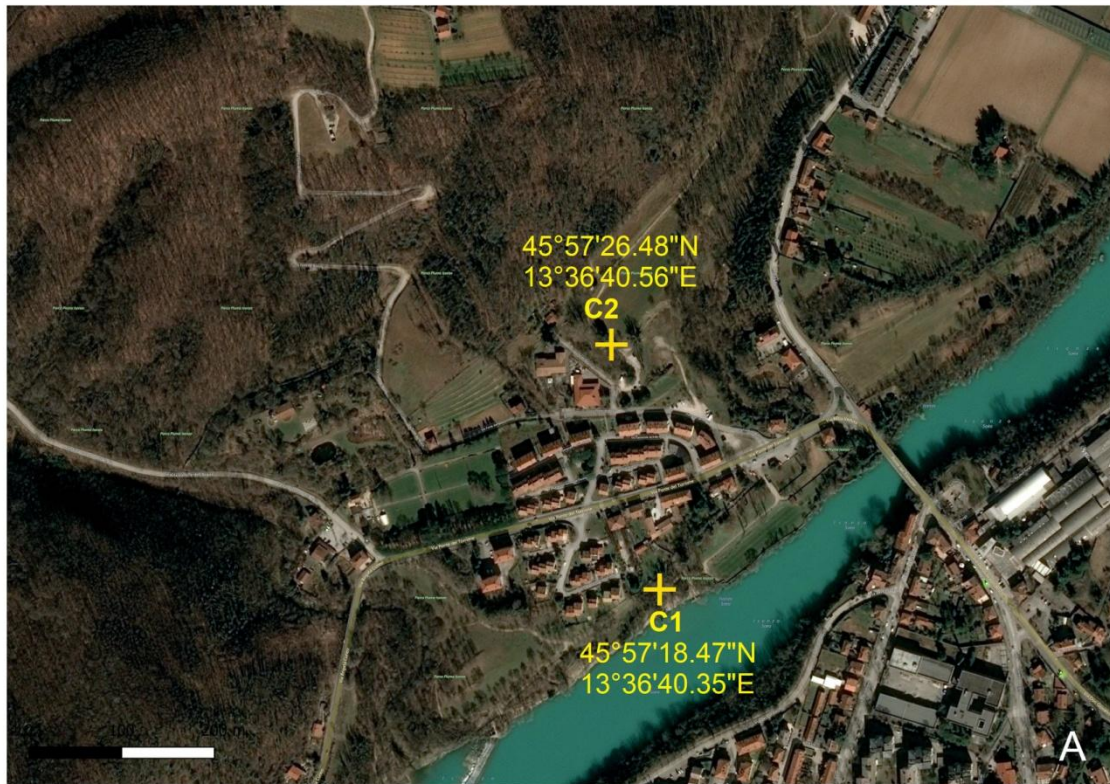
ALLEGATO 17 – A,B) Ife conidiofore; C. Conidi; D,E,F. Particolare conidi – Scale bars = 10 µm - Foto Genny Fanchin



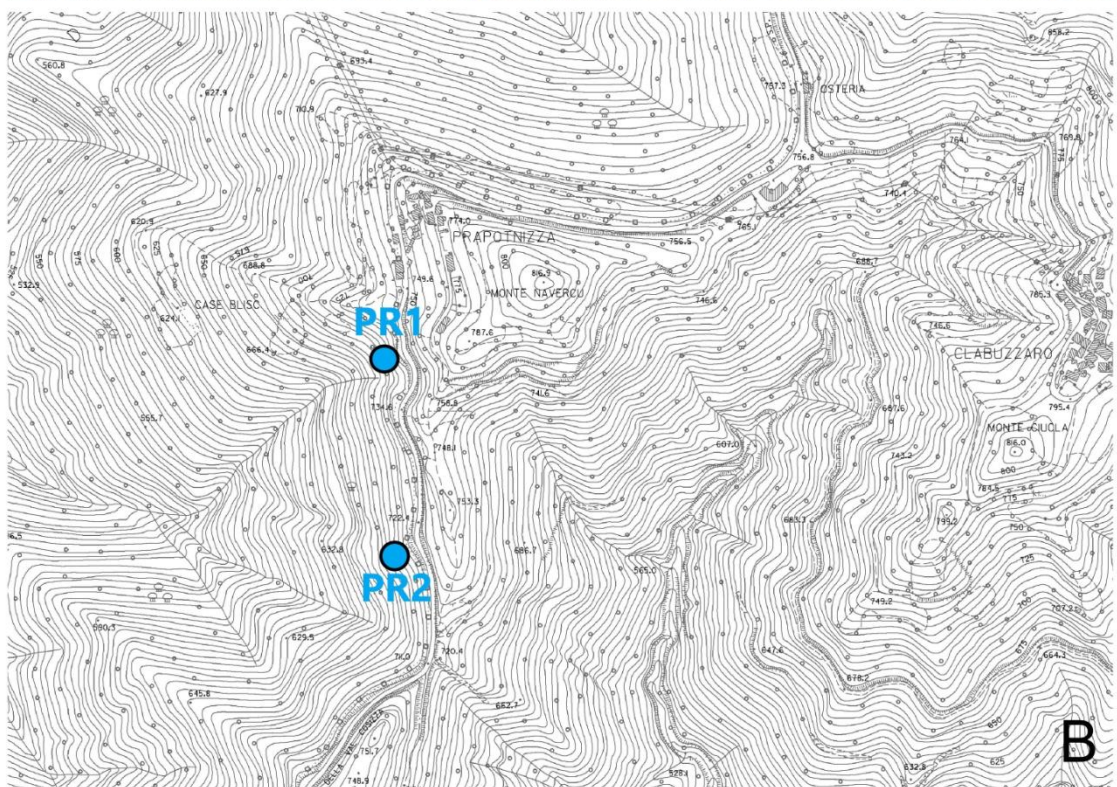
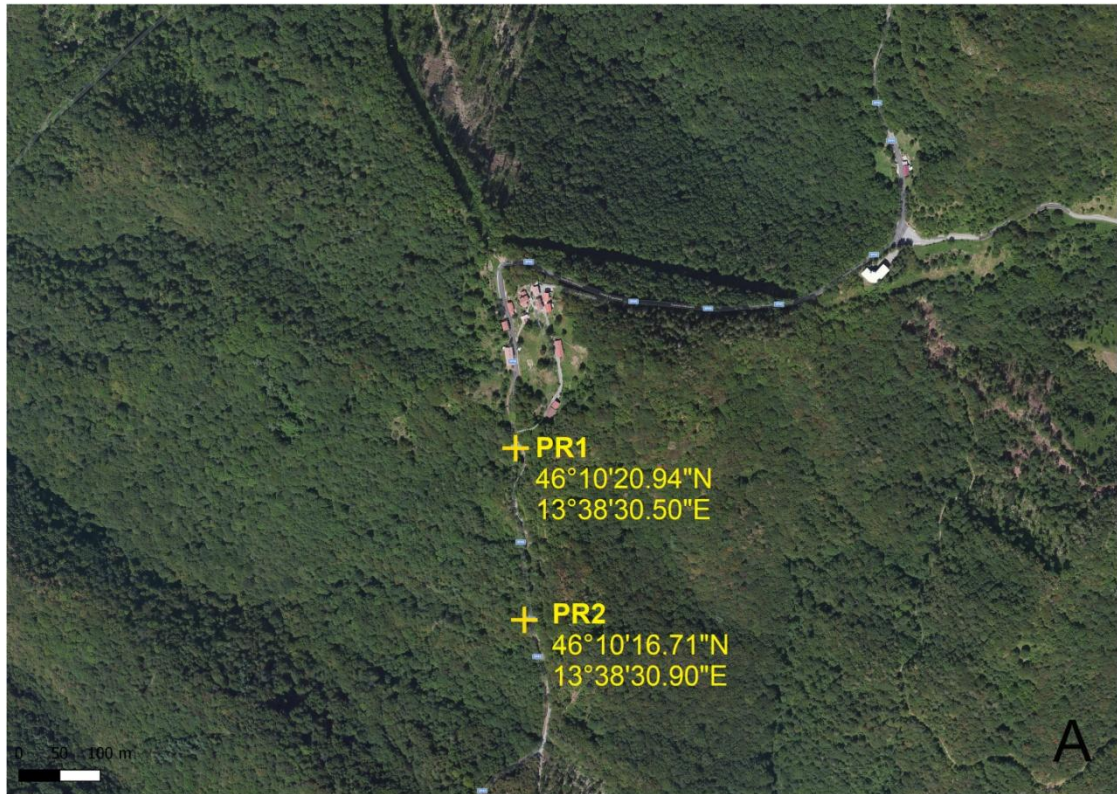
ALLEGATO 18 – Area di studio



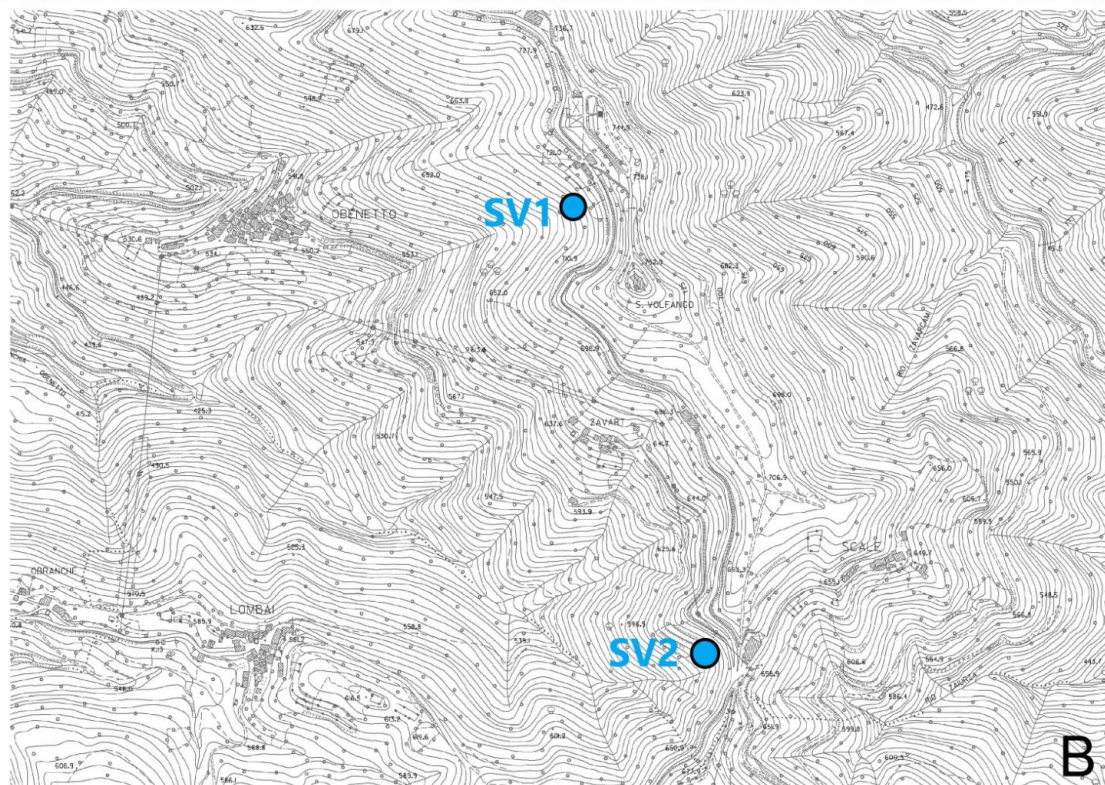
ALLEGATO 19 - Distribuzione geografica dei campionamenti effettuati nella regione Friuli Venezia Giulia



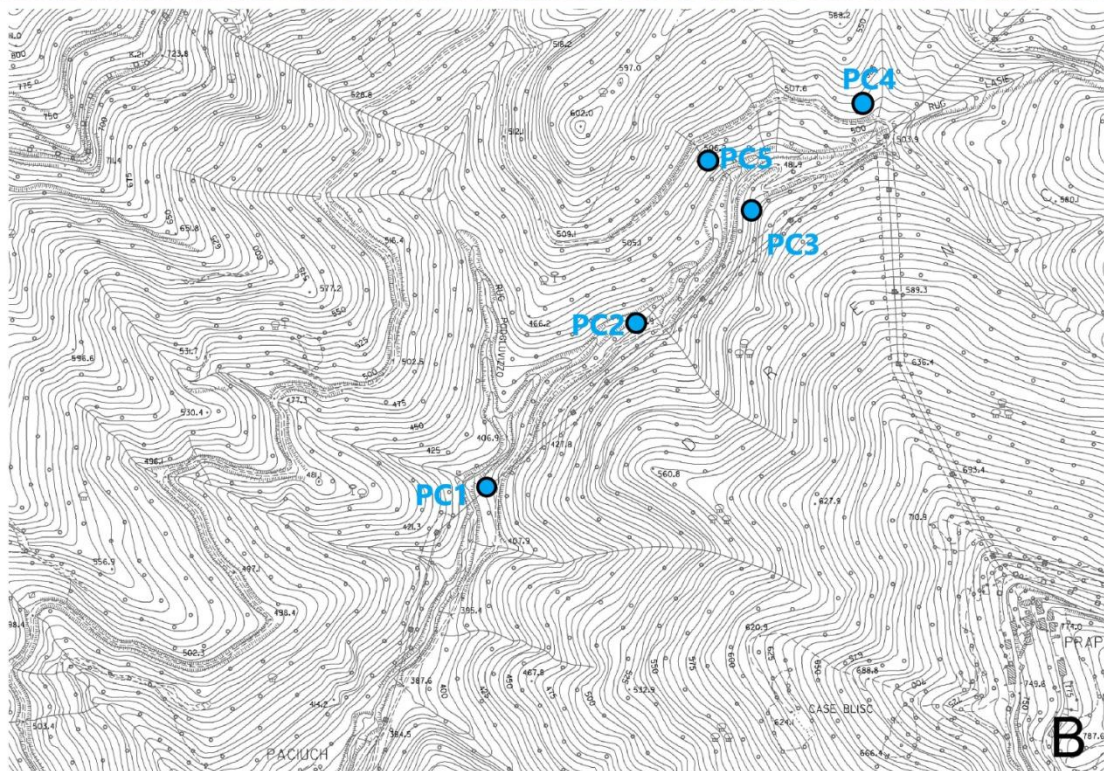
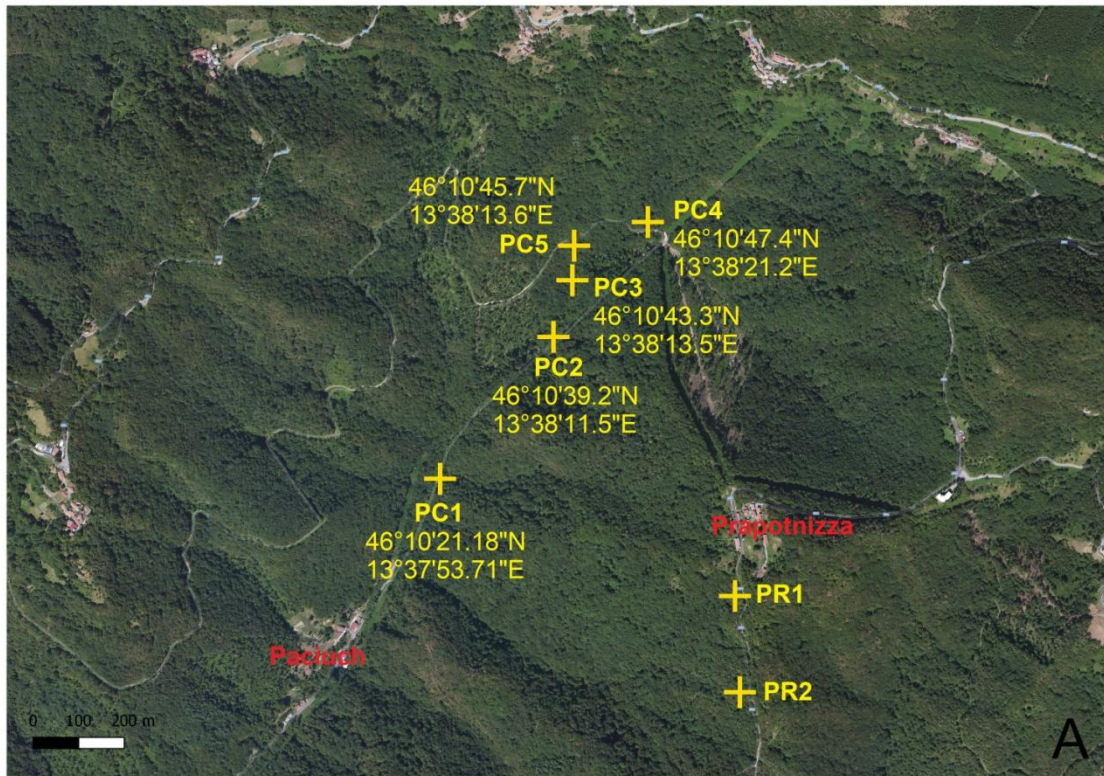
ALLEGATO 20 - Distribuzione dei campionamenti in località Peuma (Comune di Gorizia) – A) Immagine satellitare; B) Carta tecnica regionale 1:5000



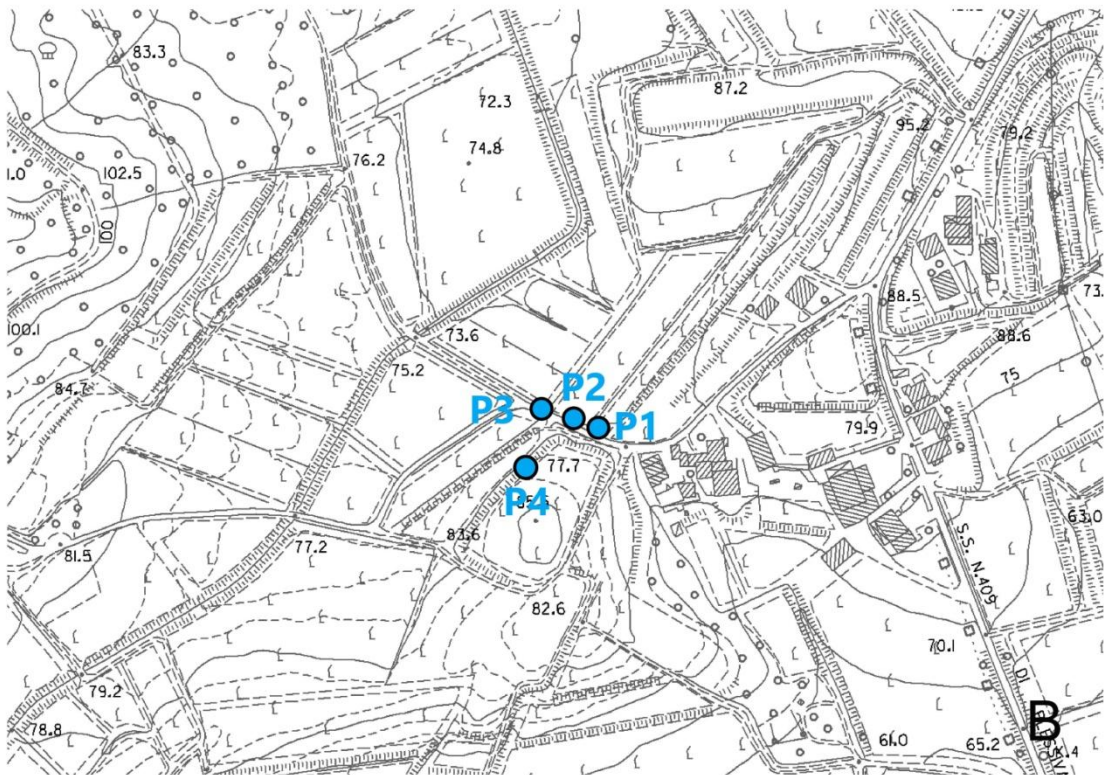
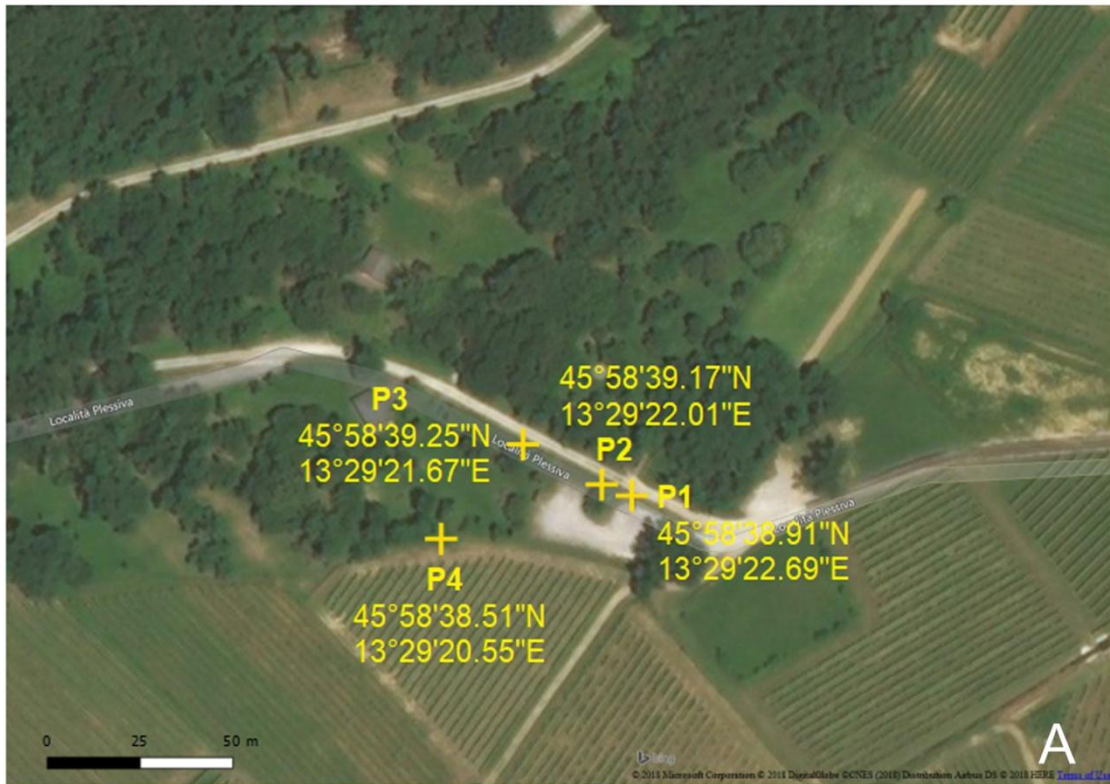
ALLEGATO 21 - Distribuzione dei campionamenti in località Prapotnizza (comune di Drenchia) A) Immagine satellitare; B) Carta tecnica regionale 1:5000



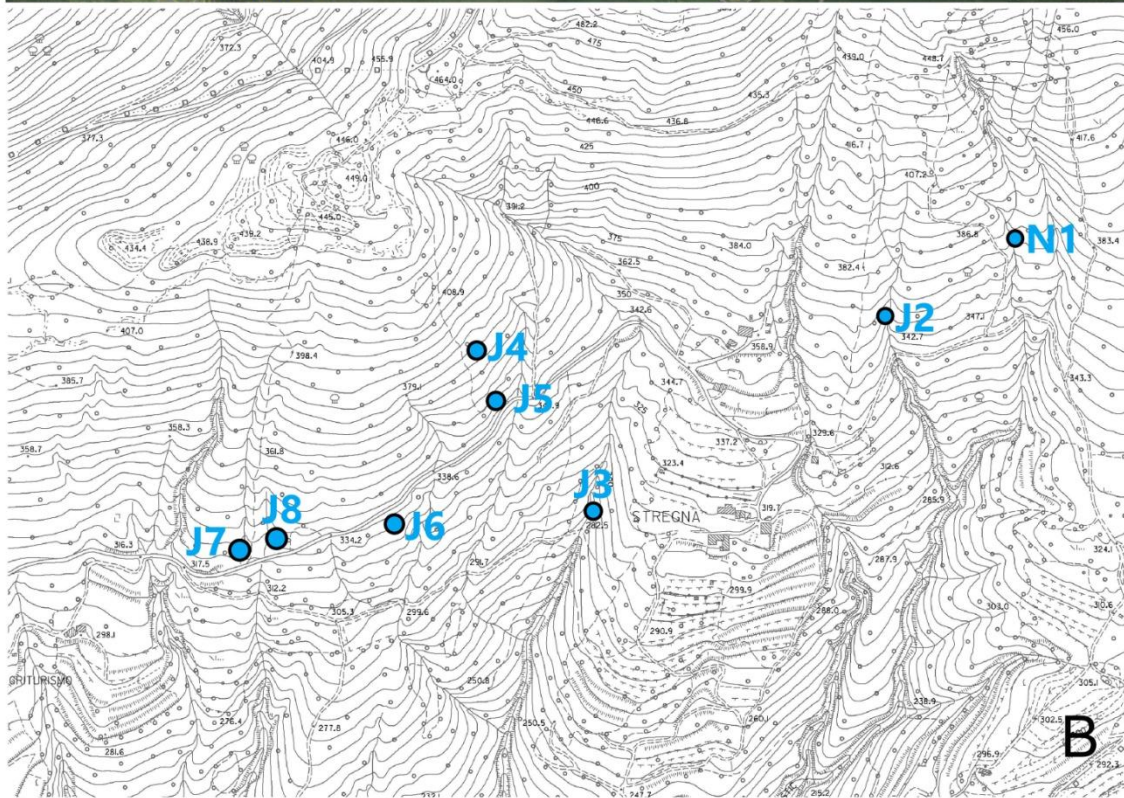
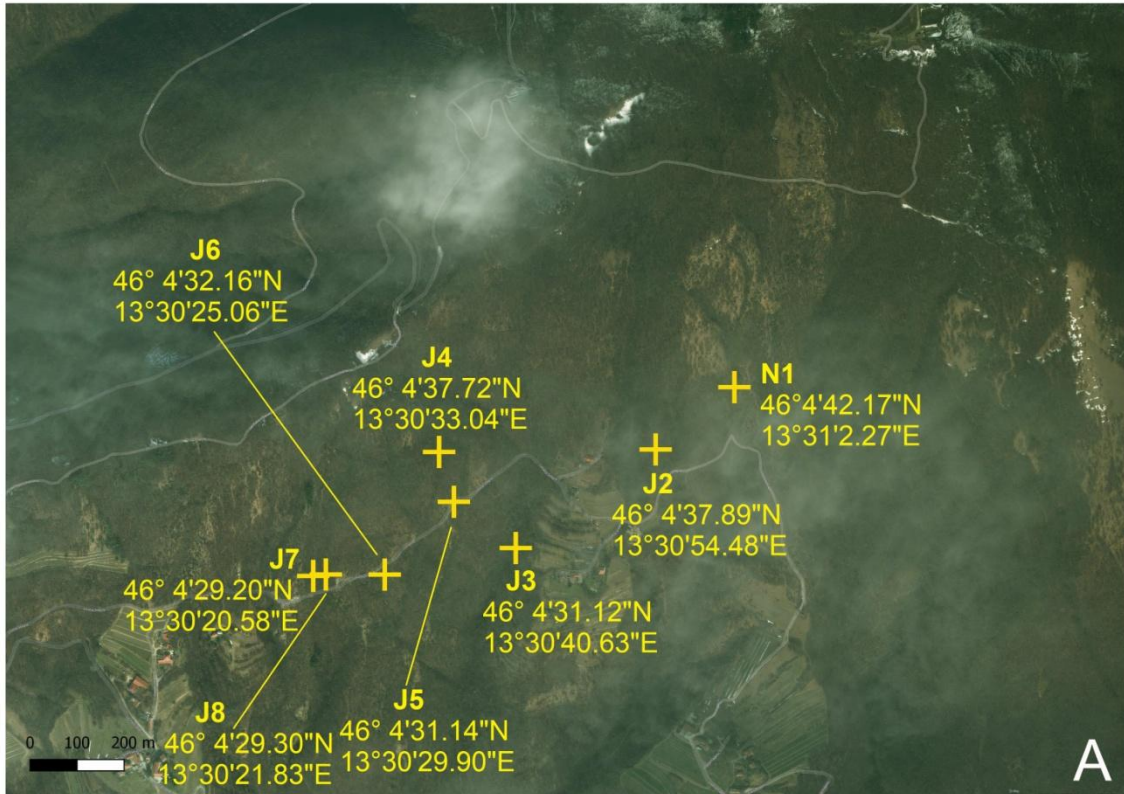
ALLEGATO 22 - Distribuzione dei campionamenti in località San Volfango (comune di Drenchia) A. Immagine satellitare; B) Carta tecnica regionale 1:5000.



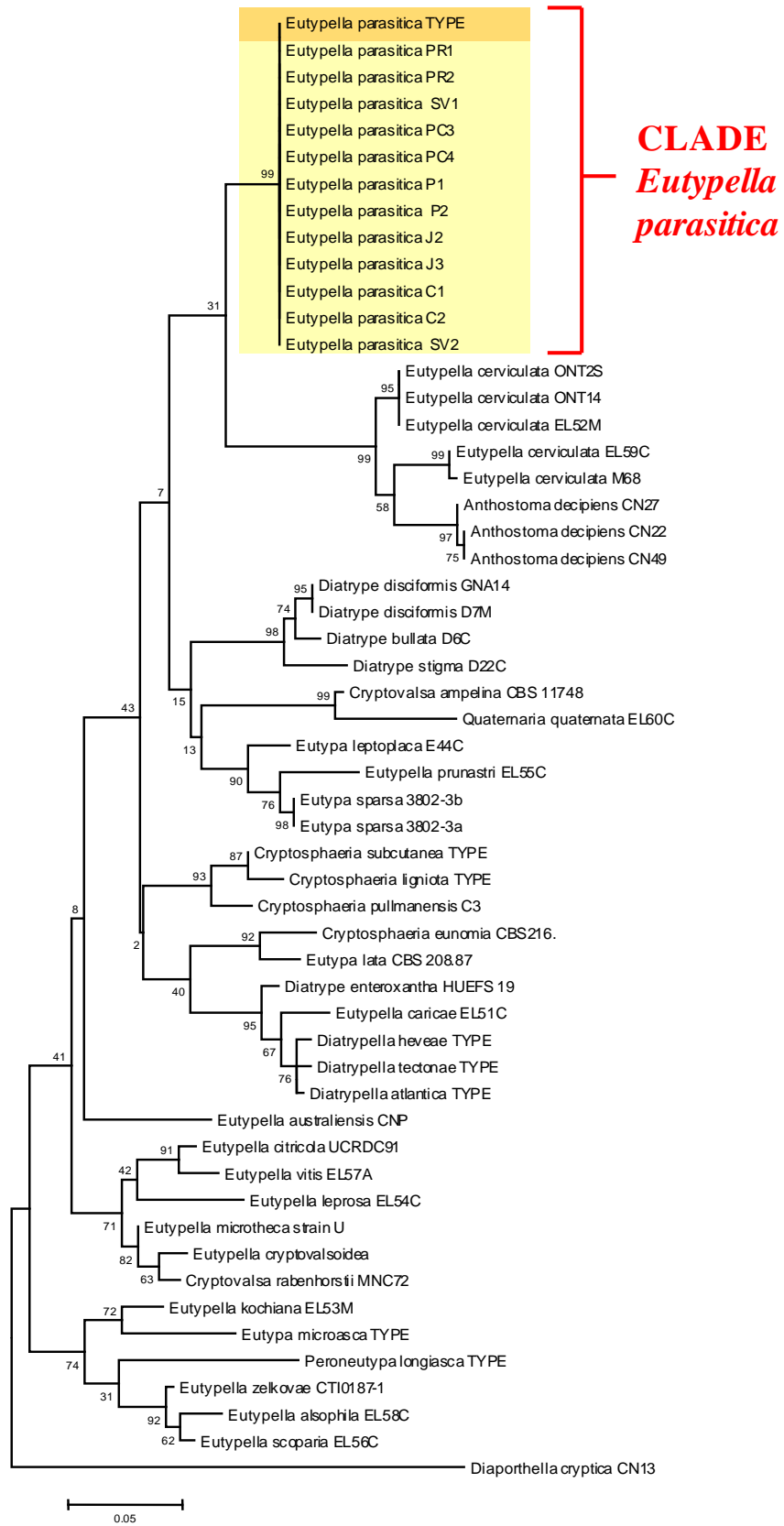
ALLEGATO 23 - Distribuzione dei campionamenti in località Paciuch (comune di Drenchia) A) Immagine satellitare; B) Carta tecnica regionale 1:5000.



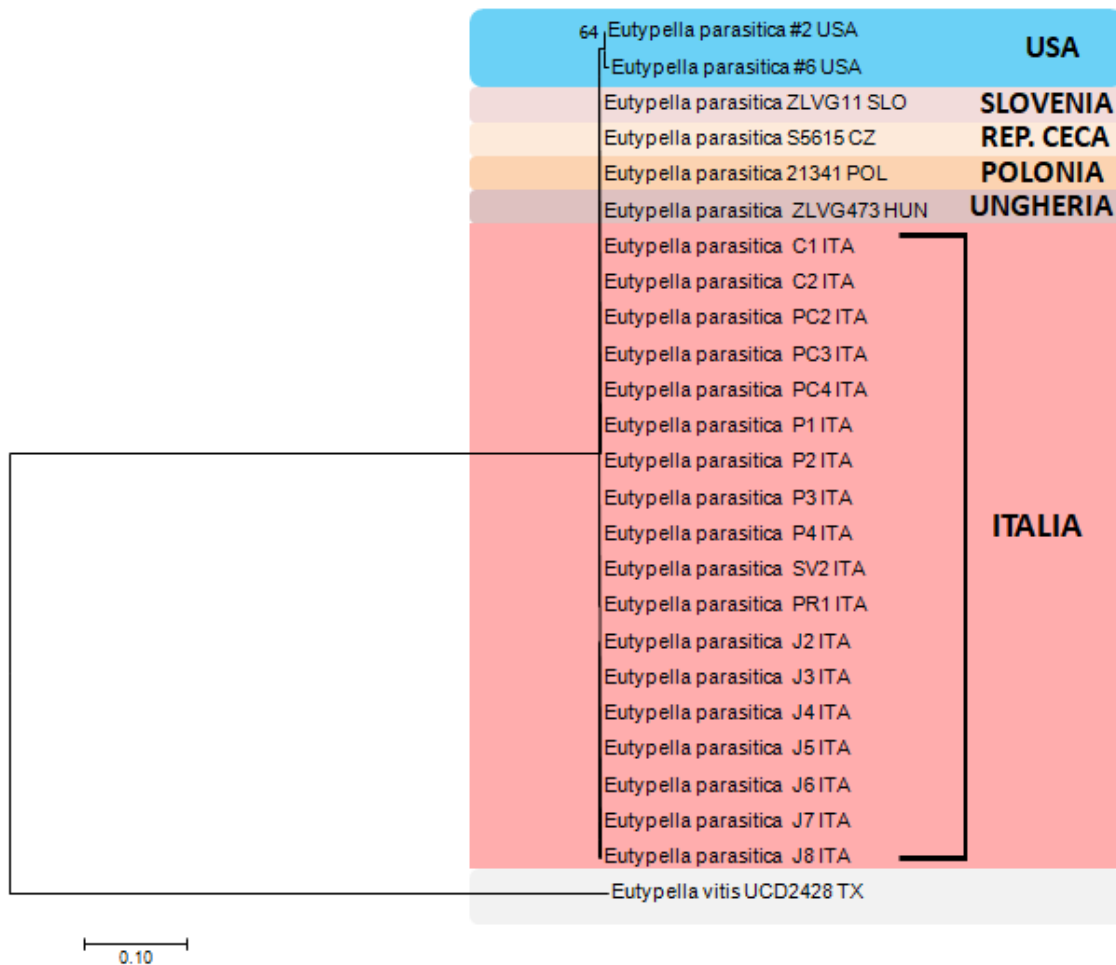
ALLEGATO 24 - Distribuzione dei campionamenti in località Plessiva (comune di Cormons) A) Immagine satellitare; B) Carta tecnica regionale 1:5000



ALLEGATO 25 - Distribuzione dei campionamenti in località Cladrecis (comune di Prepotto) A) Immagine satellitare; B) Carta tecnica regionale 1:5000



ALLEGATO 26 –Molecular Phylogenetic analysis of ITS sequences by Maximum Likelihood method- The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the General Time Reversible model [1]. The tree with the highest log likelihood (-2896.7979) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 55 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 331 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [2].



ALLEGATO 27 - Molecular Phylogenetic analysis of EF *Eutypella* sequences by Maximum Likelihood method - The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the General Time Reversible model [1]. The tree with the highest log likelihood (-657.57) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 25 nucleotide sequences. All positions with less than 70% site coverage were eliminated. That is, fewer than 30% alignment gaps, missing data, and ambiguous bases were allowed at any position. There were a total of 249 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [2].

11. TABELLE E GRAFICI

Data raccolta	Località	Codice campione	Coordinata (X)	Coordinata (Y)	Specie ospite
08/04/2017	Gorizia	C1	45°57'18.47"N	13°36'40.35"E	<i>Acer campestre</i>
08/04/2017	Gorizia	C2	45°57'26.48"N	13°36'40.56"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
09/04/2017	Prapotnizza	PR1	46°10'20.94"N	13°38'30.50"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
09/04/2017	Prapotnizza	PR2	46°10'16.71"N	13°38'30.90"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
09/04/2017	San Volfango	SV1	46°09'58.09"N	13°38'30.55"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
09/04/2017	San Volfango	SV2	46°09'33.73"N	13°38'41.52"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
23/04/2017	Paciuch	PC1	46°10'21.18"N	13°37'53.71"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
23/04/2017	Paciuch	PC2	46°10'39.2"N	13°38'11.5"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
23/04/2017	Paciuch	PC3	46°10'43.3"N	13°38'13.5"E	<i>Acer campestre</i>
23/04/2017	Paciuch	PC4	46°10'47.4"N	13°38'21.2"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
26/09/2017	Plessiva	P1	45°58'38.91"N	13°29'22.69"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
26/09/2017	Plessiva	P2	45°58'39.17"N	13°29'22.01"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
26/09/2017	Plessiva	P3	45°58'39.25"N	13°29'22.01"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
26/09/2017	Plessiva	P4	45°58'38.51"N	13°29'20.55"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
29/10/2017	Cladrecis	N1	46°4'42.17"N	13°31'2.27"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
29/10/2017	Cladrecis	J2	46°4'37.89"N	13°30'54.48"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
29/10/2017	Cladrecis	J3	46°4'31.12"N	13°30'40.63"E	<i>Acer campestre</i>
29/10/2017	Cladrecis	J4	46°4'37.72"N	13°30'33.04"E	<i>Acer campestre</i>
29/10/2017	Cladrecis	J5	46°4'31.12"N	13°30'29.90"E	<i>Acer campestre</i>
29/10/2017	Cladrecis	J6	46°4'32.16"N	13°30'25.06"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
29/10/2017	Cladrecis	J7	46°4'29.20"N	13°30'20.58"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>
29/10/2017	Cladrecis	J8	46°4'29.30"N	13°30'21.83"E	<i>Acer pseudoplatanus</i>

TABELLA 1 - Scheda di campionamento

SCHEDA DI RILEVAMENTO N°1 Loc. Peuma (Comune di Gorizia)			
Coordinate della località principale	Esposizione prevalente	Substrato	Descrizione della località
45°56'44.1"N 13°37'30"E	Ovest	Flysch eocenico, suolo ben sviluppato argilloso	Parco pubblico in riva al fiume Isonzo
CODICE CAMPIONE	SPECIE	OSSERVAZIONI	LUNGHEZZA CANCRO
C1	<i>A. campestre</i>	bosco in riva all'Isonzo, lesione cancerosa al colletto, pianta sana	30 cm
C2	<i>A. pseudoplatanus</i>	pianta ornamentale di parco. Cancro molto esteso ed evidente	75 cm

TAB. 2 – Scheda di rilevamento N°1 – Località Peuma – Comune di Gorizia

SCHEDA DI RILEVAMENTO N°2 Comune di Drenchia			
Coordinate della località principale	Esposizione prevalente	Substrato	Descrizione della località
46°11'0.1"N 13°38'10.2"E	Ovest/Sud ovest	Substrato: calcare marnoso, flysch	Aceri frassineti tipici di forra
CODICE CAMPIONE	SPECIE	OSSERVAZIONI	LUNGHEZZA CANCRO
PR1	<i>A. pseudoplatanus</i>	pianta bordo strada, cancro molto esteso dal colletto a 1 metro e 20 dal suolo, pianta in buona salute	110 cm
PR2	<i>A. pseudoplatanus</i>	pianta bordo strada, cancro poco evidente al colletto	62 cm
SV1	<i>A. pseudoplatanus</i>	pianta a 30 metri dalla strada su dirupo, cancro molto esteso ed evidente a circa 4 metri di altezza	120 cm
SV2	<i>A. pseudoplatanus</i>	pianta bordo strada, cancro poco evidente al colletto, non si evidenziano deperimenti	35cm

PC1	<i>A. pseudoplatanus</i>	rami epicormici, pianta deperente e inclinata, cancro poco evidente a circa 130 cm dal suolo	60cm
PC2	<i>A. pseudoplatanus</i>	ceppaia, pianta sana, polloni vicini con lesioni al colletto e chioma rada deperente, cancro molto esteso ed evidente al colletto	120cm
PC3	<i>A. campestre</i>	pianta sana, rami epicormici sotto alla lesione, cancro evidente a circa 2 metri di altezza dal suolo a partire da una vecchia branca	90cm
PC4	<i>A. pseudoplatanus</i>	pianta sana, su ceppaia, cancro non evidente	47cm

TAB. 3 – Scheda di rilevamento N°2 – Comune di Drenchia

SCHEDA DI RILEVAMENTO N°3 Località Plessiva (Comune di Cormons)			
Coordinate della località principale	Esposizione prevalente	Substrato	Descrizione della località
45°58'37.1"N 13°29'50.7"E	Sud	Flysch eocenico, suolo argilloso ben sviluppato	Parco pubblico: “Bosco di Plessiva”
CODICE CAMPIONE	SPECIE	OSSERVAZIONI	LUNGHEZZA CANCRO
P1	<i>A. pseudoplatanus</i>	pianta ornamentale di parco, sana, cancro al colletto	60cm
P2	<i>A. pseudoplatanus</i>	pianta ornamentale di parco, sana, cancro al colletto	52cm
P3	<i>A. pseudoplatanus</i>	pianta ornamentale di parco, sana, cancro al colletto	42cm
P4	<i>A. pseudoplatanus</i>	pianta ornamentale di parco, sana, cancro al colletto	48cm

TAB. 4 – Scheda di rilevamento N°3 – Località Plessiva – Comune di Cormons

SCHEDA DI RILEVAMENTO N°2 Loc. Cladrecis (Comune di Prepotto)			
Coordinate della località principale	Esposizione prevalente	Substrato	Descrizione della località
46°04'16.2"N 13°30'02.7"E	Sud-Sud Est	Substrato: calcare marnoso, flysch	Acero frassineti con carpino nero e tiglio
CODICE CAMPIONE	SPECIE	OSSERVAZIONI	LUNGHEZZA CANCRO
N1	<i>A. pseudoplatanus</i>	Pollone ancora vivo ma schiantato al suolo, rottura dovuta al cancro stesso molto esteso	110 cm
J2	<i>A. pseudoplatanus</i>	cancro esteso, pianta deperente	65cm
J3	<i>A. campestre</i>	cancro a 120cm dal suolo, molto evidente	38cm
J4	<i>A. campestre</i>	Pollone ceppaia, cancro evidente a 2 metri dal suolo	52cm
J5	<i>A. campestre</i>	Pollone ceppaia, cancro evidente a 2 metri dal suolo. Cancro su pollone gemello del precedente	47cm
J6	<i>A. pseudoplatanus</i>	Cancro molto esteso al colletto	74cm
J7	<i>A. pseudoplatanus</i>	Cancro molto esteso al colletto	70cm
J8	<i>A. pseudoplatanus</i>	ceppaia deperente, cancro evidente al colletto	82cm

TAB. 5 – Scheda di rilevamento N°4 – Località Cladrecis – Comune di Prepotto

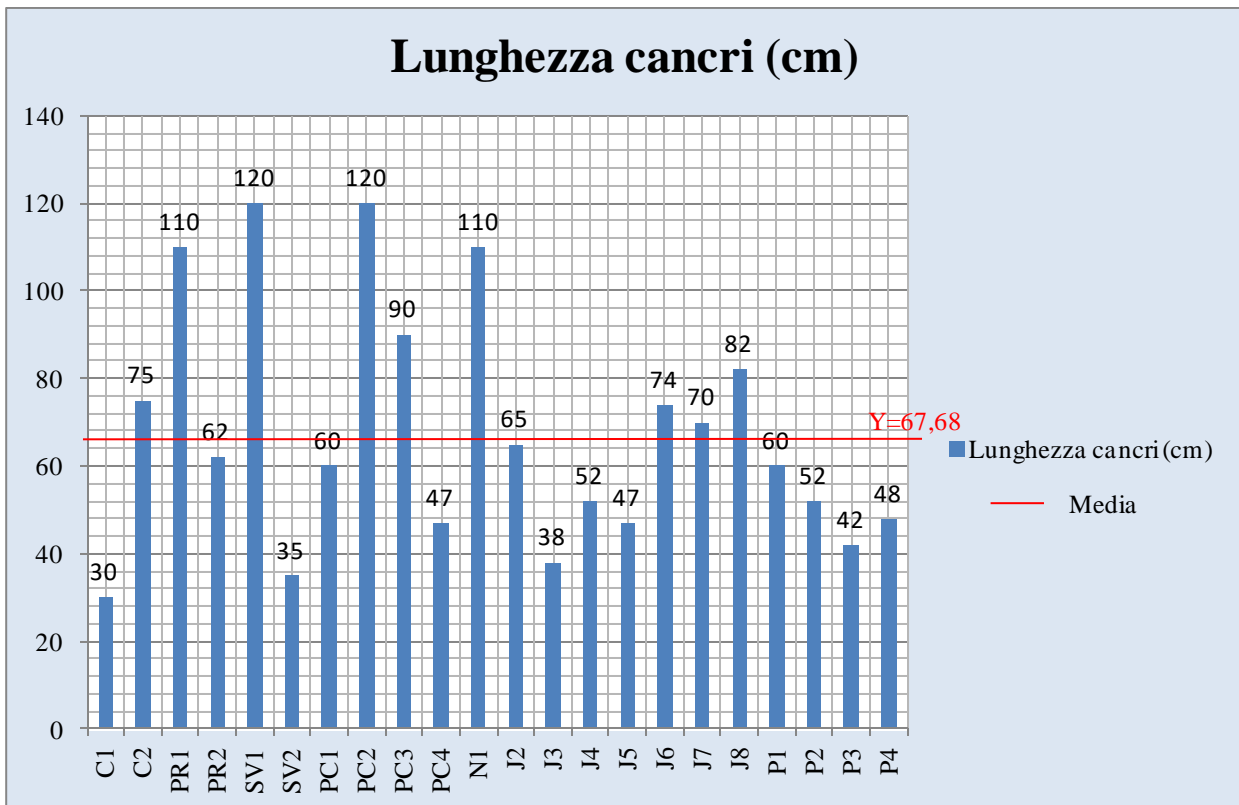
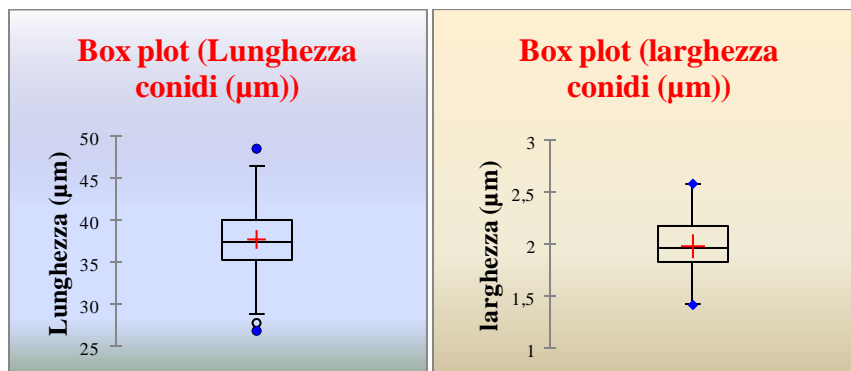


GRAFICO 1 – Distribuzione longitudinale in lunghezza dei cancri campionati

	conidi lunghezza (µm)	conidi larghezza (µm)
1	27,833	2,010
2	36,337	2,178
3	38,958	1,669
4	36,883	1,966
5	37,167	2,362
6	34,107	1,885
7	32,422	1,965
8	44,863	1,618
9	28,869	1,704
10	39,077	1,931
11	36,703	1,555
12	37,089	1,837
13	37,864	1,809
14	36,487	2,584
15	37,507	2,158
16	37,014	1,582
17	39,945	2,178
18	34,773	2,266
19	26,897	1,789
20	42,182	1,483
21	35,322	1,416
22	45,649	1,951
23	43,939	2,166

24	36,198	2,325
25	34,946	2,051
26	45,008	1,908
27	41,736	2,219
28	42,273	1,870
29	34,103	2,233
30	38,862	2,022
31	46,401	2,065
32	39,828	1,939
33	31,541	2,368
34	30,313	1,658
35	38,277	1,845
36	37,020	1,899
37	48,540	1,829
38	43,146	2,156
39	35,564	2,102
40	35,008	1,939
41	37,980	1,603
42	35,267	2,031
43	38,435	2,137
44	37,400	1,738
45	41,192	1,963
46	38,863	2,368
47	31,373	1,972
48	39,816	2,198
49	44,693	2,329
50	36,136	2,260
Media lunghezza (μm)		Media larghezza (μm)
37,756		1,982
Min lunghezza (μm)		Min larghezza (μm)
26,897		1,416
Max lunghezza (μm)		Max larghezza (μm)
48,540		2,584
Dev. Stand. lung. (μm)		Dev. Stand. Larg. (μm)
4,735		0,259

TAB. 6 – Misure conidi di *Eutypella parasitica*



GRAF. 2 e 3 - Box plot di lunghezza e larghezza dei conidi ottenuti dalla misura di n° 50

CODICE CAMPIONE	SPECIE	CORRISPONDENZA
CBS 210.39	<i>Eutypella parasitica</i> R.W. Davidson & R.C. Lorenz	TYPE: (Gen Bank code:NR_145214.1)
C1	<i>E. parasitica</i>	100%
C2	<i>E. parasitica</i>	100%
PC2	<i>E. parasitica</i>	100%
PC3	<i>E. parasitica</i>	100%
PC4	<i>E. parasitica</i>	100%
PC5	<i>E. parasitica</i>	100%
PR1	<i>E. parasitica</i>	100%
PR2	<i>E. parasitica</i>	100%
SV1	<i>E. parasitica</i>	100%
SV2	<i>E. parasitica</i>	100%
J2	<i>E. parasitica</i>	100%
J3	<i>E. parasitica</i>	100%
J4	<i>E. parasitica</i>	100%
J5	<i>E. parasitica</i>	100%
J6	<i>E. parasitica</i>	100%
J7	<i>E. parasitica</i>	100%
J8	<i>E. parasitica</i>	100%
P1	<i>E. parasitica</i>	100%
P2	<i>E. parasitica</i>	100%
P3	<i>E. parasitica</i>	100%
P4	<i>E. parasitica</i>	100%

TAB. 7 - Risultati dell' analisi delle sequenze ITS4 confrontate con l'exTYPE di *Eutypella parasitica* depositato in GenBank: CBS 210.39

Codice Campione	Specie	Ospite	Codice di accesso GenBank (ITS)
CN27	<i>Anthostoma decipiens</i> DC. (Nitsche)	<i>Corylus avellana</i>	KP205475
CN22	<i>Anthostoma decipiens</i> DC. (Nitsche)	<i>Corylus avellana</i>	KP205473
CN49	<i>Anthostoma decipiens</i> DC. (Nitsche)	<i>Corylus avellana</i>	KP205479
CBS 240.87	<i>Cryptosphaeria subcutanea</i> (Wahlenb.) Rappaz	<i>Salix</i> sp.	NG_058925
CBS 117485	<i>Cryptovalsa ampelina</i> (Nitsche) Fuckel	<i>Vitis vinifera</i>	AY920391
MNC72	<i>Cryptovalsa rabenhorstii</i> (Nitschke) Sacc.	<i>Citrus</i> sp.	KR605649
CN13	<i>Diaporthella</i> sp.	<i>Corylus avellana</i>	KP205484
GNA14	<i>Diatrype disciformis</i> (Hoffm.) Fr.	<i>Alnus</i> sp.	KR605644
HUEFS 192141	<i>Diatrype enteroxantha</i> (Sacc.) Berl.	N/A	KM396622
HUEFS 194228	<i>Diatrypella atlantica</i> D.A.C. Almeida, Gusmao & A.N. Mill.	N/A	NR_153994*
MFLU 17-1216	<i>Diatrypella heveae</i> Sen wana, Pgookamsak & K.D. Hyde	<i>Hevea brasiliensis</i>	NR_154046*
MFLU 15-3430	<i>Diatrypella tectonae</i> Doilom, O.J. Shang & K.D. Hyde	<i>Tectona grandis</i> Linn. f.	NR_154029*
CBS 208.87	<i>Eutypa lata</i> (Pers.) Tul. & C. Tul.	<i>Vitis vinifera</i>	DQ006927
E44C	<i>Eutypa leptoplaca</i> (Durieu & Mont.) Rappaz	<i>Arundo donax</i>	AJ302453
BAFC 3050	<i>Eutypa microasca</i> E. Grassi & Carmaràn	N/A	NR_153990*
EL58C	<i>Eutypella alsophila</i> (Durieu & Mont.) Berl.	<i>Arthrocnemum fruticosum</i>	AJ302467
CNP03	<i>Eutypella australiensis</i> Trouillas, Sosnowski & Gubler	<i>Acacia longifolia</i> subsp. <i>sophorae</i>	HM581945
EL51C	<i>Eutypella caricae</i> (De Not.) Berl.	<i>Ficus carica</i>	AJ302460
EL52M	<i>Eutypella cerviculata</i> (Fr.) Sacc.	<i>Alnus glutinosa</i>	AJ302461
EL59C	<i>E. cerviculata</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	AJ302468
M68	<i>E. cerviculata</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	JF340269
ONT14	<i>E. cerviculata</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	N/A
ONT2S	<i>E. cerviculata</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	N/A
UCRDC91	<i>Eutypella citricola</i> Speg.	<i>Citrus paradisi</i>	KF620375

HVFIG05	<i>Eutypella cryptovalsoidea</i> Trouilla, W.M. Pitt & Gubler	<i>Vitis vinifera</i>	HQ692574
EL53M	<i>Eutypella kochiana</i> Rehm.	<i>Atriplex halimus</i>	AJ302462
EL54C	<i>Eutypella leprosa</i> (Pers.) Berl.	<i>Tilia sp.</i>	AJ302463
UCRDC09	<i>Eutypella microtheca</i> Trouillas, W.M. Pitt & Gubler	<i>Citrus paradisi</i>	KF620384
CBS 210.39	<i>Eutypella parasitica</i> R.W. Davidson & R.C. Lorenz	<i>Acer saccharum</i>	NR_145214*
C1**	<i>E. parasitica</i>	<i>Acer campestre</i>	N/A
C2**	<i>E. parasitica</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	N/A
J2**	<i>E. parasitica</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	N/A
J3**	<i>E. parasitica</i>	<i>Acer campestre</i>	N/A
P1**	<i>E. parasitica</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	N/A
P2**	<i>E. parasitica</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	N/A
PC2**	<i>E. parasitica</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	N/A
PC3**	<i>E. parasitica</i>	<i>Acer campestre</i>	N/A
PR1**	<i>E. parasitica</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	N/A
PR2**	<i>E. parasitica</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	N/A
SV1**	<i>E. parasitica</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	N/A
SV2**	<i>E. parasitica</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	N/A
EL55C	<i>Eutypella pnunastri</i> (Pers.) Sacc.	<i>Prunus avium</i>	AJ302464
EL56C	<i>Eutypella scoparia</i> (Schwein.) Ellis & Everh.	<i>Robinia pseudoacacia</i>	AJ302465
EL57A	<i>Eutypella vitis</i> (Schwein.) Ellis & Everh.	<i>Vitis labrusca</i>	AJ302466
CTI0187-1	<i>Eutypella zelkova</i> Henn.	<i>Zelkova serrata</i>	KU641794
MFLU 17-1217	<i>Peroneutypa longiasca</i> Senwanna, Phookamsak & K.D. Hyde	<i>Hevea brasiliensis</i>	NR_154386*
MFLU 16-1441	<i>Peroneutypa mackenziei</i> Q.J. Shang, Phook. & K.D. Hyde	N/A	NR_154363*
EL60C	<i>Quatemaria qua temata</i> (Pers.) J. Schrot.	N/A	AJ302469

TAB. 8 - Campioni utilizzati nell'analisi filogenetica ITS di *Eutypella parasitica*. *Sequenza tipo della specie **isolati dello studio

Codice campione	Specie	Ospite	Provenienza
#2	<i>Eutypella parasitica</i>	<i>Acer saccharum</i>	USA
#6	<i>E. parasitica</i>	<i>A. saccharum</i>	USA
ZLVG 11	<i>E. parasitica</i>	<i>A. campestre</i>	SLOVENIA
S 56.15	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	REPUBBLICA CECA
ZLVG 473	<i>E. parasitica</i>	<i>A. campestris</i>	UNGHERIA
21341	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	POLONIA
C1*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. campestre</i>	ITALIA
C2*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
J2*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
J3*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. campestre</i>	ITALIA
J4*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. campestre</i>	ITALIA
J5*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. campestre</i>	ITALIA
J6*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
J7*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
J8*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
P1*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
P2*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
P3*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
P4*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
PC2*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
PC3*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. campestre</i>	ITALIA
PC4*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
PR1*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
SV2*	<i>E. parasitica</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	ITALIA
UCD2428TX	<i>E. vitis</i>	<i>Vitis vinifera</i>	N/A

TAB. 9 - Campioni utilizzati nell'analisi filogenetica delle sequenze EF di *Eutypella parasitica* *isolati dello studio

12. RINGRAZIAMENTI

Fin dalla mia infanzia ero attratto dal mondo della natura, trascorrevi le mie giornate a leggere i libri di botanica, che trovavo nell'antica biblioteca del nonno e mi soffermavo ad osservare le piante del mio giardino, particolarmente ricco di essenze.

Ho avuto la fortuna di condividere la passione per questa disciplina con mia nonna Maria Hugues, che purtroppo è venuta a mancare da tempo. E' la prima persona che desidero ringraziare. Avevo pochi mesi di vita e già mi portava con sé nei giardini pubblici della città di Gorizia, in occasione di una ricerca sulle piante spontanee nelle aree verdi, che stava svolgendo per le scuole. Ricordo che mi faceva tenere in mano i campioni di un erbario ed ero molto incuriosito dalla varietà di forme e colori. Il destino mi ha portato a studiare proprio a Padova, nella stessa facoltà dove lei, nel 1954, fu la prima donna a conseguire la laurea in Scienze agrarie.

Ho condiviso questo interesse anche con i miei genitori, che, fin dai primi mesi di vita, mi hanno accompagnato in montagna e spesso nei luoghi oggetto della mia tesi. In queste occasioni ho sviluppato un forte interesse nell'osservare l'ambiente boschivo e la sua trasformazione durante l'avvicinarsi delle stagioni. Già a cinque anni riuscivo a riconoscere i nomi degli alberi e sfidavo il papà a controllare sui libri se rispondevo esattamente.

Sono molto fiero e conservo con tanta emozione il primo erbario che ho realizzato con la collaborazione della mia nonna Maria. Con lei ho imparato a distinguere le caratteristiche della pianta e le sue parti. Ricordo che mi riprendeva se indicavo in modo sbagliato qualche denominazione. Grazie ai suoi consigli avuti da bambino, è stato semplice e divertente creare l'erbario, consegnato all'esame di botanica durante la triennale all'Università di Trieste, che mi ha distinto con la lode in questa materia.

Gli anni passano, le tecnologie migliorano e ora la classificazione avviene anche in maniera più semplificata grazie ai nuovi sistemi interattivi. A conclusione del mio percorso di laurea triennale, infatti, ho svolto un impegnativo lavoro di tesi sulla classificazione di tutte le piante spontanee della città di Pordenone, collaborando alla creazione di un portale interattivo, che ancora oggi è visibile ed utilizzabile al seguente link: <http://dryades.units.it/pordenone/>.

Un ringraziamento particolare per la produzione del presente elaborato va al Prof. Dušan Jurc. Mi ha dato la possibilità di effettuare questo compito nelle mie zone di provenienza. La ricerca, seppur lunga e a volte difficile, è stata affascinante e molto stimolante dal punto di vista formativo e professionale. In questi quasi due anni di

lavoro, ho potuto sperimentare metodi e procedure di laboratorio che mi hanno avvicinato e istruito sullo studio della patologia forestale, argomento veramente appassionante.

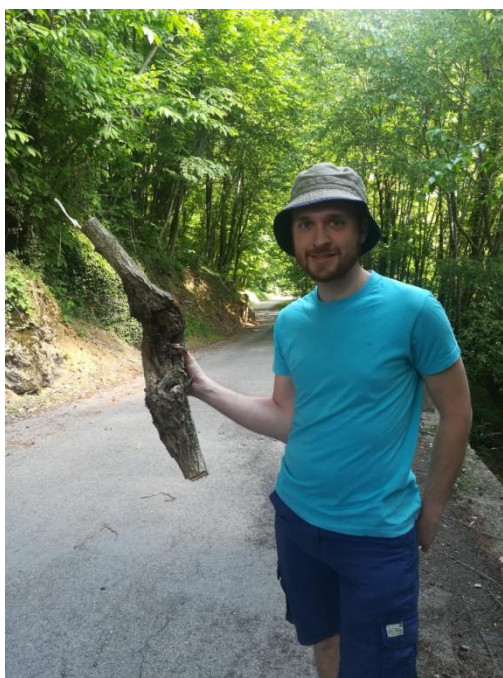
Ringraziamenti speciali vanno anche al Dott. Nikica Ogris, alla Dott.ssa Barbara Piškur, alla Dott.ssa Genny Fanchin, e a Severino Zanella per avermi supportato dall'inizio alla fine nel percorso. Ringrazio per i consigli e le istruzioni ricevute in laboratorio tutti i professori, i tecnici e i ricercatori del TeSAF.

Sono particolarmente grato alla mia fidanzata Maria Paola, che mi ha sostenuto ogni giorno e mi ha accompagnato anche nei luoghi più impervi del Friuli, aiutandomi durante i campionamenti.

Esprimo gratitudine anche agli altri tesisti e borsisti di Patologia, perché ho condiviso con loro bellissimi momenti in laboratorio, fatti di scambi, aiuti e consigli sia nel lavoro e sia nella stesura della tesi.

Ringrazio i miei amici Mickey, Daniel ed Ermes con i quali ho spesso condiviso opinioni e discusso su argomenti oggetto di tesi.

Infine esprimo un grazie a tutti i familiari e agli altri amici, il cui elenco sarebbe lunghissimo, per essermi stati sempre vicini durante questi anni di Università.



Legnaro, 30 ottobre 2018

Carlo