

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dip. Territorio e Sistemi Agro-Forestali
Dip. di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Corso di laurea in Tecnologie Forestali e Ambientali

Ruolo di *Pityophthorus juglandis* (Coleoptera,
Curculionidae) nei meccanismi di diffusione del fungo
fitopatogeno *Geosmithia morbida*

Relatore

Prof. Massimo Faccoli

Correlatore

Prof. Lucio Montecchio

Dott. Mauro Simonato

Laureanda Giulia Sbrizza

Matricola n. 1026211

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

INDICE.

| | |
|---|-----|
| INDICE..... | III |
| INDICE DELLE FIGURE..... | V |
| INDICE DELLE TABELLE..... | VI |
| RIASSUNTO..... | VII |
| ABSTRACT..... | IX |
| 1. INTRODUZIONE..... | 1 |
| 1.1. <i>Le specie invasive</i> | 1 |
| 1.2. <i>I coleotteri scolitidi</i> | 3 |
| 1.3. <i>Bio-ecologia degli scolitidi floematici</i> | 4 |
| 1.4. <i>La simbiosi tra scolitidi floematici e funghi</i> | 6 |
| 1.5. <i>Lo scolitide del noce nero (Walnut Twig Beetle, WTB): Pityophthorus juglandis</i> | 7 |
| 1.6. <i>Geosmithia morbida e il cancro rameale del noce (Thousand Cankers Disease, TCD)</i> | 13 |
| 1.7. <i>Distribuzione nativa e successive introduzioni di WTB e TCD</i> | 19 |
| 2. OBIETTIVI DEL LAVORO..... | 26 |
| 3. MATERIALI E METODI..... | 27 |
| 3.1. <i>Il campionamento</i> | 27 |
| 3.2. <i>Il prelievo, l'allevamento e la conservazione di P. juglandis</i> | 29 |
| 3.3. <i>Le colture, la purificazione e l'identificazione di G. morbida e degli altri funghi ad essa associati</i> | 31 |
| 3.4. <i>Le analisi genetiche su P. juglandis e G. morbida</i> | 33 |
| 3.5. <i>L'analisi statistica</i> | 36 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE..... | 38 |
| 4.1. <i>Numerosità, curve di volo e densità di colonizzazione di P. juglandis</i> | 38 |
| 4.2. <i>Isolamento dei funghi associati a P. juglandis tramite colture fungine</i> | 44 |
| 4.3. <i>Identificazione di G. morbida da P. juglandis mediante analisi genetica</i> | 52 |

| | |
|--|----|
| 5. CONCLUSIONI..... | 57 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 60 |
| 7. SITOGRAFIA..... | 69 |
| RINGRAZIAMENTI..... | 70 |
| APPENDICE A – Preparazione del PDA..... | 71 |
| APPENDICE B – Protocollo di estrazione del DNA, metodo <i>salting out</i> | 72 |
| APPENDICE C – La reazione a catena della polimerasi, PCR e <i>nested</i> -PCR..... | 73 |
| APPENDICE D – L'elettroforesi su gel..... | 75 |
| APPENDICE E – Il processo di purificazione del DNA..... | 76 |

INDICE DELLE FIGURE.

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 – Visione laterale, visione dorsale e particolari di <i>P. juglandis</i> | 8 |
| Figura 1.2 – Comparazione dei caratteri morfologici tra maschi e femmine..... | 10 |
| Figura 1.3 – Corteccia “impallinata” e sistema riproduttivo di <i>P. juglandis</i> | 12 |
| Figura 1.4 – Colonia e particolare di <i>G. morbida</i> | 15 |
| Figura 1.5 – Effetti e sintomi di riconoscimento di TCD..... | 18 |
| Figura 1.6 – Stati americani dove TCD è confermata e areale d’origine di <i>J.</i> <i>nigra</i> | 21 |
| Figura 1.7 – Stati americani in quarantena..... | 22 |
| Figura 1.8 – Siti di individuazione italiani..... | 24 |
| Figura 3.1 – Siti di campionamento in provincia di Vicenza..... | 28 |
| Figura 3.2 – Diversi tipi di eclettori..... | 30 |
| Figura 3.3 – Piastra madre e relative riprese..... | 32 |
| Figura 3.4 – Prodotti di una PCR al transluminatore..... | 36 |
| Figura 4.1 – Curva di volo del totale degli insetti per ogni sito..... | 39 |
| Figura 4.2 – Curva di volo dei maschi per ogni sito..... | 40 |
| Figura 4.3 – Curva di volo delle femmine per ogni sito..... | 40 |
| Figura 4.4 – <i>Bar chart</i> per i tre valori di densità media..... | 42 |
| Figura 4.5 – <i>Bar chart</i> per i tre valori di numerosità media..... | 43 |
| Figura 4.6 – Riprese di alcune specie fungine individuate..... | 46 |
| Figura 4.7 – Riprese di alcune specie di funghi individuati..... | 51 |
| Figura 4.8 – Parte delle sequenze di <i>G. morbida</i> con evidente inserzione puntuale..... | 55 |

INDICE DELLE TABELLE.

| | |
|---|----|
| Tabella 3.1 – Codici degli eclettori e numero delle piante campionate per ogni sito..... | 29 |
| Tabella 4.1 – Eclettori positivi con relativi insetti sfarfallati e altri dati..... | 38 |
| Tabella 4.2 – Eclettori positivi con relativi insetti sfarfallati e densità di colonizzazione..... | 41 |
| Tabella 4.3 – Valori di densità media, deviazione standard, varianza ed errore standard per i tre siti..... | 42 |
| Tabella 4.4 – Valori di numerosità media, deviazione standard, varianza ed errore standard per i tre siti..... | 42 |
| Tabella 4.5 – Dati utili all’ANOVA relativa alla densità..... | 43 |
| Tabella 4.6 – Dati utili all’ANOVA relativa alla numerosità..... | 43 |
| Tabella 4.7 – Numero di piastre totali, presentanti <i>G. morbida</i> e <i>F. solani</i> | 45 |
| Tabella 4.8 – Numero di piastre totali, presentanti <i>Penicillium</i> spp. e <i>T. roseum</i> | 46 |
| Tabella 4.9 – Numero di piastre totali, presentanti <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Cladosporium</i> | 47 |
| Tabella 4.10 – Numero di piastre totali, presentanti <i>Gliocladium</i> spp. e <i>Pythium</i> spp..... | 48 |
| Tabella 4.11 – Numero di piastre totali, presentanti <i>Rhizopus</i> spp. e <i>Beauveria</i> spp..... | 49 |
| Tabella 4.12 – Numero di piastre totali, presentanti <i>Alternaria</i> spp. e <i>Epicoccum</i> spp..... | 50 |
| Tabella 4.13 – Numero di piastre totali, presentanti <i>Mucor</i> spp. e <i>Phoma</i> spp..... | 50 |
| Tabella 4.14 – Riassunto delle specie individuate con relativa percentuale totale e suddivisa tra insetti maschi e femmine..... | 52 |
| Tabella 4.15 – Numero di insetti totali analizzati tramite <i>nested</i> -PCR e con <i>G. morbida</i> | 53 |
| Tabella 4.16 – Confronto tra percentuali totali di presenza del fungo nelle due popolazioni..... | 54 |

RIASSUNTO.

Il fenomeno dell'introduzione di organismi alieni è un processo che avviene ormai da secoli ed è considerato a tutti gli effetti come una minaccia a livello globale. Negli ultimi decenni, il commercio globale, associato al fenomeno dei cambiamenti climatici, ha contribuito a rendere più facile la diffusione e la sopravvivenza di organismi esotici nei paesi di nuova introduzione, determinando un tasso di introduzione di specie aliene sempre più elevato. Tra gli insetti, le specie xilofaghe sono considerate come gli organismi invasivi di maggiore successo grazie alla loro capacità di essere trasportati all'interno di una vasta gamma di materiali legnosi, dove possono sfuggire alle misure di controllo preventivo e superare eventuali condizioni climatiche avverse che si presentano durante gli spostamenti. Una volta entrati e stabiliti all'interno del nuovo ambiente, possono causare gravi danni al patrimonio forestale del paese con conseguenze economiche e ambientali.

Una delle ultime specie introdotte in Italia, è uno scolitide originario degli Stati Uniti, *Pityophthorus juglandis*, vettore del fungo simbionte *Geosmithia morbida*, causa del cancro rameale del noce nero (*Thousand Cankers Disease*, TCD). Nell'areale d'origine la malattia è progredita velocemente, e si teme che, dopo il primo rinvenimento in Italia, la malattia possa avere lo stesso decorso anche in Europa.

Attraverso questo studio, condotto su individui provenienti dalle province di Mantova e Vicenza, primi focolai europei della malattia, si è voluto indagare il ruolo dello scolitide come vettore del fungo, studiando la percentuale totale di vettori, le eventuali differenze tra i sessi, la composizione della flora fungina associata e le possibili diversità a livello genetico tra le due presunte popolazioni italiane, testando parallelamente la bontà di due metodi di individuazione del fungo, uno tramite colture su substrato e l'altro tramite analisi genetica.

I risultati hanno permesso la caratterizzazione genetica delle popolazioni italiane, che non mostrano differenze tra di loro e presentano un'identità completa con quelle dell'areale d'origine americano.

Tramite l'analisi genetica, metodo che si è rivelato il migliore nell'individuazione del fungo, si è visto che quasi la totalità degli individui risulta vettore del fungo e che non sembrano esserci differenze rilevanti tra maschi e femmine.

Infine, dallo studio della flora fungina associata, c'è da sottolineare l'interessante presenza di *Fusarium solani*, che non sembra però essere direttamente collegato alla presenza di *Geosmithia morbida*, e l'individuazione di *Beauveria* sp., fungo entomopatogeno.

ABSTRACT.

Role of *Pityophthorus juglandis* (Coleoptera, Curculionidae) in the dispersal of the pathogen *Geosmithia morbida*.

Invasive alien species introduction involve a high cost for agriculture, horticulture and forestry every year. In the last decades, the faster and more globalized commercial trade, associated with climate change, has facilitated the arrival and the establishment of alien organisms in new countries, with the result of a higher rate of alien species introductions. Among the insects, wood boring and bark beetle are recognized as highly successful invaders as they can be easily transported within any type of woody material, where they can shelter preventive control measures and overcome the adverse climatic conditions. Once they have entered and established in the new country, they can cause severe damage to the indigenous forests, with serious economic and environmental consequences.

Pityophthorus juglandis is one of the last species introduced from the United States. It is a bark beetle and it is the vector of the symbiotic fungus *Geosmithia morbida*, that causes Thousand Cankers Disease of black walnut (TCD). In the native area the disease has progressed quickly and then the first discovery of it in Italy, it is feared that the disease can do the same course in Europe.

Through the study on insects' samples from the provinces of Mantua and Vicenza, the first European population of the disease, we aimed to investigate the role of bark beetle as a vector of the fungus. We analysed the total percentage of vectors, the differences between the sexes, the fungal associated flora's composition and possible diversity at the genetic level between the two alleged Italian populations, testing two parallel methods of detection of the fungus, one by crops on the substrate and the other one through genetic analysis.

The results have enabled the genetic characterization of Italian populations and they have established their own identity complete with those of American native range, but there was no difference between the two present in Italy.

Through genetic analysis, a method that proved to be the best in the fungus's identification, it is seen that almost all of the samples is the carrier of the fungus and there are not appear to be significant differences between males and females. Finally, from the study of fungal flora associated, it is to emphasize the interesting presence of *Fusarium solani*, which does not seem to be directly related to the presence of *Geosmithia morbida*, and the identification of *Beauveria* sp., entomopathogenic fungus.

1. INTRODUZIONE.

1.1. *Le specie invasive.*

Negli ultimi 500 anni le barriere geografiche che per milioni di anni avevano mantenuto una distribuzione quasi statica dei biomi del mondo, sono state erose dalle attività umane e, di conseguenza, le specie selvatiche hanno allargato il loro areale di distribuzione naturale (Richardson et al., 2000), disturbando quindi l'equilibrio tra le specie che si era stabilito nei diversi ecosistemi del globo dopo migliaia di anni di evoluzione (Holmes et al., 2009).

Con la scoperta dell'America e l'inizio dell'Età delle Esplorazioni, l'uomo ha volontariamente e involontariamente spostato organismi tra un continente e l'altro (Mack et al., 2000). Nell'ultimo secolo, l'espansione delle specie trasportate dall'uomo è aumentata considerevolmente, come conseguenza della crescita senza precedenti dei viaggi e del commercio internazionale, causando enormi disturbi agli ecosistemi e gravi problemi di impatto socio-economico (Aukema et al., 2011). Negli ultimi 25 anni il commercio sempre più rapido, consistente e globalizzato, associato al fenomeno dei cambiamenti climatici, ha facilitato la diffusione e la sopravvivenza degli organismi esotici nel paese d'introduzione determinando un tasso di introduzione di specie aliene sempre più elevato (Hulme, 2009).

In tutte le definizioni di "invasività", il fattore cruciale per distinguere un organismo alieno (esotico, non nativo, o non indigeno) da un organismo nativo è dato dall'introduzione dello stesso in una nuova regione (Pysek e Richardson, 2006).

La definizione di "specie aliena", proposta nei principi guida della *Convention on Biological Diversity*, CBD, (2002, Decisione VI/23), prevede che essa sia una specie che si stabilisce al di fuori della sua area naturale e oltre la sua zona di dispersione potenziale (Desprez-Loustau et al., 2010); ancora, una specie è definita "invasiva" o "aliena" nel momento in cui viene introdotta in un ambiente nel quale non è mai stata presente (IUCN, 2000).

Il fenomeno dell'introduzione di organismi alieni è un processo considerato a tutti gli effetti come una minaccia a livello globale.

Le specie aliene possono determinare un'ampia gamma di impatti negativi. Se da un punto di vista ambientale sono in grado di minacciare la diversità biologica attraverso una riduzione della variabilità genetica, modificare i rapporti trofici tra gli organismi nativi e determinare nei casi più gravi l'estinzione di specie endemiche e l'alterazione di habitat ed ecosistemi (Hulme, 2007; Mooney e Cleland, 2000), da un punto di vista economico possono provocare gravi danni all'agricoltura, all'orticoltura e agli ambienti forestali (Vilà et al., 2011; Pimentel et al., 2005). La maggiore o minor aggressività di una specie di nuova introduzione all'interno del nuovo ambiente dipende da numerosi fattori e dinamiche spesso complesse (es. presenza di nicchie vacanti o inutilizzate, assenza di parassiti e predatori, limitata biodiversità locale, possibili disturbi verificatisi prima o durante l'invasione, ecc.) (Mack et al., 2000).

Dalla scoperta dell'America, in Europa sono state registrate circa 10 000 specie aliene, tra le quali i gruppi tassonomici più numerosi sono rappresentati da piante e insetti (DAISIE, 2008). Tra questi ultimi, il gruppo più numeroso è rappresentato dagli xilofagi (per lo più Scolytinae, Cerambycidae e Buprestidae) (Marini et al., 2011; Kirkendall e Faccoli, 2010; Sauvard et al., 2010) oramai considerati come una delle minacce più serie per le foreste a livello mondiale (Brockerhoff et al., 2006a). Essi possono essere facilmente trasportati attraverso il commercio internazionale di prodotti legnosi, quali tronchi, ceppi, legname e soprattutto imballaggi di legno o pallet dove possono sfuggire ai controlli e superare le condizioni climatiche avverse che si presentano durante gli spostamenti (Brockerhoff et al., 2006b). Per questi motivi gli insetti xilofagi sono considerati a tutti gli effetti come il gruppo di specie invasive di maggior successo (Haack, 2006). Per di più, dal punto di vista economico, risultano essere le specie con il più alto impatto potenziale, considerando la loro capacità di danneggiare il materiale legnoso, di portare a morte le piante ospiti e l'alto costo per il loro contenimento (Aukema et al., 2011).

Ciò che preoccupa maggiormente è che alle invasioni biologiche sono strettamente legate malattie infettive emergenti dei vegetali, *Emerging Infectious Diseases*, EIDs. Nel mondo, più della metà delle EIDs delle piante negli ultimi decenni sono state provocate dall'arrivo di agenti patogeni precedentemente non riconosciuti, dato

dal movimento di ceppi virulenti, o dalla comparsa di nuovi ceppi aggressivi (Anderson et al., 2004; Bandyopadhyay e Frederiksen, 1999).

Tra gli agenti patogeni, le infezioni fungine e simil-fungine hanno da sempre svolto un ruolo primario nelle infezioni dei vegetali. Il programma di Monitoraggio delle Malattie Emergenti, ProMED, che rileva le infezioni da fungo nelle piante, mostra un aumento di queste infezioni di 13 volte tra il 1995 e il 2010 (Fisher et al., 2012).

In questo contesto, è importante individuare e studiare in modo tempestivo le nuove introduzioni di insetti potenzialmente dannosi, specie se associati a funghi, soffermandosi particolarmente, in questa sede, su un insetto appartenente al gruppo degli scolitidi xilofagi: *Pityophthorus juglandis* Blackman, coleottero floematico della famiglia Curculionidae, subfamiglia Scolytinae, e vettore del fungo *Geosmithia morbida* Kolarík.

1.2. I coleotteri scolitidi.

Gli scolitidi (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), sono rappresentati in tutto il mondo da poco più di 6000 specie descritte in almeno 225 generi (Knížek e Beaver, 2004). Sono tra gli insetti economicamente ed ecologicamente più importanti nelle foreste del mondo, soprattutto per quanto riguarda boschi di conifere (Raffa et al., 2008; Lieutier, 2004), in quanto attivi sotto corteccia o nel legno sia allo stadio adulto che larvale.

Questa sottofamiglia di curculionidi comprende insetti tra loro molto simili morfologicamente, ma che si differenziano nei rapporti con l'ospite e con l'ambiente in generale.

Generalmente questi sono insetti di piccole o piccolissime dimensioni, dalla forma allungata, per lo più cilindrica e dai colori scuri. In alcune specie, le elitre presentano la parte posteriore declive e fornita di rilievi tegumentali. La struttura degli adulti degli scolitidi rivela una speciale attitudine allo scavo di gallerie nei tessuti corticali e legnosi (Battisti et al., 2013).

Gli scolitidi attaccano usualmente alberi vivi ma indeboliti da siccità, defogliazioni, danni da neve o vento, marciumi radicali o piante recentemente morte o abbattute

ma con floema ancora fresco; solo in caso di elevate densità di popolazioni attaccano anche piante sane, rendendole vulnerabili tramite attacchi di gruppo continuati nel tempo.

Questi coleotteri vengono solitamente suddivisi a seconda delle loro abitudini alimentari in floematici, xilomicetofagi e spermofagi. I primi, conosciuti anche come *bark beetles*, coleotteri della corteccia, utilizzano come cibo e sede di riproduzione i tessuti floematici; i secondi, conosciuti anche come *ambrosia beetles*, coleotteri dell'ambrosia, si nutrono per lo più a spese di funghi con cui sono in simbiosi e che "brucano" all'interno delle gallerie di riproduzione scavate nello xilema; gli ultimi, conosciuti anche come *seed borers*, foratori di semi, si sviluppano a spese di semi o frutti legnosi.

1.3. Bio-ecologia degli scolitidi floematici.

Gli scolitidi floematici o fleofagi, si nutrono a spese del floema e del cambio, tessuti ricchi di carboidrati e sostanze proteiche (Battisti et al., 2013). Queste specie corticicole sono, in genere, le più dannose nelle foreste temperate per la loro capacità di portare in breve tempo a morte gli alberi, arrecando danni alle foreste e al legno.

L'attacco ai tessuti sottocorticali di tronchi freschi non scortecciati, o comunque su piante vive ma indebolite, viene condotto dagli adulti che, in corrispondenza del foro d'entrata, scavano una piazzola detta vestibolo o camera nuziale dove avviene di norma l'accoppiamento.

A seconda che la specie sia monogama o poligama, il sesso dell'insetto che per primo fora la corteccia è diverso; in particolare, se la specie è monogama, è la femmina che scava la piazzola; sarà poi raggiunta dal maschio e scaverà una sola galleria materna. Al contrario, se la specie è poligama, è il maschio ad arrivare per primo; sarà poi raggiunto da 2-12 femmine che provvederanno a scavare singole gallerie materne.

Le gallerie materne sono provviste di nicchie ovigere laterali in cui vengono deposte singolarmente le uova. Queste gallerie hanno diametro costante e sono

libere da rosura e da escrementi; la rosura, inizialmente marrone-rossastra, diventa biancastra con l'approfondirsi della galleria.

L'insieme delle gallerie materne e larvali prende il nome di sistema riproduttivo, la cui conformazione caratteristica è tipica di ciascuna specie.

Dalla schiusa delle uova emergono larve apode, bianche, ricurve, gregarie, con capsula cefalica bruna e dalle piccole dimensioni (4-5 mm). Queste scavano gallerie ortogonali a quella materna, parallele a quelle delle altre larve coetanee, di diametro crescente con l'aumentare di dimensioni degli individui e ricolme di escrementi e di rosura; al termine delle gallerie le larve mature scavano una cella pupale per impuparsi e compiere la metamorfosi.

In seguito, numerosissimi adulti scavano piccoli fori rotondi di sfarfallamento. Gli adulti neo metamorfosati compiono la fase di maturazione sessuale post o pre-sfarfallamento a seconda che la specie sia rispettivamente monogama o poligama. La maturazione delle gonadi prevede un periodo di alimentazione a carico di substrati diversi. In particolare, gli adulti delle specie monogame si nutrono del floema di giovani rametti o germogli di piante della stessa specie della pianta ospite, ma vigorose; ciò significa che abbandonano l'albero di sfarfallamento, andando a indebolire piante vigorose rendendole appetibili per attacchi da parte delle generazioni future. Gli adulti delle specie poligame invece maturano nutrendosi dei resti del floema lasciati dalle larve.

La maturazione varia da qualche giorno a qualche mese per gli individui monogami, mentre gli individui poligami necessitano di una o due settimane. Al termine di questo periodo, gli adulti maturi cercano una nuova pianta indebolita da colonizzare e in cui riprodursi.

Lo sviluppo di una generazione è molto veloce (6-8 settimane) tanto che possono esserci dalle due-tre generazioni all'anno.

Quando la densità di colonizzazione delle cortecce è molto elevata, le femmine di alcune specie possono avviare delle generazioni sorelle, abbandonando cortecce sovraffollate per completare l'ovideposizione su altre parti della pianta o addirittura su altri alberi (Battisti et al., 2013).

Le piante ospiti sono sia conifere sia latifoglie.

In alcuni casi, gli scolitidi floematici sono anche vettori di funghi patogeni, che contribuiscono ad accelerare il processo di alterazione dei tessuti.

1.4. La simbiosi tra scolitidi floematici e funghi.

La diffusa associazione degli scolitidi con i funghi ha sempre catturato l'attenzione degli studiosi (Linnakoski et al., 2012; Kirisits, 2004; Six, 2003; Paine et al., 1997).

Gli scolitidi sono di solito associati con una o più specie fungine, formando anche complessi che mostrano una grande variazione nel tempo e nello spazio relativamente a diversi fattori (Lieutier et al., 2009; Klepzig e Six, 2004; Solheim, 1993).

L'associazione con funghi di diverse specie può essere sia specifica sia casuale, a seconda del rapporto funzionale e il grado di dipendenza tra gli organismi (Linnakoski et al., 2012; Kirisits, 2004; Klepzig e Six, 2004).

Gli scolitidi floematici, che hanno come base per l'alimentazione il floema, non dipendono dalla simbiosi col fungo per il sostentamento e, per questo sono detti anche *true bark beetle*, veri scolitidi della corteccia, ossia scolitidi fleofagi (Harrington, 2005; Kirisits, 2004; Paine et al., 1997; Francke-Grosmann, 1967).

La maggior parte degli scolitidi vede associati funghi del *phylum* Ascomycota appartenenti ai generi *Ophiostoma*, *Grosmannia*, *Ceratocystis*, *Ceratocystiopsis* e *Leptographium*, tutti appartenenti al gruppo morfologicamente omogeneo dei funghi ophiostomatoidi (Davis e Hofstetter, 2011; Kirisits, 2004), detti *blue stain fungi*, ossia funghi azzurranti (Kirisits, 2004; Six, 2003; Francke-Grosmann, 1967; Mathiesen-Käärrik, 1953).

Gli scolitidi hanno evoluto adattamenti morfologici adatti a provvedere al mantenimento della simbiosi di generazione in generazione. Per lo stoccaggio, il trasporto e la trasmissione dei funghi associati, gli scolitidi hanno diverse strutture tegumentali simili ad invaginazioni, concavità poco profonde, pieghe, o peluria associate a cellule ghiandolari, per proteggere e preservare le spore dei funghi simbiotici da fattori ambientali avversi, ed escludere i funghi dannosi o neutri (Harrington, 2005; Francke-Grosmann, 1967; Batra, 1963).

D'altro canto anche gli stessi funghi simbiotici hanno sviluppato un adattamento completo col loro vettore, tanto da esserne completamente dipendenti per il trasporto, la diffusione e la facilitazione nell'inserimento dei tessuti della pianta ospite (Klepzig e Six, 2004; Six, 2003; Malloch e Blackwell, 1993). La maggior parte delle specie produce corpi fruttiferi sessuali sporgenti nelle gallerie dell'insetto e nelle camere pupali, dove hanno più probabilità di essere raccolti dai vettori; le spore sono appiccicose e sagomate in modo tale da consentire più punti di contatto con il vettore. Inoltre, gli strati adesivi della maggior parte delle spore si disperdono in resina ma non in acqua, al fine di garantire un rilascio dal vettore solo su substrati adeguati (Klepzig e Six, 2004; Six, 2003).

In generale, l'associazione da parte dell'insetto con funghi in grado di produrre sostanze tossiche per la pianta è un grande vantaggio per vincere la resistenza della pianta ospite e colonizzarla riproducendosi (Lieutier et al., 2009; Paine et al., 1997). Successivamente, l'accelerazione del deperimento complessivo da parte della componente fungina, il disseccamento della chioma per scompensi idrici e il distacco della corteccia dovuto all'attività di scavo degli insetti determinano il decesso dell'albero attaccato nel giro di poche settimane, alterando anche le caratteristiche morfologiche del legno. Si può quindi affermare che l'azione combinata e simultanea di insetti e funghi porta alla morte della pianta ospite (Berryman, 1972).

1.5. Lo scoltide del noce nero (walnut twig beetle, WTB): *Pityophthorus juglandis*.

Pityophthorus juglandis è un coleottero scoltide floematico poligamo molto minuto (1.5-1.9 mm), dal colore bruno-giallastro. È una delle circa 120 specie appartenenti al genere *Pityophthorus*, il genere di scoltidi corticicoli più numeroso del Nord America (Furniss e Carolin, 1977).

Può essere facilmente distinto da altri membri del genere da diverse caratteristiche morfologiche. La specie si differenzia per la presenza di 4-6 file concentriche di asperità sul pronoto, solitamente interrotte e sovrapposte lungo la

linea mediana. La declività alla fine dell'elitra è accentuata, opaca, superficialmente bisolcata e, all'apice, è generalmente appiattita e minutamente granulata.

La fronte è da piana a piano-concava, leggermente rialzata in corrispondenza del margine epistomale, mentre i bordi laterali sono fortemente arrotondati.

La superficie dell'esoscheletro è liscia, lucente, finemente e uniformemente punteggiata; la peluria è piuttosto abbondante, più lunga ai margini; le setole più lunghe sono pari alla metà della distanza tra gli occhi.

Le clave delle antenne sono doppiamente marcate da bande scure lineari (Figura 1.1).

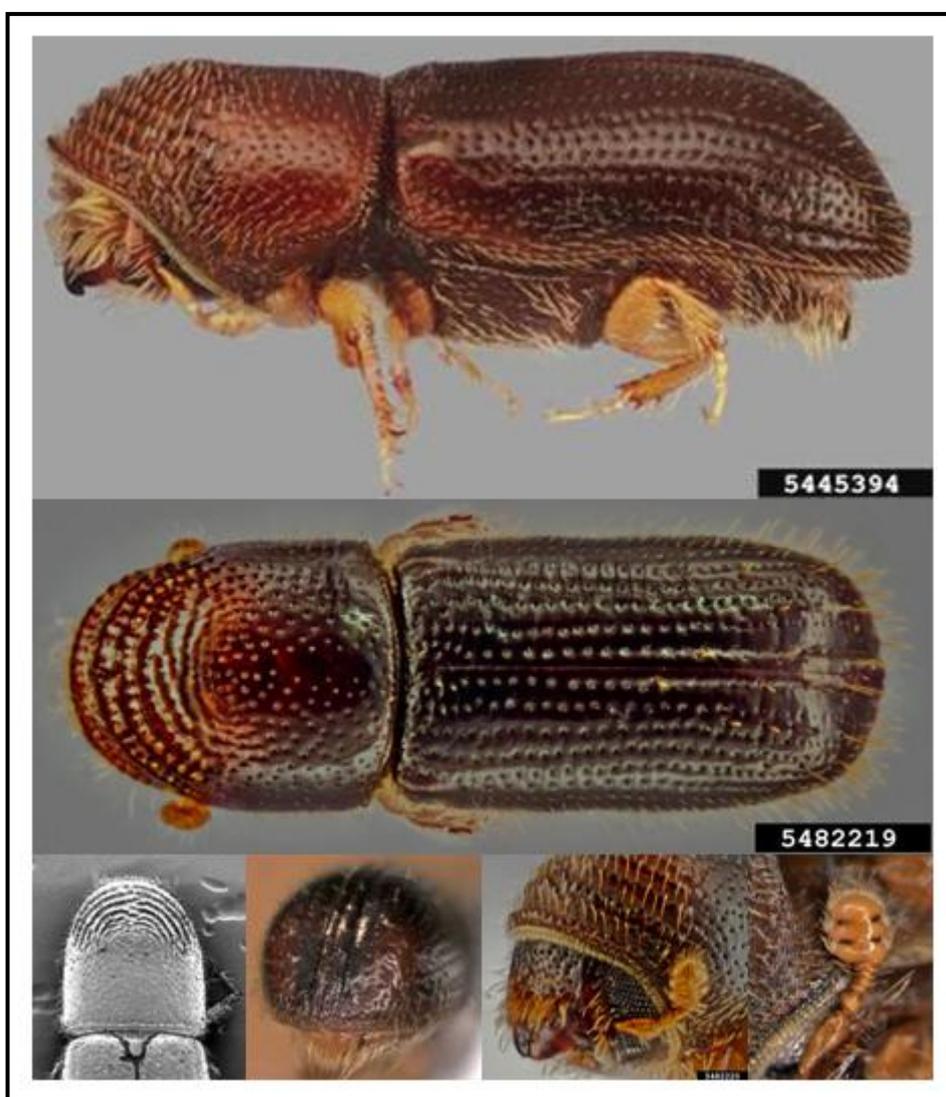


Figura 1.1 - Visione laterale (Valley, 2011) e dorsale (Valley, 2012) di *P. juglandis*. Sotto da sinistra a destra, le asperità sul pronoto al microscopio elettronico a scansione (Graves, 2010), il declivio posteriore (Mercado, 2012), il pronoto (Valley, 2012) e un particolare dell'antenna (Mercado, 2012).

Entrando più nel particolare, il pronoto è 1.10-1.16 volte più lungo che largo, dai lati quasi dritti e paralleli nella metà basale, piuttosto ampiamente arrotondati nella parte anteriore, solcata da 18 scanalature disposte a semicirconferenza. La zona posteriore dello stesso è liscia, lucente e presenta numerose asperità piuttosto grandi e vicine tra loro. La peluria è scarsa, ma le singole setole sono mediamente lunghe e disposte concentricamente lungo le asperità anteriori.

Le elitre sono 1.8-1.9 volte più lunghe che larghe e 1.7 volte il pronoto; i lati dritti e paralleli sui primi tre quarti basali, ampiamente arrotondati posteriormente. Le strie non sono molto evidenti, se non avvicinandosi al declivio; le concavità sono grossolane e disposte in file. Le interstrie sono lisce e lucenti, non punteggiate, larghe una volta e mezzo le strie. La prima e seconda stria sono evidenti e finemente punteggiate mentre la terza presenta una scarsa fila di forature fini; le prime due interstrie sono di larghezza simile e leggermente zigurate. La peluria è limitata alla zona basale ed è generalmente corta, mentre nelle interstrie non è presente se non nella zona del declivio.

I maschi si distinguono dalle femmine della specie per la fronte molto ampia, fortemente concava e più grossolanamente punteggiata. La peluria è meno abbondante e più corta, specie nella zona del capo, mentre sul ventre è più abbondante. Infine, il maschio nella zona del declivio, nella prima e seconda interstria presenta una fila di granuli minuti (Wood, 1982) (Figura 1.2).

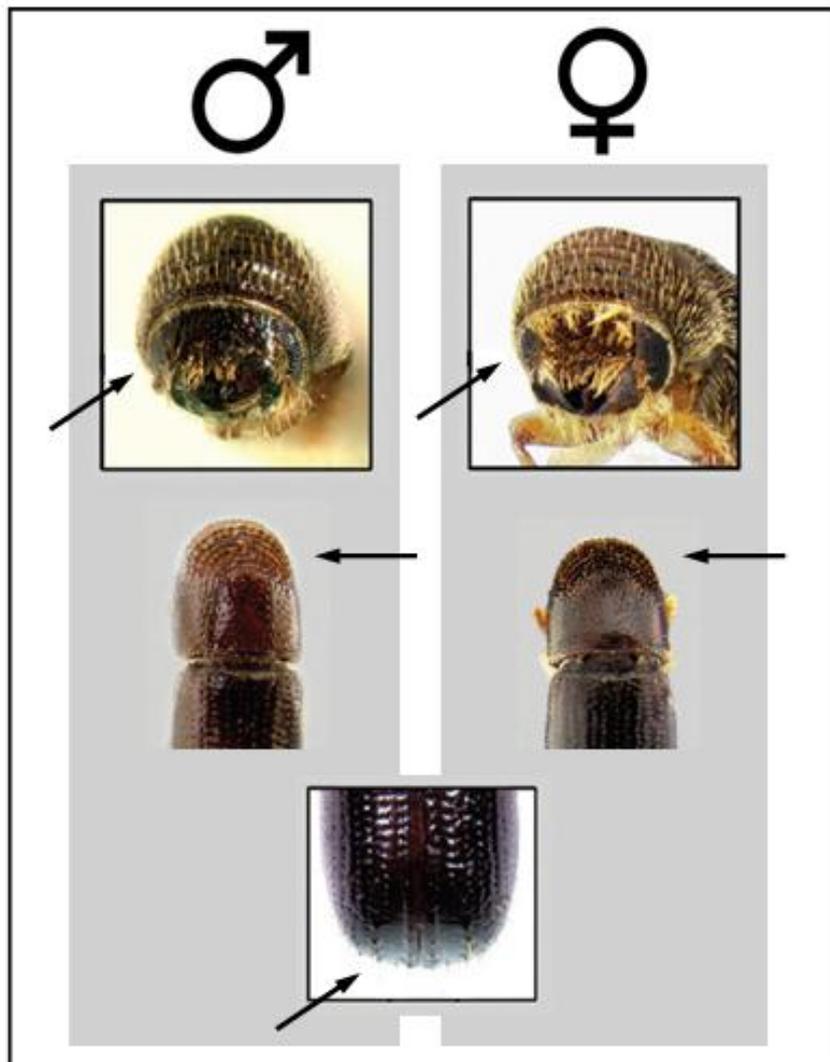


Figura 1.2 - Comparazione dei caratteri morfologici che contraddistinguono maschi e femmine di *P. juglandis*. A sinistra, il maschio, con pelosità moderata e fronte ampia e punteggiata grossolanamente. A destra, la femmina, con accentuata pelosità e fronte minuta e meno punteggiata. In basso, il declivio granulato del maschio (Nishinuma et al., 2013).

È una delle poche specie del genere *Pityophthorus* associata a latifoglie e l'unica associata al genere *Juglans* (Furniss e Carolin, 1977), tipicamente presente su *Juglans nigra*, il noce nero americano (Nischwitz e Murray, 2011). A seguito delle dimensioni ridotte, gli attacchi da parte degli adulti si limitano ai ramoscelli e branche di piccolo diametro; la dimensione minima delle branche infestate è di circa 2 cm di diametro, mentre i fori di entrata e uscita sono regolarmente presenti in rami di 10 cm di diametro o più, anche in tronchi di grandi alberi, un comportamento considerato insolito per questo genere (Tisserat et al., 2009). La

corteccia deve comunque essere sottile e facile da perforare (Montecchio et al., 2014a).

Il ciclo di vita di questo insetto non è stato pienamente determinato. Dalle osservazioni compiute in Colorado, si è osservato un primo volo in aprile da parte degli adulti svernanti sottocorteccia, mentre in maggio avviene l'accoppiamento (Tisserat et al., 2009) all'interno di una camera nuziale scavata sotto la corteccia. La colonizzazione iniziale della pianta ospite è compiuta dal maschio, che scava una piccola camera nuziale e rilascia feromoni che attraggono le femmine. Una o due femmine (max 6-7) si uniscono al maschio e creano gallerie trasversali, dove le uova sono deposte in grandi nicchie sul lato di queste (Cranshaw e Tisserat, 2012) (Figura X).

Con la stagione calda, le larve dalla schiusa si nutrono per 4-6 settimane (maggio-giugno) sotto corteccia in gallerie larvali, che si diramano, grosso modo, perpendicolarmente alle gallerie materne, spingendosi verso il cambio del ramoscello. Il raggiungimento del pieno stadio pupale avviene alla fine del tunnel larvale, e quindi anche la metamorfosi e la maturazione pre-sfarfallamento; gli adulti poi emergono attraverso minuti fori di uscita circolari (Figura 1.3).



Figura 1.3 - In alto, fori di entrata e uscita sulla corteccia di una pianta ospite (Cranshaw, 2011). In basso, sistema riproduttivo di *P. juglandis* visibile appena sotto corteccia (Graves, 2009).

Gli adulti danno quindi inizio ad una nuova generazione, spostandosi in volo dagli alberi infetti su ospiti sani ma indeboliti per le cause più diverse. Le piccolissime dimensioni degli adulti consentono, tuttavia, anche una loro dispersione passiva tramite il vento, che può spingerli oltre la breve distanza, anche a decine di chilometri (Montecchio et al., 2014a).

In sette settimane una generazione è completa; a partire all'inizio dell'estate, gli adulti colonizzano altre piante per dare avvio ad una seconda generazione. Il picco di attività di volo degli adulti in Colorado avviene da metà luglio a fine agosto e diminuisce ad inizio autunno, terminando verso ottobre. Tuttavia, lo sviluppo delle larve può estendersi anche in autunno, in numero più limitato; in questo modo sia le larve stesse così come gli adulti possono svernare (Cranshaw e Tisserat, 2012).

Di norma, sono normalmente presenti 2-3 generazioni in un anno (anche sovrapposte), dalle primaverili alle tardo-estive (Cranshaw e Tisserat, 2008).

Il ciclo di vita di *Pityophthorus juglandis* può essere notevolmente diverso a climi più caldi. Ad esempio, in California, le fasi svernanti includono larve in vari stadi di sviluppo e il volo degli adulti può iniziare a marzo.

Questo scoltide è comunemente, anche se non sempre, associato ad un fungo simbiote, *Geosmithia morbida*, che colonizza e uccide i tessuti circostanti le ferite prodotte dall'insetto per l'alimentazione e lo scavo di gallerie (Kolarik et al., 2011; Tisserat et al., 2009).

1.6. *Geosmithia morbida* e il cancro rameale del noce (*Thousand Cankers Disease, TCD*).

Geosmithia (Ascomycota: Hypocreales: Bionectriaceae) è un genere di funghi filamentosi mitosporici distribuiti in tutto il mondo e comprende 22 specie descritte (Kolarik e Kirkendall, 2010; Kolarik et al., 2008; 2007; 2005; 2004) e almeno 20 specie inedite.

Le specie di *Geosmithia* si sviluppano su una vasta gamma di substrati, tra cui frammenti di vegetali, cereali e suolo (Pitt e Hocking, 2009; Kolarik et al., 2004), ma la maggior parte sono associate esclusivamente con insetti sottocorticali, tra cui scoltidi, tipicamente con scoltidi fleofagi (Kolarik et al., 2008; 2007; 2005).

In particolare, a *Pityophthorus juglandis* è associata una nuova specie di *Geosmithia*, *Geosmithia morbida*, che colonizza e uccide il floema dei rami di noce, causando la formazione di cancri corticali. Questa cosiddetta malattia dei mille cancri, *Thousand Canker Disease* (TCD), italianizzata in cancro rameale del noce, si verifica solo su noce (Graves et al., 2009).

Le specie appartenenti al genere *Geosmithia* non sono considerate importanti patogeni per le piante, ma *G. morbida* è più virulenta rispetto alle specie affini (Seybold et al., 2013a).

Il cancro rameale del noce è una malattia conosciuta dal 2008 (Cranshaw e Tisserat, 2012), mentre la dimostrazione che è proprio *G. morbida* ad essere responsabile dello sviluppo del cancro rameale è stata fatta nel 2009 (Tisserat et

al., 2009), grazie a isolamenti da *P. juglandis* e dai cancri stessi sviluppatasi intorno alle gallerie dello scolitide.

Allevando colonie fungine isolate da scolitidi adulti e dai margini del floema necrotico su substrati apposti (PDA, *Potato Dextrose Agar*, MEA, *Malt Extract Agar*, e CYA, *Czapek Yeast Agar*) è possibile osservare il tipico sviluppo di *G. morbida*. A 25 °C i margini della colonia sono molto lobati, la crescita generalmente pianeggiante, il micelio ialino, denso, resistente, spesso con cellule globose e tondeggianti (5-10 µm). La conidiogenesi è moderata e avviene a partire dal mezzo, dove viene a formarsi una massa più dura e viscida. Non vi è essudato e, invertendo la capsula dove è cresciuta la colonia, è possibile notare la tipica colorazione da giallastra-ocra a marrone, a seconda dell'età della colonia stessa. Alle volte, spesso in condizioni di maggiore temperatura, la parte di substrato sterile forma un micelio aereo e fioccoso (Figura 1.4).

I rami conidiofori sono ruvidi, verrucosi e penicillati, lunghi 2-200 × 2.5-3 µm e con alla base cellule atipicamente ramificate o globose. I penicilli, lunghi 30-60 µm, sono ter- o quater-verticillati, raramente più ramificati, simmetrici o meno. I fialidi hanno dimensioni di 8-15 × 2-2.5 µm e sono 3-6 per ogni metula (ramo terminale del conidioforo). I conidi hanno forma cilindrico-ellissoidica di 4.0-8.0 × 1.5-2.5 µm, in catene persistenti lunghe fino a 200 µm (Kolarik et al., 2011; Tisserat et al., 2009; Kolarik et al., 2008; 2005; 2004) (Figura 1.4).

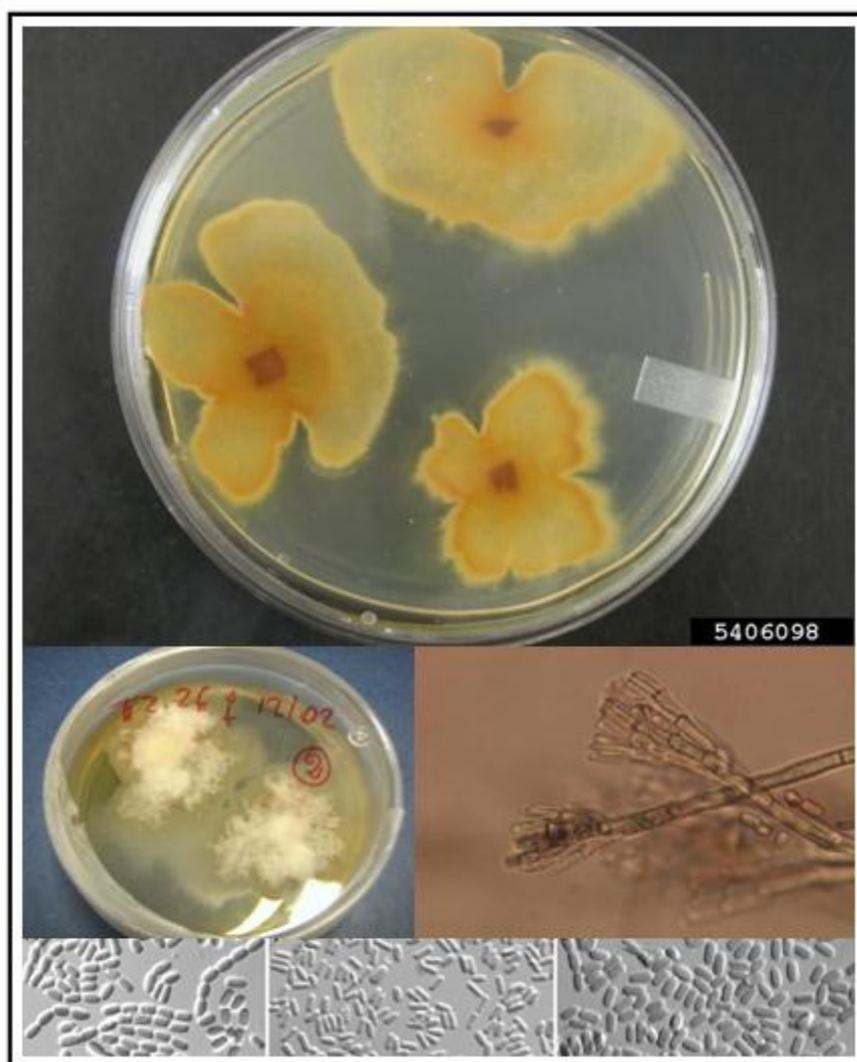


Figura 1.4 - In alto, colonia pura di *G. morbida* (Tisserat, 2009). Al centro a sinistra, particolare micelio fioccoso (immagine elaborata dall'autore), a destra, rami conidiofori (Tisserat, 2009). In basso, conidi di *G. morbida* in diversi ingrandimenti a microscopio elettronico a scansione (Kolarik, 2011).

Nel processo di sviluppo della TCD, *Geosmithia morbida* non è il solo fungo coinvolto, spesso è associata a *Fusarium solani*, meno comunemente ad altre specie di *Fusarium*, nelle fasi avanzate della malattia. *F. solani* causa esso stesso cancro su alberi di noce stressati dalla siccità, dal freddo o da potature non corrette, anche se meno aggressivamente, provocando un impoverimento delle riserve energetiche della pianta ospite e favorendo lo sviluppo di *G. morbida*, ma non è direttamente collegato ad essa, tanto che non è comune la sua presenza nelle gallerie scavate dallo scolitide. Il ruolo di *F. solani* non è ancora chiaro, lontano da essere la causa primaria del cancro rameale, è presente come parassita facoltativo o saprofita

(Cranshaw e Tisserat, 2012; Tisserat et al., 2009; Chen e Swart, 2000; Carlson et al., 1993; Tisserat, 1987; Cummings e Kuntz, 1986; Weber, 1974).

Alcune piante colpite da TCD, mostrano la tendenza a sviluppare marciume radicale dovuto ad *Armillaria*, genere di funghi che viene favorito dalla ridotta presenza di amido nelle radici (Cranshaw & Tisserat, 2012).

Negli ultimi dieci anni, nella parte occidentale degli Stati Uniti, molti alberi di noce nero sono morti a causa del cancro rameale dovuto all'associazione di *P. juglandis* e *G. morbida* (Tisserat et al., 2009).

P. juglandis non ha evoluto adattamenti morfologici atti a trasportare e preservare il fungo simbionte, semplicemente i tegumenti esterni sono contaminati da propaguli del fungo (spore, frammenti di micelio) al momento dello sfarfallamento primaverile dalla pianta ospite infetta (Cranshaw e Tisserat, 2012).

Il cancro causato dalle spore di *G. morbida* è di per sé piccolo, ma lo scavo di gallerie per l'alimentazione e la deposizione delle uova da parte dello scoltide, portano al rapido sviluppo di molti cancri in aree multiple dello stesso albero (Jesse et al., 2012), anche dopo lo sfarfallamento dei nuovi adulti.

Nel particolare, il fungo invade il tessuto floematico appena sotto la corteccia determinandone la morte; questo tessuto necrotico e dal colore scuro prende il nome di cancro (Jesse et al., 2012). Essenzialmente, la distruzione del floema, comporta l'arresto del normale flusso dei nutrienti; così, col progredire della malattia fino all'interessamento dell'intera circonferenza dei rami colpiti, si assiste al disseccamento della chioma e, conseguentemente alla disidratazione dell'individuo, si osserva anche la fessurazione della corteccia e, dunque, la macerazione del tessuto esterno (Montecchio et al., 2014a; Tisserat et al., 2009) (Figura 1.5).

Presto la malattia diventa sistemica; anche il cambio e i tessuti xilematici più esterni vengono interessati dall'espandersi dei cancri, con l'avanzamento verso il basso tutta la parte epigea si dissecca e presto la pianta deperisce. La malattia dei mille cancri è persino in grado di diffondersi attraverso innesti di radici (Montecchio e Faccoli, 2014; Montecchio et al., 2014a; Jesse et al., 2012).

Dalla comparsa dei primi sintomi, una pianta di medie dimensioni colpita da cancro muore in 3-4 anni (8-10 dall'infezione); il numero di cancri rinvenuti sulle

piante in declino è molto alto, ogni 2-5 cm di corteccia sono presenti le gallerie scavate dallo scoltide e i cancri associati (Montecchio et al., 2014a; Tisserat et al., 2009).

Tuttavia, riconoscere i sintomi della malattia non è affatto semplice, questo perché il cancro rameale non dà luogo alla gamma di effetti esterni tipici dell'affezione fungina determinante il cancro. Inizialmente si verifica l'ingiallimento, l'avvizzimento e il diradamento del fogliame fuori stagione, dunque, avviene il disseccamento della porzione distale della parte colpita, le foglie, che virano al marrone, restano appese "a bandiera" mentre c'è la contemporanea emissione di rami epicormici (Montecchio, 2014; Montecchio et al., 2014a; Seybold et al., 2013a; Cranshaw e Tisserat, 2012; Jesse et al., 2012; Nischwitz e Murray, 2011; Graves et al., 2009) (Figura 1.5).

La superficie della corteccia, invece, può non presentare sintomi, tranne qualche fessurazione o inscurimento localizzato direttamente sopra un cancro, ma solitamente questa rimane attaccata fin dopo la morte della pianta infetta. Se si osserva attentamente è possibile notare numerosi piccoli fori di ingresso e di uscita, ma questi hanno dimensioni minori al millimetro di diametro. Scortecciando molto superficialmente è possibile rinvenire le gallerie scavate dall'insetto all'interno delle zone colpite da cancro; se i tagli sono eseguiti troppo in profondità nell'alburno non è possibile apprezzare il sistema riproduttivo. Sulle aree di corteccia più lisce e tenere possono verificarsi tipiche fessurazioni a forma di stella (Montecchio et al., 2014a; Seybold et al., 2013a; Cranshaw e Tisserat, 2012; Tisserat et al., 2009) (Figura 1.5).



Figura 1.5 – Effetti e sintomi di riconoscimento di TCD. Sopra, i cancri in corrispondenza dei fori d'entrata (Tisserat, 2009). Sotto, da sinistra a destra, l'ingiallimento del fogliame (Cranshaw, 2009), le foglie appese "a bandiera" (Montecchio, 2014), l'imbrunimento della corteccia (Tisserat, 2009) e le fessurazioni (www.happytreeltd.com).

Geosmithia morbida è associata prevalentemente a *P. juglandis*; altre specie di coleotteri rinvenuti su alberi infetti possono trasportare incidentalmente le spore del fungo ed avviare un punto di infezione, tuttavia, per lo sviluppo della malattia, è necessario un vettore in grado di produrre migliaia di siti di ingresso, per questo *P. juglandis* è particolarmente adatto (Cranshaw e Tisserat, 2012).

Mentre l'associazione tra *G. morbida* e insetto vettore è specie-specifica, tale fungo può risultare patogeno per diverse specie appartenenti al genere *Juglans*, ma non per altri appartenenti alla famiglia delle *Juglandaceae*, come il genere *Carya*, tra cui *C. illinoensis*, il noce pecan, e *C. cordiformis*, il noce americano (Seybold et al., 2012; Utley et al., 2009).

Il noce dell'Arizona (*J. major*), ospite nativo dello scolitide, è piuttosto resistente; gli attacchi sono limitati ai rami di piccolo diametro e il fungo non è aggressivo. Il noce della California settentrionale (*J. hindsii*) e quello della California meridionale (*J. californica*) mostrano gradi di sensibilità intermedia. Il noce nero americano (*J. nigra*), o noce nero dell'est, e i suoi ibridi sono estremamente suscettibili al TCD ed

essa è anche la specie di maggior valore commerciale. Più resistente appare il noce inglese o persiano (*J. regia*), tranne quando è innestato su altri *Juglans* più suscettibili. Poco si conosce della risposta all'infezione da parte di *J. microcarpa* e di *J. cinerea*, su cui non si sono ancora effettuate osservazioni durature (Montecchio et al., 2014a; Utley et al., 2013; Cranshaw e Tisserat, 2012; Nischwitz e Murray, 2011).

Bisogna anche considerare che, mentre il substrato pedologico non sembra influire sulla predisposizione alla malattia dei singoli noci, fattori genetici (provenienze, ecotipi, cloni) e climatici, come esigenze termiche e igrotermiche di fungo e insetto, potrebbero avere un ruolo importante nelle dinamiche della malattia (Montecchio et al., 2014a).

1.7. Distribuzione nativa e successive introduzioni di WTB e TCD.

Pityophthorus juglandis è stato descritto per la prima volta nel 1928 da scolitidi raccolti nel 1896 a Grant Co., nel sud-ovest del New Mexico (Blackman, 1928). La prima distribuzione di questo scolitide comprendeva Arizona, California e New Messico negli Stati Uniti e Chihuahua nel nord del Messico, areale di distribuzione originario della sua pianta ospite, *J. major* (Cranshaw e Tisserat, 2012; Nischwitz e Murray, 2011; USDA Forest Service, 2002; Wood e Bright, 1992; Bright, 1981; Bright e Stark, 1973).

Negli ultimi due decenni è stato riportato un ampliamento dell'areale con l'aggiunta di alcuni stati occidentali degli Stati Uniti, quali Colorado, Idaho, Oregon, Nevada, Utah e Washington, ma anche di cinque stati della costa orientale, ossia la Virginia, il Tennessee, l'Ohio, il North Carolina e la Pennsylvania (Seybold et al., 2013a; Cranshaw, 2011; Leonard, 2011; USDA Forest Service, 2002).

Si presume che, una ricerca condotta a livello nazionale nei prossimi anni, possa rivelare la presenza dello scolitide in questione anche in tutta la zona orientale degli Stati Uniti, nonché in Canada (Seybold et al., 2012).

Per quanto riguarda *G. morbida*, si è già detto in precedenza che è stato identificato per la prima volta nel 2008; l'origine non è ancora nota, ma la diversificazione e la complessità della popolazione presente nell'ovest degli Stati Uniti, è tale da far

ipotizzare una presenza stabile da tempo, piuttosto che ad una recente introduzione da Asia o Europa (Cranshaw e Tisserat, 2012).

Il primo isolamento di *G. morbida* nel 2008 era stato compiuto da floema necrotico circostante gallerie di *P. juglandis* in *J. major*, nell'areale nativo di questa pianta ospite, ossia Arizona e New Mexico. Ciò conferma lo stretto legame simbiotico tra fungo e scoltide, ma non la connessione con il cancro rameale, infatti, la pianta da cui sono stati prelevati non presentava deperimento (Kolarik et al., 2011).

Successive analisi nel 2009 a carico di *J. nigra*, confermano, invece, la veridicità del trinomio "*P. juglandis* - *G. morbida* - TCD". Primariamente, ciò viene attestato in stati come Colorado, Idaho, New Mexico, California, Oregon, Nevada, Utah e Washington, localizzati nell'Ovest degli Stati Uniti, ossia non nell'areale d'origine di *J. nigra*, ma in zone dove è stato ampiamente coltivato come pianta ornamentale o da frutto e dove è, forse, in leggera sofferenza (Kolarik et al., 2011; Graves et al., 2009) (Figura 1.6).

La capacità del fungo di sopravvivere in una vasta gamma di condizioni climatiche e l'ampliamento dell'areale di *P. juglandis* verso l'est degli Stati Uniti, zona nativa del suscettibile ospite *J. nigra*, hanno fatto sì che anche le zone interessate da *G. morbida*, e conseguentemente da TCD, si espandessero verso est (Seybold et al., 2013a) (Figura 1.6).

Nel mese di agosto del 2010, si è riscontrato il cancro rameale del noce in Tennessee in associazione ad un focolaio che sembra abbia avuto origine da una introduzione di almeno un decennio prima (Cranshaw e Tisserat 2012; USDA Forest Service 2010). La malattia è stata, dunque, rinvenuta in Virginia, nel giugno del 2011, e in Pennsylvania, nell'agosto del 2011 (Grant et al., 2011) (Figura 1.6).

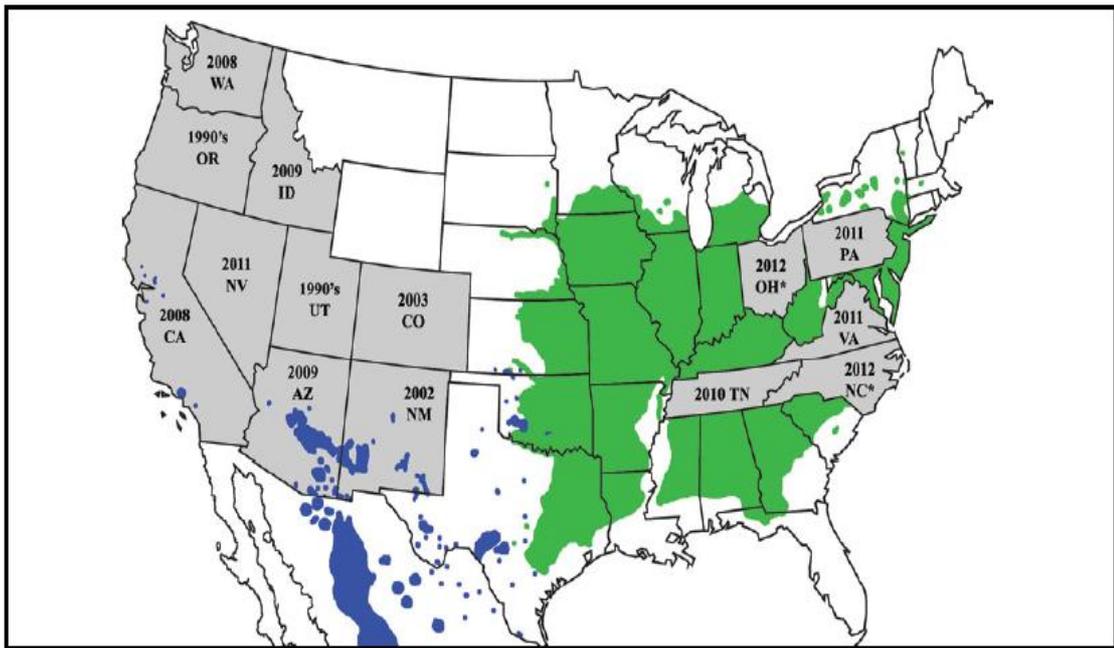


Figura 1.6 – Stati americani dove TCD è confermata (in grigio), in verde l’areale d’origine di *J. nigra* e in blu il range di quattro specie di *Juglans* originarie degli stati occidentali (www.iowatreepests.com)

Benchè negli Stati Uniti la malattia sia classificata “da quarantena”, nell’ultimo decennio fungo e insetto hanno progressivamente invaso tutta la costa occidentale degli Stati Uniti e anche parte degli stati orientali, raggiungendo North Carolina e Ohio (Montecchio et al., 2014b). Ora ci si aspetta che nei prossimi decenni tutto l’areale di distribuzione di *J. nigra* possa essere interessato da TCD (Cranshaw e Tisserat, 2012) (Figura 1.7).

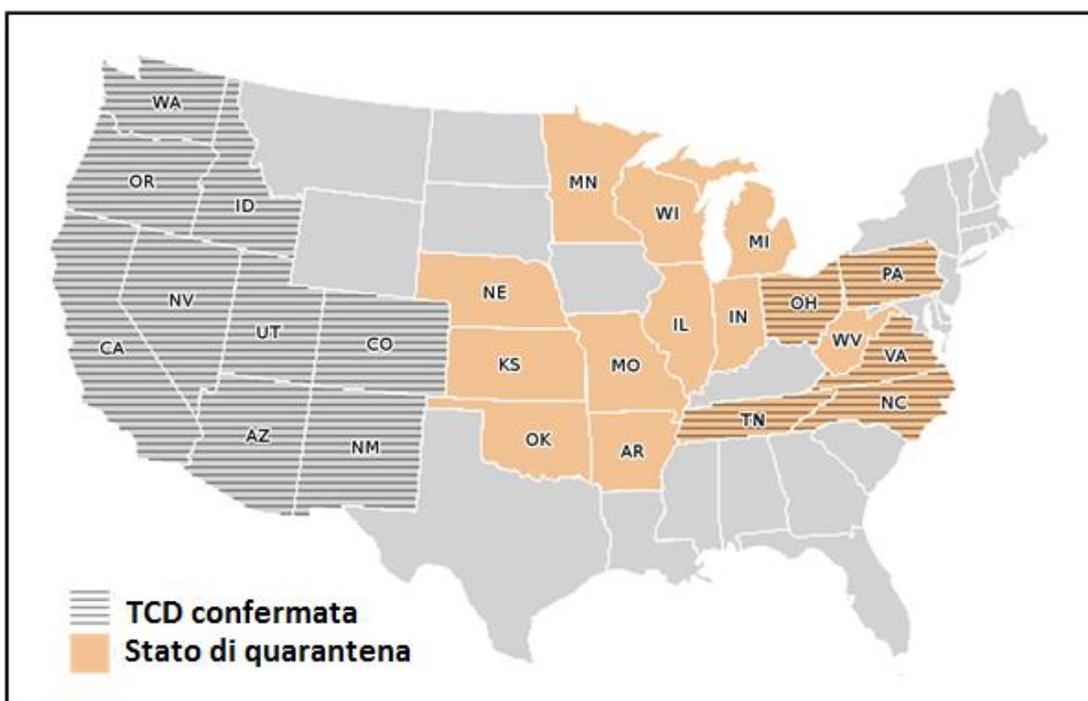


Figura 1.7 - Stati in cui TCD è confermata (fondo rigato) e stati in cui vige la quarantena (in arancio) (www.thousandcankers.com).

Nei metodi di diffusione sulle lunghe distanze, ciò che ha fatto la differenza è stato il trasferimento umano di merci e materiali, in particolare di legna da ardere, ramaglia di risulta dei processi di lavorazione del noce nero, materiale da pacciamatura e interi tronchi. Questi rappresentano siti idonei a trasportare e mantenere il fungo da alcune settimane a diversi mesi, se non anni (Montecchio et al., 2014b; Cranshaw e Tisserat, 2012).

Considerando che la quarantena imposta dagli Stati Uniti è solo interna ai confini nazionali mentre consente l'esportazione di materiale in altri Paesi o continenti, e osservando il sempre maggior potenziamento del commercio internazionale, si può ipotizzare un allargamento delle zone interessate da *P. juglandis* e dunque da TCD.

A questo proposito, il 10 settembre 2013, vi è stato il primo rinvenimento del cancro rameale del noce nel nord-est dell'Italia, precisamente a Bressanvido, in provincia di Vicenza (Figura 1.8).

Gli alberi colpiti sono noci neri, *J. nigra*, di diverse età: piante di 80 anni cresciute in un giardino privato, e individui di 17 anni, appartenenti ad una vicina piantagione di noci per la produzione di legname.

Oltre a presentare i sintomi caratteristici (ingiallimento delle foglie, avvizzimento della chioma, deperimento dei rami), sono stati osservati un elevato numero di piccoli cancri corticali attorno al sistema riproduttivo dello scolitide, che hanno determinato un inscurimento del floema, della corteccia esterna e, localmente, anche dei tessuti xilematici più esterni.

I corpi fruttiferi dei funghi non sono stati trovati su o vicino ai cancri, ma del micelio biancastro, a volte produttore dei conidiofori verticillati, è stato spesso rilevato all'interno di gallerie (Montecchio e Faccoli, 2014).

Tramite analisi morfologiche e genetiche, i coleotteri uscenti da ramoscelli casualmente raccolti dalle piante infette sono stati identificati come *P. juglandis*; lo stesso tipo di analisi è stato condotto su colture in PDA del fungo raccolto da margini necrotici e dall'interno delle gallerie scavate dall'insetto, constatando un'identità molecolare del 100% con un ceppo isolato in California e avallando l'ipotesi dell'importazione dagli USA di legname infetto (Montecchio, 2014).

Nell'ottobre del 2013 sono stati individuati altri quattro focolai di TCD, uno a Thiene (VI), uno a Schio (VI), uno a Conco (VI) ed un altro a Bolzano Vicentino (VI), zone limitrofe quelle di Bressanvido (Figura 1.8).

Nel maggio del 2014 è stato individuato un quinto sito di infezione a Santorso (VI), l'albero infetto, però, era in questo caso un noce inglese (*J. regia*) di 20 anni situato in un giardino privato adiacente ad una piantagione infetta di noce americano (Montecchio et al., 2014b) (Figura 1.8).

Accanto a questi rinvenimenti, molto vicini tra loro tanto da ritenerli un'unica popolazione, ve ne è stato uno a Bosco Fontana, località Marmirolo, in provincia di Mantova nel giugno del 2014 (Figura 1.8). La distanza relativamente importante e la non forte patogenicità di questa altra introduzione fa presumere ad una diversa popolazione.

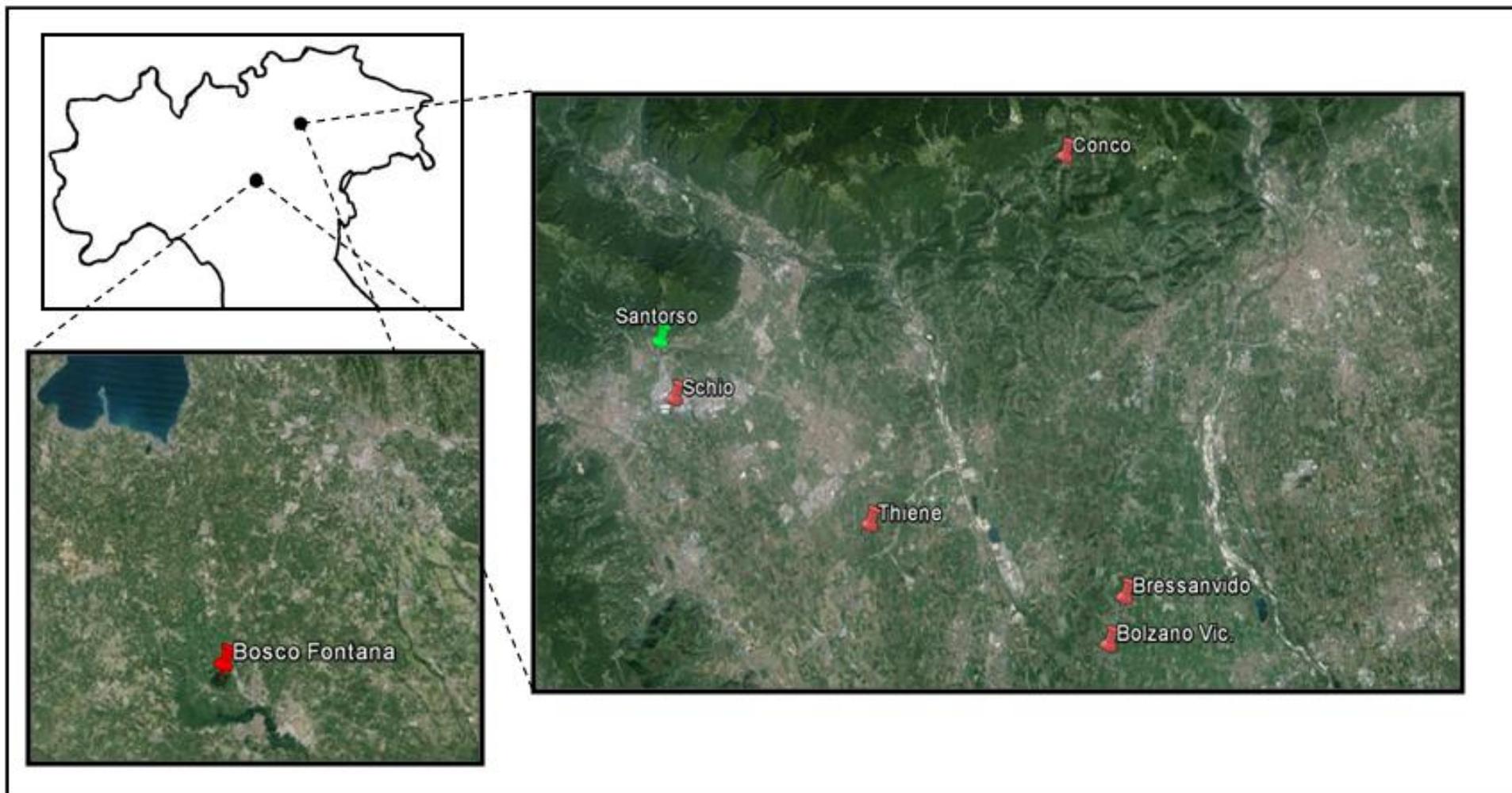


Figura 1.8 - Siti di individuazione italiani in provincia di Mantova (1) e in provincia di Vicenza (6); in verde il sito con scolitide a carico di *J. Regia* (immagine elaborata dall'autore con Google Earth).

Nonostante in Europa, il noce sia intensivamente coltivato, specie *J. regia*, *J. nigra* e loro ibridi, e malgrado il recente rinvenimento, non sono ancora state definite delle restrizioni per l'importazione e il commercio di legno di noce a livello europeo; si può, dunque, ipotizzare una diffusione della malattia su brevi e lunghe distanze all'interno dell'area "Schengen" (Montecchio et al., 2014a).

Un primo passo è stato fatto il 1 gennaio 2014 da parte dell'EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) che ha inserito il cancro rameale del noce nell'EPPO *Alert List*, non una lista di quarantena, ma un tentativo preliminare di identificazione dei principali elementi di rischio connessi alla malattia (Montecchio, 2014; Vettorazzo e Zampini, 2007).

A oggi non sono note efficaci misure di controllo diretto del vettore o del patogeno, è possibile solo il contrasto della diffusione della malattia avvalendosi di norme restrittive il trasporto di materiale legnoso fuori dai focolai d'infezione (Montecchio et al., 2014b). Una volta che il fungo ha colonizzato il tessuto dell'ospite, nessun insetticida sistemico o mirato può impedire il progresso della malattia (Nischwitz e Murray, 2011; Frank e Bambara, 2010). Le trappole a feromoni composte anche da otto imbuti del tipo Lindgren, i pannelli adesivi di colore giallo o quelli trasparenti appesi agli alberi di noce supposti infetti hanno il solo scopo di rilevare una probabile popolazione o delimitarne una conosciuta (Seybold et al., 2013b; Cranshaw e Tisserat, 2012).

2. OBIETTIVI DEL LAVORO.

Considerando l'elevata specificità di *G. morbida*, la difficoltà di contenimento della diffusione del patogeno, l'elevata mortalità delle piante infette e il fatto che si tratti di una specie da quarantena negli USA inserita nella *Alert List* della EPPO, è importante definire il ruolo di *P. juglandis* come vettore del fungo.

I principali obiettivi del presente lavoro sono stati quelli di:

- indagare il ruolo di *P. juglandis* nei meccanismi di diffusione di *G. morbida* nei focolai italiani della malattia, conducendo uno studio relativo alla percentuale di insetti vettori di spore del fungo per cercare di capire se esistono differenze significative tra i sessi. La determinazione è stata svolta sia tramite coltura in PDA in capsule petri, sia per via molecolare con analisi genetiche, in modo da testare anche la bontà dei due metodi nell'individuazione delle spore;
- studiare la composizione della flora fungina associata a *P. juglandis*, analizzando anche le eventuali differenze fra sessi;
- caratterizzare geneticamente le popolazioni di *P. juglandis* e *G. morbida* rinvenute in Italia, con uno studio parallelo di sequenziamento genetico, confrontandole tra di loro e con alcune popolazioni dei Paesi di origine;
- evidenziare, qualora presenti, delle differenze geniche nelle due popolazioni di fungo, ma anche di insetto, riuscendo a determinare, in questo modo, anche l'origine di esse;
- ottenere informazioni sulla fenologia dell'insetto e sulle caratteristiche di colonizzazione dell'ospite.

3. MATERIALI E METODI.

3.1. *Il campionamento.*

Al fine di compiere qualsiasi tipo di analisi è importante disporre di campioni adeguati; a questo scopo si sono cercati alberi presentanti i sintomi tipici della malattia, prima descritti. Purtroppo, avendo compiuto la raccolta in autunno inoltrato, non tutti gli alberi presentavano la disposizione delle foglie “a bandiera” e l’individuazione è stata meno agevole; in alternativa dovevano essere individuati i fori di entrata e uscita dello scolitide sulla corteccia, ma ciò comportava anche il prelievo erroneo di branche non infette, perché gli insetti erano già sfarfallati. Per un ulteriore controllo, venivano localmente scortecciati; se il floema era ancora biancastro si poteva concludere che lo scolitide era svernante sotto corteccia, se già annerito, significava che la malattia era ad un stadio avanzato e che la pianta era già stata abbandonata dall’insetto.

Le operazioni, vista l’altezza delle piante, sono state eseguite mediante uno svettatoio e si è avuta cura di raccogliere rami con diametro maggiore di due centimetri, con corteccia peculiarmente “impallinata”.

Il campionamento prevedeva la raccolta di materiale infetto da almeno due alberi di noce nero in quattro dei cinque siti vicentini in cui sono stati rinvenuti l’insetto e il fungo, in particolare, in data 10 dicembre 2013 sono stati raccolti campioni di rami da cinque diversi alberi infetti nella zona di Bressanvido (VI), due presso un giardino privato nel centro del paese (45° 38’ N, 11° 38’ E) e tre ad un chilometro circa in linea d’aria, nella piccola piantagione di noce nero di Villa Mezzalira (45° 38’ N, 11° 39’ E). Nello stesso giorno si sono campionate altre due piante provenienti da un giardino privato nei pressi di Thiene (VI) (45° 40’ N, 11° 30’ E) (Figura 3.1).

Da quest’ultimo sito, si è deciso di raccogliere anche un campione di corteccia da una pianta deperente, il tessuto si staccava facilmente ed era molto spesso, ragion per cui si è ritenuto possibile potesse ospitare lo scolitide svernante.

In data 15 gennaio 2014, in pieno inverno, si sono raccolti campioni da tre individui infetti nella prima periferia di Schio (VI) (45° 43' N, 11° 24' E) e da altre due in prossimità di Bolzano Vicentino (VI) (45° 37' N, 11° 37' E) (Figura 3.1).

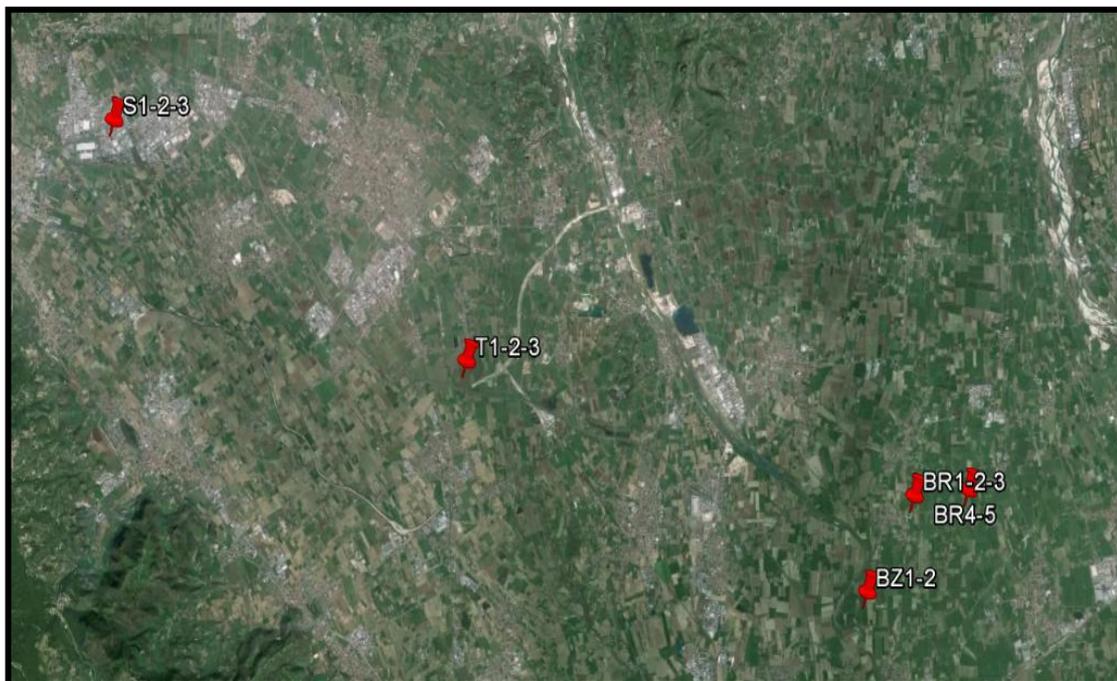


Figura 3.1 - Siti di campionamento in provincia di Vicenza (per le etichette si veda poi) (immagine elaborata dall'autore con Google Earth).

Campionando diversi alberi, ci si vuole assicurare che gli scolitidi emergenti non derivino tutti da una stessa schiusa, inficiando così le analisi successive per la determinazione della presenza o meno del fungo. Si ritiene, infatti, che tutti gli individui derivati dalla stessa madre, se portatrice del fungo, siano a loro volta portatori, e viceversa se essa non lo trasporta.

In realtà, viste le piccole dimensioni del coleottero in questione, è possibile considerare come distinti due campioni di legno provenienti dallo stesso ramo se distanti almeno 30 cm, specie se avente circonferenza importante.

I campioni così raccolti sono stati suddivisi e trasportati in sacchi di plastica chiusi con del nastro adesivo, considerata la pericolosità della malattia e volendo evitare contaminazioni tra gli alberi, a temperature minori di 0 °C per evitare che gli insetti riprendessero la loro attività e scongiurare l'insorgenza di muffe, vista l'umidità invernale incamerata dal legno.

3.2. *Il prelievo, l'allevamento e la conservazione di P. juglandis.*

Per l'allevamento degli scolitidi si sono disposti degli elettoretti di noce nero che consistevano in questo caso in cilindri graduati in vetro o PVC trasparente e in scatole dello stesso materiale. Nei coperchi delle scatole è stato praticato un foro, che, al pari del foro dei cilindri, è stato successivamente chiuso da una rete di ottone a maglie molto minute (1 mm²); nei cilindri, la rete, fissata saldamente con un elastico stretto attorno al bordo, fungeva anche da tappo (Figura 3.2).

La presenza della rete permetteva l'aerazione all'interno dei contenitori, utile allo sviluppo degli scolitidi e ad evitare l'insorgere di muffe, ma doveva essere, allo stesso tempo, estremamente fine per impedire la fuoriuscita eventuale di qualche adulto sfarfallato (Figura 3.2).

Per raccogliere l'umidità, che normalmente il legno trasuda, sono stati inseriti nei contenitori dei fogli di carta assorbente, che si è avuto cura di cambiare ogni qualvolta si è trovata umida (Figura 3.2).

In questi recipienti così preparati, si è avuto cura di adagiare il legno proveniente dagli alberi infetti, in particolare, si sono tagliati i rami in pezzi di circa 25 cm di lunghezza con delle cesoie da potatura; per alcuni campioni, poiché dal taglio sono risultati molti pezzi, non è bastata una sola scatola o cilindro per contenerli, alle volte neppure due (Figura 3.2).

Una volta completata l'operazione, si è provveduto a nominare i singoli contenitori con dei codici da cui fosse possibile risalire al sito di raccolta (Tabella 3.1).

| Siti di campionamento | N° piante | Codice |
|------------------------------|------------------|------------------|
| Bressanvido | 1 | BR1 |
| | 2 | BR2 |
| | 3 | BR3 |
| | 4 | BR4a; BR4b |
| | 5 | BR5a; BR5b; BR5c |
| Bolzano Vic. | 1 | BZ1 |
| | 2 | BZ2a; BZ2b |
| Schio | 1 | S1 |
| | 2 | S2 |
| | 3 | S3a; S3b |
| Thiene | 1 (corteccia) | T1 |
| | 2 | T2 |
| | 3 | T3a; T3b |

Tabella 3.1- Codici dei 19 elettoretti associati ad ogni sito di campionamento; per alcune piante sono stati disposti più contenitori.



Figura 3.2 - A sinistra, tubi e scatole usati come ecleettori. A destra, alcuni particolari, in basso, il campione di pezzi di corteccia (immagine elaborata dall'autore).

Mantenendo i contenitori ad una temperatura costante di +4 °C o più, si è dato modo agli scolitidi di completare il periodo di svernamento sotto corteccia e, passato circa un paio di mesi dal campionamento, gli insetti hanno iniziato a sfarfallare.

Si è deciso il prelievo giornaliero degli scolitidi per un periodo di due mesi dal momento in cui è sfarfallato il primo individuo. Il prelievo consisteva nel rovesciamento del contenuto di scatole e cilindri in una vaschetta di plastica e nella raccolta di ciascun individuo con delle pinzette minute a punta piatta. Ogni individuo veniva posto in una eppendorf sterile, e successivamente si procedeva col riconoscimento del sesso mediante microscopio; con ingrandimento 25X già si distingueva chiaramente la presenza o meno di peluria sulla fronte. Sulla eppendorf era appuntato un codice di riconoscimento costituito da quello del

contenitore a cui veniva aggiunto un numero progressivo e il sesso dell'individuo. Gli insetti raccolti sono stati poi conservati ad una temperatura di -80 °C.

In ogni passaggio della raccolta si è cercato di lavorare nel modo più sterile per evitare qualsiasi contaminazione tra insetti, anche dello stesso ramo. In particolare, la vaschetta di plastica veniva pulita con alcool ogni volta che si esaminava un contenitore diverso, la pinzetta era sterilizzata su fiamma ad ogni prelievo e il riconoscimento del sesso a microscopio era eseguito senza estrarre l'insetto dalla eppendorf.

Nel corso di questo studio sono stati analizzati anche 10 individui di *P. juglandis* provenienti da Bosco Fontana (MN); questi erano risultanti da alcune trappole a feromoni poste in loco. Gli individui erano estratti a vivo e uccisi in etere, conservati all'interno di un'unica provetta per centrifuga. Questo metodo di conservazione non è consigliabile in quanto può portare alla contaminazione tra individui e il liquido in cui sono immersi potrebbe lavare l'esoscheletro dalle spore.

3.3. Le colture, la purificazione e l'identificazione di G. morbida e degli altri funghi ad essa associati.

Parallelamente al prelievo degli adulti sfarfallati, è stata iniziata la coltura dei funghi derivati dalle spore che gli insetti trasportavano sull'esoscheletro.

Come substrato di coltura per i funghi si è scelto di usare il PDA a cui è stato aggiunto della streptomycina, un antibiotico, utile ad eliminare i batteri gastrici degli scolitidi (Appendice A).

Per ogni individuo è stata preparata con il substrato sopra descritto una piastra petri in plastica da 94 mm di diametro; nel complesso, per ogni elettore che effettivamente procurava scolitidi, venivano approntate almeno 10 piastre petri, di cui cinque per maschi e cinque per femmine.

Lavorando sotto cappa a flusso orizzontale, si prelevava con delle pinzette sterilizzate su fiamma lo scolitide dalla eppendorf, dunque, senza sollevare troppo il coperchio della piastra, lo si adagiava sul substrato e lo si capovolgeva più volte, strisciandolo sul substrato gelatinoso, quindi, lo si sminuzzava con le pinze stesse, per affondarne i frammenti a lato della piastra. Una volta completata l'operazione,

si provvedeva a chiudere la piastra con doppio strato di parafilm, poiché la piastra andava messa in termostato a 25 ± 1 °C (Figura 3.3).

Dopo tre-quattro giorni era già possibile distinguere le prime colonie fungine e passare alla purificazione delle diverse specie presenti; la piastra, dopo attenta osservazione, era aperta sotto cappa a flusso verticale, dunque, con una piccola ancia metallica sterilizzata su fiamma, veniva inciso il PDA a margine della colonia fungina interessata, quindi, il frammento veniva posto al centro di un'altra piastra petri più piccola (\varnothing 60 mm), precedentemente preparate con substrato di PDA. Entrambe le piastre, la "piastra madre" e la "ripresa", venivano chiuse con doppio parafilm, la ripresa veniva contrassegnata col codice della piastra madre e un numero progressivo e tutto veniva riposto in termostato a 25 ± 1 °C (Figura 3.3).

Dopo quattro-cinque giorni, si ricontrollava la piastra madre e, se si individuavano nuove colonie sfuggite ad una prima osservazione, si creavano delle nuove riprese.

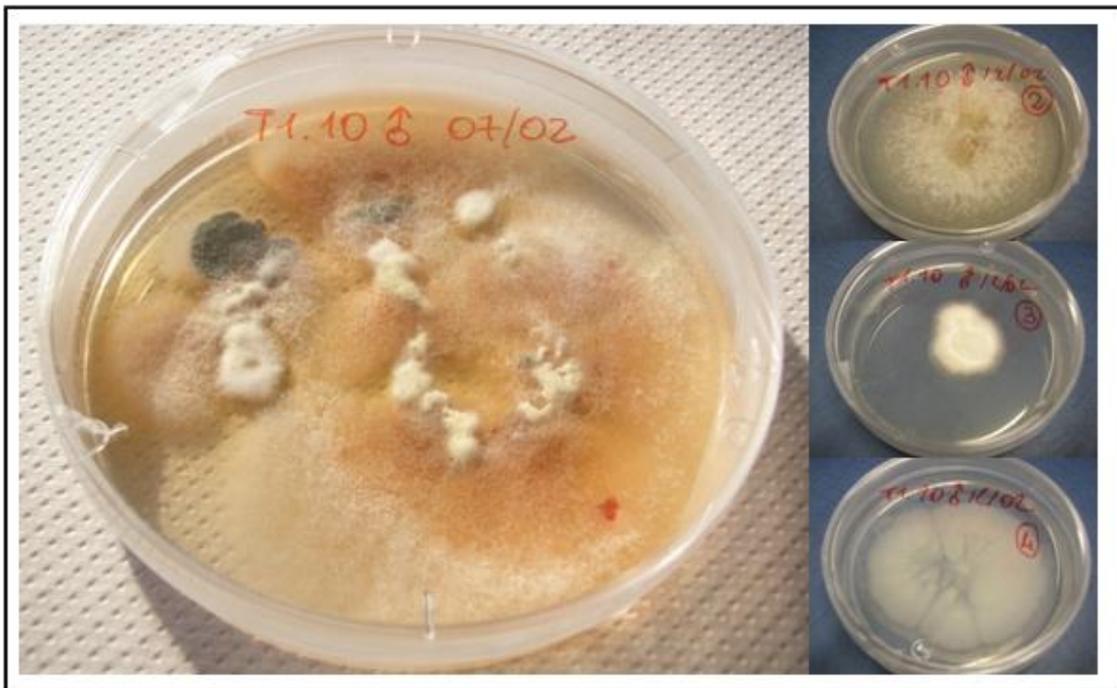


Figura 3.3 - A sinistra, piastra madre con codice identificativo. A destra, dall'alto, ripresa di *Fusarium solani*, *Beauveria* sp. e *Pythium* sp. (immagine elaborata dall'autore).

L'identificazione dei funghi si basa sull'osservazione preliminare ad occhio nudo dell'aspetto complessivo della colonia purificata e successivamente sullo studio a stereomicroscopio delle strutture riproduttive e delle spore prodotte dal fungo

stesso, precisa chiave di riconoscimento della specie. Alle volte, quando l'esame allo stereomicroscopio appare confuso, è necessaria l'indagine dei conidi tramite vetrino; la piastra petri ripresa viene aperta sotto cappa a flusso laminare verticale, viene approntato un vetrino portaoggetti con una goccia d'acqua demineralizzata, dunque, senza scoperchiare del tutto la piastra, viene raccolto del micelio raschiando la superficie della colonia con un'ancia metallica sterilizzata su fiamma. Il tessuto raccolto, solitamente in prossimità di strutture o colorazioni particolari della colonia, viene depositato sulla goccia d'acqua e disteso, un altro vetrino coprioggetti è posato sopra il tutto, avendo cura di evitare la formazione di bolle d'aria; la visione allo stereomicroscopio è ora più nitida.

A seconda della specie, la produzione delle strutture riproduttive potrebbe avvenire nell'arco di una settimana, di un mese o, addirittura, non avvenire mai.

3.4. Le analisi genetiche su *P. juglandis* e *G. morbida*.

Alla base di qualsiasi analisi genetica c'è l'estrazione del DNA d'interesse; in questo caso si è deciso di analizzare il DNA di sei individui (3 maschi e 3 femmine) per ogni elettore che ha fornito campioni sufficienti (6) per un totale di 36 individui, verificando allo stesso tempo la presenza o l'assenza del fungo. L'analisi genetica è stata condotta anche sui 10 scolitidi provenienti da Bosco Fontana, relativamente al DNA dell'insetto e sul DNA del fungo, qualora presente, certi che questo tipo di analisi potesse risultare più efficace per successivi confronti tra popolazioni italiane e d'origine.

L'estrazione del DNA è stata eseguita seguendo un protocollo standard di *salting out* (Appendice B), lavorando direttamente con gli insetti conservati nelle eppendorf a -80 °C e con quelli conservati in alcool, trasferiti, previa asciugatura su carta assorbente, in eppendorf sterili.

Per sequenziare e confrontare due popolazioni, siano esse di insetti o funghi, è necessario procedere all'amplificazione dei frammenti di DNA della regione di interesse tramite reazione a catena della polimerasi, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Appendice C).

Per quanto riguarda le analisi condotte sul DNA dell'insetto, si è scelto come DNA-*target* per la PCR la regione 3' del gene mitocondriale *cox1*, una zona sufficientemente variabile per poter effettuare un confronto tra individui appartenenti alla stessa specie.

La coppia di *primer* utilizzati in questa PCR sono il *primer forward* C1J-2183 (5'-CAACATTTATTTTGATTTTGG-3') e il *primer reverse* TL2N-3014 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'), amplificanti una sequenza di circa 750 bp.

Prima di procedere con la PCR sul DNA degli insetti, sono state fatte delle PCR di prova per calibrare temperatura e concentrazione del DNA. In particolare, mediante una PCR a gradiente di temperatura, per il passaggio di annealing dei primer si è stabilita come temperatura ottimale di lavoro i 46 °C, mentre tramite diluizioni si è deciso di operare con DNA diluito 1:40, in quanto a concentrazioni più elevate non sono stati ottenuti prodotti di PCR, probabilmente a causa della presenza di inibitori della DNA polimerasi nell'estratto.

Il profilo di amplificazione utilizzato per l'amplificazione della *cox1* è il seguente: 96 °C per 5' seguiti da 35 cicli di 45" a 96 °C, 45" a 46 °C e 1' a 72 °C.

Questa serie di amplificazione è stata conclusa con altri 5' a 72 °C per permettere alla polimerasi di terminare la duplicazione di tutti i frammenti di DNA amplificati.

La PCR sul DNA degli scolitidi, oltre che essere utile per un confronto tra popolazioni, è stata utilizzata come controllo degli eventuali campioni nulli risultanti dalla PCR sul DNA del fungo, escludendo così da analisi statistica quei campioni negativi non per l'assenza di *G. morbida*, ma perché presentante DNA troppo degradato per essere amplificato.

Per valutare la presenza o assenza di *G. morbida* si è scelto di eseguire una *nested* PCR, ossia una PCR modificata che permette di aumentare la specificità dei primer scelti e ridurre così la probabilità di ottenere prodotti di amplificazioni non attesi per erronee associazioni tra primer e siti non specifici (Appendice C).

Come DNA-*target* è stata scelta per *G. morbida* la regione di rDNA ITS, regione non codificante di DNA-ribosomiale utilizzata come *barcode* molecolare dei funghi, quindi ottima per operare identificazioni (Peay et al., 2008; Schoch et al., 2012).

Le coppie di *primer* in gioco sono, quindi, due; quella più esterna comprende *geosmithiaF1*, *primer forward* (5'-ATCATTATCGAGTTACCAACTCC-3') e

geosmithiaR1, *primer reverse* (5'-GAACGCCGGATGATTACCAAG-3'), progettati appositamente per questa prova per *G. morbida*, comprendenti 935 bp. La seconda coppia di *primer*, quella più interna, comprende geosmithia-f, *primer forward* (5'-CTTTGTGAACCTTACCACAG-3') e geosmithia-r, *primer reverse* (5'-CTCCCATTTAGAGCAGCATT-3'), generanti amplificazioni di 750 bp.

Per questa PCR non sono state fatte le diluizioni, poiché, presupponendo la già scarsa quantità di DNA fungino rispetto a quello dell'insetto, si è preferito lavorare a concentrazione invariata.

Anche per questa PCR, invece, è stata scelta la temperatura tramite la prova con gradiente. In un primo momento, poiché la prima coppia di *primer* non presentava problemi di funzionamento a nessuna temperatura, si era considerata determinante la temperatura di lavoro ottimale della seconda coppia di *primer*, ossia i 55 °C, rendendo i *primer* specifici per *G. morbida* ed escludendo eventuali amplificazioni di altri funghi presenti. Prove successive negative hanno evidenziato l'incapacità di aggancio al sito da parte del *primer reverse* della coppia interna (geosmithia-r) per cause indipendenti dalla temperatura di lavoro, ma dovute alla conformazione del *primer* stesso. Si è così deciso di eseguire comunque una *nested*-PCR, utilizzando la coppia geosmithiaF1-geosmithiaR1 come esterna, ma la coppia geosmithia-f-geosmithiaR1 come interna.

La temperatura scelta è stata, quindi, di 60 °C, per aumentare ancor di più la specificità dei *primer*.

Poiché si era preoccupati dell'aspecificità dei *primer* relativamente a *Fusarium* sapendo che *F. solani* spesso è associato a *G. morbida*, i *primer* sono stati testati parallelamente su cinque specie di funghi appartenenti a generi diversi da *Geosmithia* (*Trichothecium*, *Beauveria*, *Gliocladium*, *Pythium* e *Fusarium*), derivati da colonie fungine purificate tramite coltura (vedi risultati). In questo modo, si voleva essere certi che la *nested*-PCR non amplificasse anche DNA fungino diverso da *G. morbida*, invalidando così lo studio di presenza/assenza di *G. morbida*. Anche le PCR *in silico* svolte sul sito dell' NCBI, *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov), hanno confermato la specificità dei *primer* per *Geosmithia*.

Il profilo di amplificazione utilizzato per la regione suddetta era identico al precedente, tranne che per la temperatura nella fase di *annealing*, ma, essendo una *nested-PCR*, era ripetuto una seconda volta al termine del primo ciclo.

L'osservazione dei risultati era compiuta tramite elettroforesi su gel; il tempo in cui veniva fatta correre la corrente era di 30' per un voltaggio di 70 V. Le bande di DNA erano poi osservate al trasluminatore UV (Appendice D) (Figura 3.4).

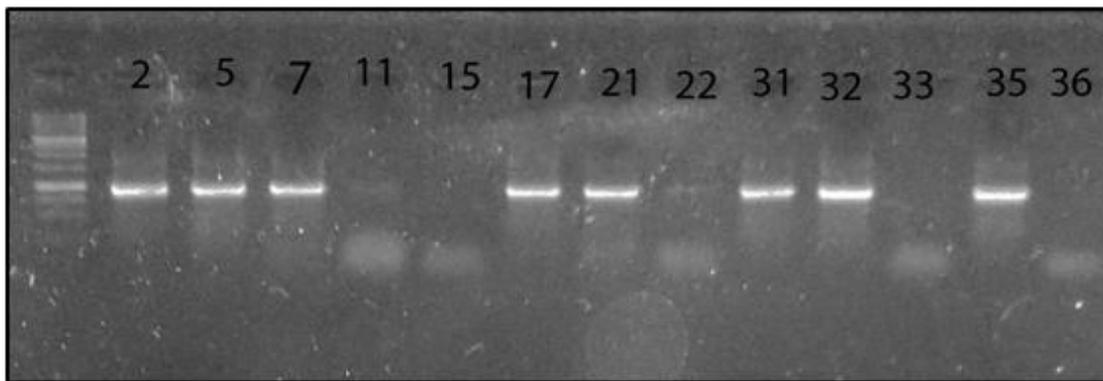


Figura 3.4 - Prodotti di una PCR osservati al trasluminatore; la banda più a sinistra non numerata corrisponde al marcatore (immagine elaborata dall'autore).

Il sequenziamento del DNA è stato l'ultimo passaggio necessario per ottenere dei dati confrontabili; esso prevede la determinazione della sequenza dei nucleotidi a partire dal DNA amplificato dalla PCR e successivamente purificato (Appendice E).

Nel nostro studio si è scelto di sequenziare 12 campioni di DNA di insetto provenienti dai siti di campionamento vicentini scelti casualmente e tutti i campioni positivi derivati dal sito mantovano col *primer forward* C1J-2183; per il DNA del fungo si sono sequenziati gli stessi campioni col *primer reverse* geosmithiaR1, ovviamente se positivi alla presenza di *G. morbida*.

3.5. L'analisi statistica.

Considerando come la presenza o assenza del fungo a livello di singolo albero sia un evento del tutto imprevedibile e indipendente dal sito di infezione, ogni pianta campionata è stata considerata come replica per i vari siti campionati. I siti sono stati comparati mediante analisi della varianza confrontando il numero medio di insetti sfarfallati dalle piante campionate in ogni sito e la loro densità per

decimetro quadro di corteccia. Il test statistico scelto è, quindi, l'ANOVA unifattoriale, relativamente alla densità e alla numerosità.

Prima di procedere col test statistico devono essere testate le assunzioni generali. L'indipendenza delle osservazioni è stata avallata dal metodo di campionamento di cui si è detto; della distribuzione normale delle osservazioni poco si può dire tenuto conto dell'esiguo numero di repliche per siti, ma si può osservare come la media coincida con la mediana per ogni sito (vedi risultati). Infine, prima di applicare il metodo, è importante testare l'omogeneità delle varianze tramite il test-F. Dopo aver verificato le assunzioni è possibile applicare ANOVA; l'ipotesi nulla che si vuole confermare prevede l'uguaglianza delle medie dei tre campioni relativamente a densità e numerosità, quindi la loro appartenenza alla stessa popolazione d'origine.

I confronti circa l'individuazione del fungo tra metodo della coltura su substrato e metodo genetico sono stati compiuti confrontando le percentuali di insetti vettori ottenute tramite i due sistemi di isolamento, raffrontando le varie popolazioni campionate, i sessi (maschi e femmine) e le province (Vicenza e Mantova).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE.

4.1. *Numerosità, curve di volo e densità di colonizzazione di P. juglandis.*

Nell'arco dei due mesi di prelievo degli individui sfarfallati, sono stati raccolti e sessati 737 scolitidi (418 maschi e 319 femmine), purtroppo, non ripartiti egualmente in ciascun elettore, infatti, al termine dell'osservazione, solo 8 elettori a fronte dei 19 totali hanno fornito campioni e da due di essi è stato prelevato un solo individuo (Tabella 4.1). Al momento della raccolta dei campioni, non si aveva modo di capire se i fori presenti sulla corteccia fossero fori di entrata, per cui l'insetto era svernante all'interno, o di uscita, che rendevano il campione nullo; l'unico indizio di un'attività sottocorteccia era la rosura che si accumulava sul fondo degli elettori ad allevamento già approntato. E' evidente che nei raffronti successivi non si possa tener conto degli elettori BR1 e S1, assimilabili ad errori di campionamento.

| Elettore | Data raccolta | Intervallo | N° insetti | N° maschi | N° femmine |
|-----------------|----------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| BR1 | 10-12-2013 | 7 w 6 d | 1 | 1 | 0 |
| BR4a | 10-12-2013 | 14 w 1 d | 151 | 90 | 61 |
| BR4b | 10-12-2013 | 14 w 1 d | 37 | 10 | 27 |
| BZ2a | 15-01-2014 | 9 w 1 d | 86 | 41 | 45 |
| BZ2b | 15-01-2014 | 9 w 1 d | 72 | 44 | 28 |
| S1 | 15-01-2014 | 9 w 1 d | 1 | 1 | 0 |
| T1 | 10-12-2013 | 7 w 4 d | 155 | 89 | 66 |
| T2 | 10-12-2013 | 7 w 6 d | 234 | 141 | 93 |

Tabella 4.1 - Elettori positivi con relativi date di raccolta dei campioni di noce nero, intervallo temporale tra il campionamento e lo sfarfallamento del primo individuo (w=week, d=day) e numero di insetti sfarfallati durante il periodo di osservazione, distinti tra maschi e femmine.

La sex ratio complessiva è tuttavia stata relativamente rispettata; il rapporto è di circa un maschio ogni 0.8 femmine, risultato relativamente buono considerando i soli due mesi di osservazione, periodo in cui l'attività di sfarfallamento non si esaurisce del tutto. Anche a livello di singolo sito viene rispettato quel rapporto,

anzi, in alcuni siti si avvicina di più a quello atteso di 1:1 (BR 1:0.9, BZ 1:0.9, T 1:0.7).

E' importante osservare anche come in alcuni elettori l'attività di sfarfallamento sia iniziata molto avanti rispetto al momento del campionamento, indice del fatto che, probabilmente, non si aveva a che fare solo con adulti svernanti, ma anche con una generazione parzialmente sovrapposta di larve, a conferma delle ipotesi sul ciclo biologico di questo scolitide, non ancora pienamente compreso (Tabella 4.1). Per questo motivo non è possibile creare una curva di volo complessiva dei quattro siti, ma è più sensato osservare le differenze di sfarfallamento tra i diversi siti, a livello di numero complessivo di individui e rispetto alle discrepanze temporali tra maschi e femmine per lo stesso sito e tra siti differenti. Ovviamente è stato possibile costruire delle curve di volo solo per tre siti sui quattro totali.

Relativamente alle curve di sfarfallamento per il totale degli insetti non divisi per sesso, si può notare come la tendenza di tutti i siti sia quella di descrivere una curva prima ascendente, dunque, una volta raggiunto un picco più o meno accentuato, discendente. Ciò è più evidente per Thiene, meno per Bressanvido, dove il ramo discendente è solo accennato, e ancor meno lo è per Bolzano Vicentino, in cui il picco stava probabilmente per essere raggiunto nel momento in cui è terminato il periodo di osservazione (Figura 4.1).

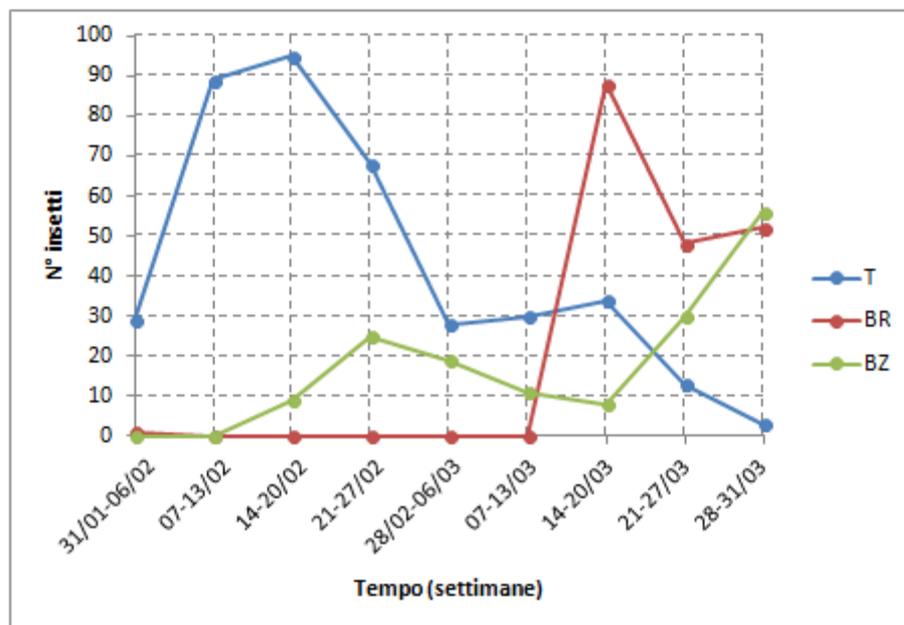


Figura 4.1 - Curve di volo per il totale degli insetti suddivise per sito; in blu Thiene, in rosso Bressanvido e in verde Bolzano Vic. (immagine elaborata dall'autore).

Dal confronto delle curve di volo distinte per sesso nei tre siti si può notare come l'andamento sia dei maschi sia delle femmine riprenda quello complessivo; l'unica differenza significativa è l'anticipazione di una settimana del picco della curva di volo delle femmine nel sito di Bressanvido (Figura 4.2 e Figura 4.3).

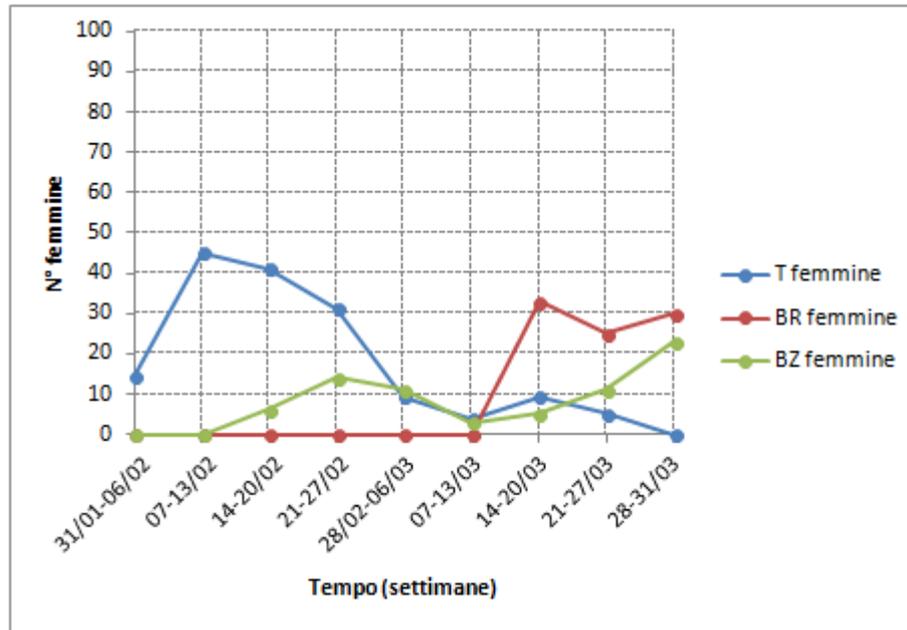


Figura 4.2 - Curva di volo dei maschi suddivisi per sito; in blu Thiene, in rosso Bressanvido e in verde Bolzano Vic. (immagine elaborata dall'autore).

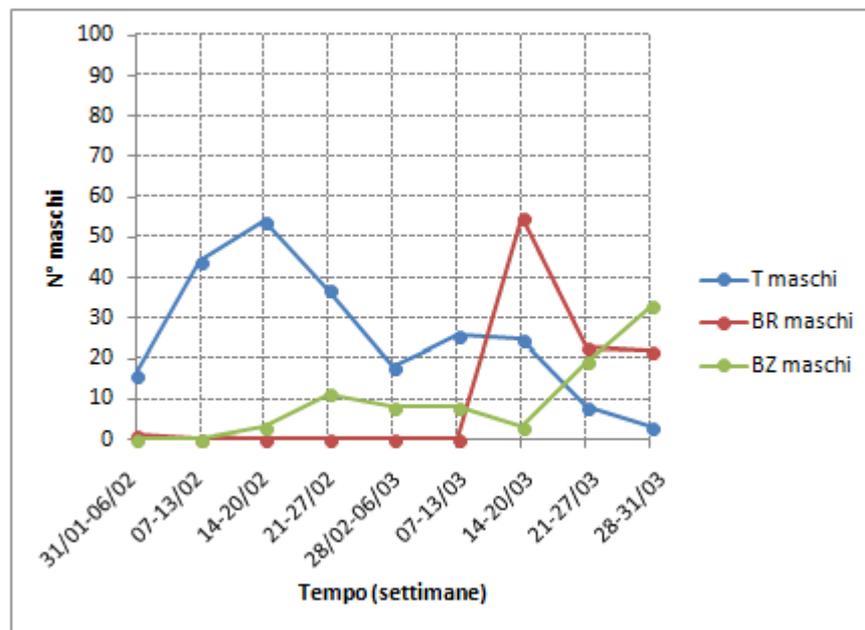


Figura 4.3 - Curva di volo delle femmine suddivise per sito; in blu Thiene, in rosso Bressanvido e in verde Bolzano Vic. (immagine elaborata dall'autore).

Un altro primo dato interessante è quello relativo alla densità di colonizzazione; per densità di colonizzazione si intende il numero di insetti sfarfallati da ogni elettore per decimetro quadro di cortecce dei campioni di legno contenuti nell'elettore. Gli elettori con densità di colonizzazione maggiore sono T2 e T1, entrambi provenienti dal sito di Thiene, che risulta, quindi, il sito più colonizzato (Tabella 4.2).

| Elettore | N° insetti | Superficie | Densità |
|-----------------|-------------------|-------------------|----------------|
| BR1 | 1 | 8.60 | 0.12 |
| BR4a | 151 | 9.46 | 15.97 |
| BR4b | 37 | 7.66 | 4.83 |
| BZ2a | 86 | 5.78 | 14.89 |
| BZ2b | 72 | 6.29 | 11.45 |
| S1 | 1 | 5.98 | 0.17 |
| T1 | 155 | 6.10 | 25.43 |
| T2 | 234 | 8.87 | 26.40 |

Tabella 4.2 - Elettori positivi con relativi insetti sfarfallati, dm² di superficie di cortecchia e densità di colonizzazione.

Prima di confrontare percentuali di presenza o assenza del fungo, si vuole dimostrare statisticamente come i tre siti di cui si dispone dei dati (Bressanvido, Bolzano Vicentino e Thiene) appartengano ad un'unica popolazione, in modo poi da poter raffrontare e discutere i dati di questa complessiva popolazione vicentina. Dall'analisi vengono esclusi i campioni BR1 e S1.

Il test-F per testare l'omogeneità delle varianze è stato applicato su ognuna delle tre coppie di varianza relativa a densità e numerosità; le varianze relative a densità e numerosità risultano omogenee tra di loro per una probabilità del 95% ($F_{\text{critico}}=161.45$ con $\alpha=0.05$ e $df=1$) (Tabella 4.3 e Tabella 4.4).

| Sito | Densità media, \bar{x} (N°/dm ²) | Numerosità del campione, n | Deviazione standard, s (N°/dm ²) | Varianza, s^2 (N° ² /dm ⁴) | Errore standard, $E.S.$ (N°/dm ²) |
|------|--|------------------------------|--|---|---|
| BR | 10.40 | 2 | 7.87 | 61.96 | 5.57 |
| BZ | 13.17 | 2 | 2.44 | 5.93 | 1.72 |
| T | 25.91 | 2 | 0.68 | 0.46 | 0.48 |

Tabella 4.3 - Valori di densità media, deviazione standard, varianza ed errore standard per i tre siti di Bressanvido, Bolzano Vicentino e Thiene.

| Sito | Numerosità media, \bar{x} (N°) | Numerosità del campione, n | Deviazione standard, s (N°) | Varianza, s^2 (N° ²) | Errore standard, $E.S.$ (N°) |
|------|----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| BR | 94 | 2 | 80.61 | 6498 | 57 |
| BZ | 79 | 2 | 9.90 | 98 | 7 |
| T | 194.50 | 2 | 55.86 | 3120.50 | 39.50 |

Tabella 4.4 - Valori di numerosità media, deviazione standard, varianza ed errore standard per i tre siti di Bressanvido, Bolzano Vicentino e Thiene.

In Figura 4.4 e in Figura 4.5 sono riportati i *bar chart* rappresentanti i valori di densità media e numerosità media per ogni sito di campionamento con rispettivo errore standard; le linee rosse indicano rispettivamente la densità media e la numerosità media complessive dei tre siti, valori indispensabili al calcolo dell'ANOVA. In particolare, la densità media complessiva è di 16.49 N°/dm², mentre la numerosità media complessiva vale 122.50 N°.

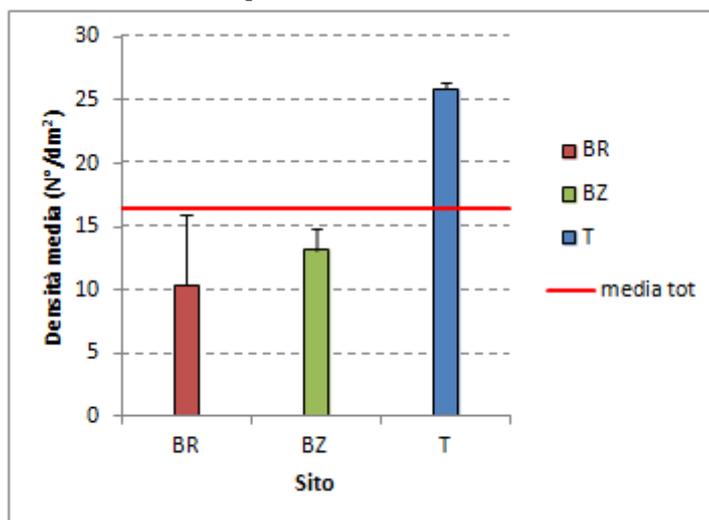


Figura 4.4 - Bar chart rappresentante i tre valori di densità media nei tre siti e relativo errore standard. In rosso la densità media complessiva.

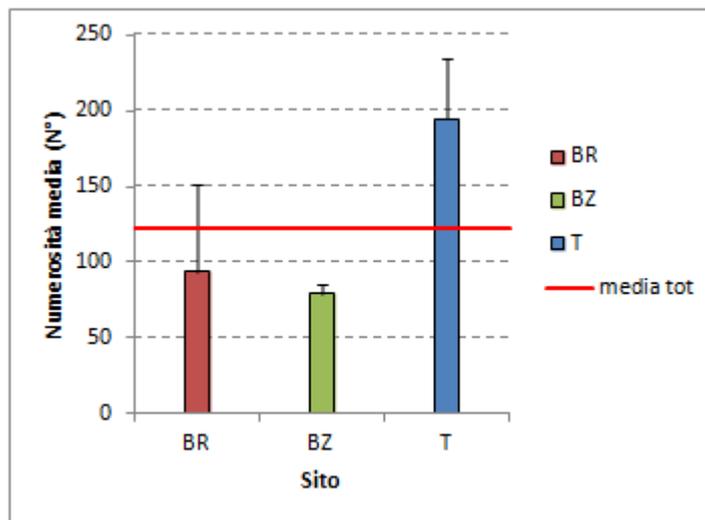


Figura 4.5 - Bar chart rappresentante i tre valori di numerosità media nei tre siti e relativo errore standard. In rosso la numerosità media complessiva.

I risultati di ANOVA relativamente a densità e numerosità dimostrano l'uguaglianza delle medie con una sicurezza del 99% ($F_{\text{critico}}=30.817$ con $\alpha=0.01$ e $df=2;3$), in altre parole, i tre siti appartengono alla stessa popolazione di origine (Tabella 4.5 e Tabella 4.6).

| Variazione | Devianza, SS | Gradi di libertà, <i>df</i> | Varianza, s^2 (N° ² /dm ⁴) | F |
|---------------|--------------|-----------------------------|---|------|
| Tra | 273.82 | 2 | 136.91 | 6.01 |
| Entro | 68.36 | 3 | 22.79 | |
| Totale | 324.17 | 5 | | |

Tabella 4.5 - Riepilogo dei dati utili all'ANOVA unifattoriale relativa alla densità.

| Variazione | Devianza, SS | Gradi di libertà, <i>df</i> | Varianza, s^2 (N° ²) | F |
|---------------|--------------|-----------------------------|------------------------------------|------|
| Tra | 25493.50 | 2 | 7888.5 | 2.44 |
| Entro | 15777.00 | 3 | 3238.83 | |
| Totale | 9716.5 | 5 | | |

Tabella 4.6 - Riepilogo dei dati utili all'ANOVA unifattoriale relativa alla numerosità.

Per quanto riguarda il quarto sito di campionamento, quello di Schio, non si può dimostrare statisticamente che appartenga alla stessa popolazione di appartenenza degli altri tre, ma per la stretta vicinanza con gli altri focolai (<5 km in linea d'aria)

e tenuto conto della capacità di spostamento di *P. juglandis* possiamo concludere che ne faccia parte.

4.2. Isolamento dei funghi associati a *P. juglandis* tramite colture fungine.

Il totale degli individui posti in piastra è stata di 186, di cui 93 maschi e 93 femmine, suddivise per ciascun elettore positivo come riportato in Tabella 4.7.

Ad una prima analisi visiva, si nota che *G. morbida*, laddove presente, formava colonie dalle caratteristiche tipiche, quindi margini lobati, colorazione ocra-giallastra e crescita pianeggiante, tranne per alcune colonie dove il micelio era aereo, fioccoso e ialino. Ad una più attenta osservazione allo stereomicroscopio, erano individuabili i caratteristici rami conidiofori; l'osservazione tramite vetrino rendeva possibile la visualizzazione dei prodotti della moderata conidiogenesi (Figura 4.6).

Geosmithia morbida è stata rilevata sul 37.63% delle piastre totali, col 40.86% di presenza sul totale dei maschi e il 34.41% sul totale delle femmine, percentuali di poco differenti che fanno propendere per una differenza seppur minima nel ruolo di vettore del fungo maggiormente da parte dei maschi.

Un dato più interessante è la distribuzione delle piastre positive a *G. morbida* nei diversi focolai; come si può osservare in Tabella 4.7, solo un elettore del sito di Thiene è positivo alla presenza del fungo, sebbene tutte le piante campionate presentassero i sintomi della malattia. La spiegazione a ciò può essere ricercata nella difficoltà di crescita del fungo in questione rispetto alle altre specie presenti, che potrebbero averlo superato nella colonizzazione del substrato disponibile, o nella scarsità di vettori di *G. morbida* annoverabili fra gli adulti di *P. juglandis*, o, infine, in una effettiva difficoltà di isolamento di *G. morbida* su substrato artificiale, Oltre a *G. morbida* sono state purificate e classificate, almeno a livello di genere, altre 15 specie fungine; il dato più interessante è la constatazione di presenza o assenza di *F. solani* e l'associazione o meno di questo con *G. morbida*.

Sono state individuate tre specie appartenenti al genere *Fusarium*, *F. solani*, *F. lateritium* e *F. proliferatum*, ma, mentre *F. solani* è stato trovato in più piastre, le altre due specie sono state osservate solo in una piastra ciascuna.

In particolare, *F. solani* è stato rilevato sul 30.11% delle piastre totali, col 24.73% di presenza nei maschi e il 35.48% nelle femmine, qui la percentuale di presenza sembra far propendere il sesso femminile come maggior portatore di *F. solani*. Un dato più interessante riguarda l'associazione del fungo con *G. morbida*, infatti l'associazione è confermata solo per il 2.86% dei casi, percentuale irrisoria che non permette di confermare l'associazione attestata invece da diversi autori (Cranshaw e Tisserat, 2012; Tisserat et al., 2009; Chen e Swart, 2000; Carlson et al., 1993; Tisserat, 1987; Cummings e Kuntz, 1986; Weber, 1974) (Tabella 4.7) (Figura 4.6).

| Eclettore | N° piastre totali | | N° piastre con <i>G. morbida</i> | | N° piastre con <i>F. solani</i> | |
|---------------|-------------------|----|----------------------------------|----|---------------------------------|----|
| | M | F | M | F | M | F |
| BR1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BR4a | 5 | 5 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| BR4b | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BZ2a | 5 | 8 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| BZ2b | 8 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T1 | 27 | 34 | 0 | 0 | 22 | 30 |
| T2 | 41 | 36 | 38 | 31 | 1 | 2 |
| Totale | 93 | 93 | 38 | 32 | 23 | 33 |

Tabella 4.7 - Numero di piastre totali, numero di piastre presentanti *G. morbida* e *F. solani*, divise per sesso per ogni eclettore.

Il primato di presenza complessiva spetta al genere *Penicillium* con l' 82.80% di presenza complessiva, percentuale distribuita col 89.25% nei maschi e il 76.34% nelle femmine e uniformemente in tutti i siti (Tabella 4.8). La valutazione della presenza di questo genere di muffe saprofiti non è molto importante, poiché genere di funghi opportunistici in grado di svilupparsi sui più vari substrati e, quindi, molto comuni e poco nocivi (Figura 4.6).

La seconda specie di fungo identificata più volte è stata *Trichothecium roseum* col 25.81% di presenza totale, divisa equamente tra maschi e femmine (12.90%). Da notare poi che *T. roseum* è stato più comunemente rinvenuto nel sito di Bolzano Vicentino e Bressanvido (Tabella 4.8). Questo fungo è un parassita delle piante,

noto per provocare il marciume rosa delle pere, ma può causare disturbi anche alle piante del genere *Carya*, genere simile a *Juglans* (Figura 4.6).

| Eclettore | N° piastre totali | | N° piastre con <i>Penicillium spp.</i> | | N° piastre con <i>T. roseum</i> | |
|---------------|-------------------|-----------|--|-----------|---------------------------------|-----------|
| | M | F | M | F | M | F |
| BR1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BR4a | 5 | 5 | 5 | 5 | 2 | 1 |
| BR4b | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| BZ2a | 5 | 8 | 5 | 8 | 4 | 7 |
| BZ2b | 8 | 5 | 8 | 3 | 8 | 5 |
| S1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| T1 | 27 | 34 | 17 | 17 | 1 | 0 |
| T2 | 41 | 36 | 41 | 33 | 3 | 6 |
| Totale | 93 | 93 | 83 | 71 | 24 | 24 |

Tabella 4.8 - Numero di piastre totali, numero di piastre presentanti *Penicillium spp.* e *T.roseum*, divise per sesso per ogni eclettore.

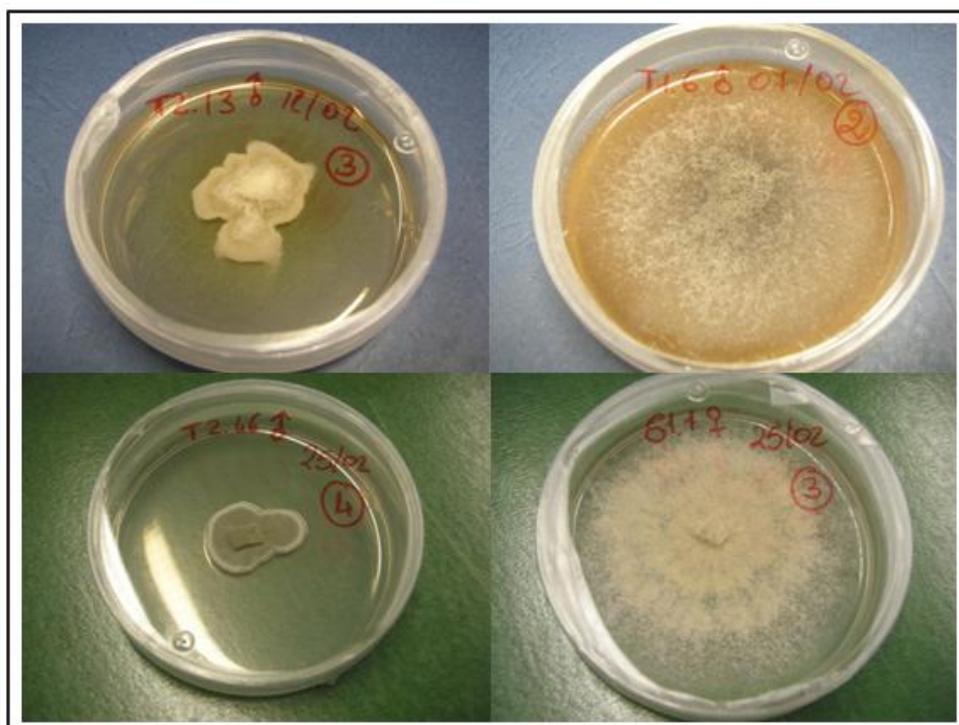


Figura 4.6 - Riprese di alcune specie fungine individuate; dall'alto in basso e da sinistra a destra si ha *G. morbida*, *F. solani*, *Penicillium sp.* e *Trichothecium roseum* (immagine elaborata dall'autore).

Il successivo genere di fungo maggiormente presente è *Aspergillus* col 16.67% di presenza totale, divisa tra il 17.20% nei maschi e il 16.13% nelle femmine; con

presenza più accentuata nel sito di Bolzano Vicentino (Tabella 4.9). Molte specie di *Aspergillus* si sviluppano a danno di cibi ricchi di amido, come i cereali e le patate; essendo un genere di funghi fortemente aerobici crescono in quasi tutti gli ambienti ricchi di ossigeno, per cui la valutazione della sua presenza non è molto importante (Figura 4.7).

Il genere di funghi successivamente identificato è *Cladosporium*, col 16.13% di presenza totale, divisa tra il 12.90% nei maschi e il 19.36% nelle femmine, con maggiore presenza nel sito di Thiene (Tabella 4.9). Molte specie di *Cladosporium* si trovano comunemente su materiale vegetale. Alcune specie sono parassite di piante, altre sono parassite di altri funghi, ma generalmente non crea danni su *Juglans* e non si conoscono eventuali effetti su *G. morbida*.

| Eclettore | N° piastre totali | | N° piastre con <i>Aspergillus spp.</i> | | N° piastre con <i>Cladosporium spp.</i> | |
|---------------|-------------------|----|--|----|---|----|
| | M | F | M | F | M | F |
| BR1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BR4a | 5 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BR4b | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BZ2a | 5 | 8 | 2 | 4 | 4 | 3 |
| BZ2b | 8 | 5 | 8 | 4 | 0 | 1 |
| S1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T1 | 27 | 34 | 1 | 3 | 4 | 11 |
| T2 | 41 | 36 | 4 | 3 | 4 | 3 |
| Totale | 93 | 93 | 16 | 15 | 12 | 18 |

Tabella 4.9 - Numero di piastre totali, numero di piastre presentanti *Aspergillus spp.* e *Cladosporium spp.*, divise per sesso per ogni eclettore.

Un altro genere di funghi identificato dalle colture è stato *Gliocladium* col 15.05% di presenza, divisa tra il 17.20% nei maschi e il 12.90% nelle femmine, con una presenza preponderante nel sito di Thiene (Tabella 4.10). Questo genere ha come substrato di crescita il terreno o la materia organica in decomposizione ed è generalmente considerato un contaminante nelle colture in piastre petri (Figura 4.7).

Anche il genere *Pythium* è stato isolato a più riprese, è complessivamente presente con l'11.29%, diviso tra il 13.98% nei maschi e l'8.60% nelle femmine, con presenza esclusiva nel sito di Thiene (Tabella 4.10). *Pythium* è un genere di fungo residente nel terreno. Diventa patogeno quando si creano delle condizioni

ambientali particolari atte ad una sua proliferazione incontrollata, e naturalmente una pianta mal coltivata o indebolita da altre malattie, diventa substrato di crescita perfetto. Il genere *Pythium* aggredisce principalmente le radici che perdono funzionalità e che portano alla disidratazione della pianta (Figura 4.7).

| Eclettore | N° piastre totali | | N° piastre con <i>Gliocladium spp.</i> | | N° piastre con <i>Pythium spp.</i> | |
|---------------|-------------------|----|--|----|------------------------------------|---|
| | M | F | M | F | M | F |
| BR1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BR4a | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BR4b | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BZ2a | 5 | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BZ2b | 8 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T1 | 27 | 34 | 14 | 12 | 13 | 8 |
| T2 | 41 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Totale | 93 | 93 | 16 | 12 | 13 | 8 |

Tabella 4.10 - Numero di piastre totali, numero di piastre presentanti *Gliocladium spp.* e *Pythium spp.*, divise per sesso per ogni eclettore.

Un altro genere rinvenuto è stato *Rhizopus* col 9.68% di presenza complessiva, divisa tra il 5.38% nei maschi e il 13.98% nelle femmine, preponderatamente a livello del sito di Thiene (Tabella 4.11). Il *Rhizopus* è un genere di muffe che si trova generalmente nel suolo, nella frutta e nella verdura marcescenti e nelle feci animali, può risultare patogeno per alcuni generi di piante, ma non per *Juglans* (Figura 4.7).

Anche il genere *Beauveria* è stato rinvenuto col 5.91% di presenza complessiva, suddivisa tra 4.30% nei maschi e il 7.53% nelle femmine, esclusivamente nel focolaio di infezione di Thiene (Tabella 4.11). La presenza di questo genere è relativamente interessante in quanto è entomopatogeno e gli studi hanno confermato la virulenza di *Beauveria* su appartenenti alla sottofamiglia Scolytinae (Castrillo et al., 2011), tanto che è potenziale strumento di lotta contro diversi coleotteri curculionidi (Sabbahi et al., 2009; Trudel et al., 2007) (Figura 4.7).

| Eclettore | N° piastre totali | | N° piastre con <i>Rhizopus spp.</i> | | N° piastre con <i>Beauveria spp.</i> | |
|---------------|-------------------|----|-------------------------------------|----|--------------------------------------|---|
| | M | F | M | F | M | F |
| BR1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BR4a | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BR4b | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BZ2a | 5 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BZ2b | 8 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T1 | 27 | 34 | 5 | 12 | 4 | 7 |
| T2 | 41 | 36 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Totale | 93 | 93 | 5 | 13 | 4 | 7 |

Tabella 4.11 - Numero di piastre totali, numero di piastre presentanti *Rhizopus spp.* e *Beauveria spp.*, divise per sesso per ogni eclettore.

Infine la purificazione delle piastre madri ha evidenziato la presenza di altri quattro generi di fungo rispettivamente presenti in meno di 10 piastre sulle 186 totali. In particolare, il genere *Alternaria* è stato individuato sul 3.76% delle piastre complessive, suddivise nel 5.38% per i maschi e il 2.15% per le femmine (Tabella 4.12). *Alternaria* è un genere di funghi che comprende specie che causano un tipo di muffa che cresce su frutta e verdura in decomposizione e in ambienti particolarmente umidi; la sua individuazione non è particolarmente significativa (Figura 4.7).

Un altro genere rilevato in percentuale esigua è stato *Epicoccum* con l'1.08% di presenza totale, divisa equamente tra maschi e femmine (0.54%) (Tabella 4.12). Il genere *Epicoccum* è patogeno per le piante sui cui genera macchie fogliari; la sua presenza non è significativa (Figura 4.7).

| Eclettore | N° piastre totali | | N° piastre con <i>Alternaria spp.</i> | | N° piastre con <i>Epicoccum spp.</i> | |
|---------------|-------------------|----|---------------------------------------|---|--------------------------------------|---|
| | M | F | M | F | M | F |
| BR1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BR4a | 5 | 5 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| BR4b | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BZ2a | 5 | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BZ2b | 8 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T1 | 27 | 34 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| T2 | 41 | 36 | 1 | 2 | 1 | 0 |
| Totale | 93 | 93 | 5 | 2 | 1 | 1 |

Tabella 4.12 - Numero di piastre totali, numero di piastre presentanti *Alternaria spp.* e *Epicoccum spp.*, divise per sesso per ogni eclettore.

Con la stessa percentuale di *Epicoccum* (1.08%, divisa equamente tra maschi e femmine con lo 0.54%), è stato individuato il genere *Mucor*, una muffa comune sulla superficie del suolo, delle piante e sui vegetali marcescenti; la sua presenza non è significativa (Tabella 4.13) (Figura 4.7).

Infine, è stato rilevato il genere *Phoma* su un'unica ripresa derivata da un insetto femmina del sito di Thiene (0.54%); la presenza di questo fungo del suolo patogeno per le piante non è significativa (Tabella 4.13).

| Eclettore | N° piastre totali | | N° piastre con <i>Mucor spp.</i> | | N° piastre con <i>Phoma spp.</i> | |
|---------------|-------------------|----|----------------------------------|---|----------------------------------|---|
| | M | F | M | F | M | F |
| BR1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BR4a | 5 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BR4b | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BZ2a | 5 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BZ2b | 8 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| T1 | 27 | 34 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| T2 | 41 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Totale | 93 | 92 | 1 | 1 | 0 | 1 |

Tabella 4.13 - Numero di piastre totali, numero di piastre presentanti *Mucor spp.* e *Phoma spp.*, divise per sesso per ogni eclettore.

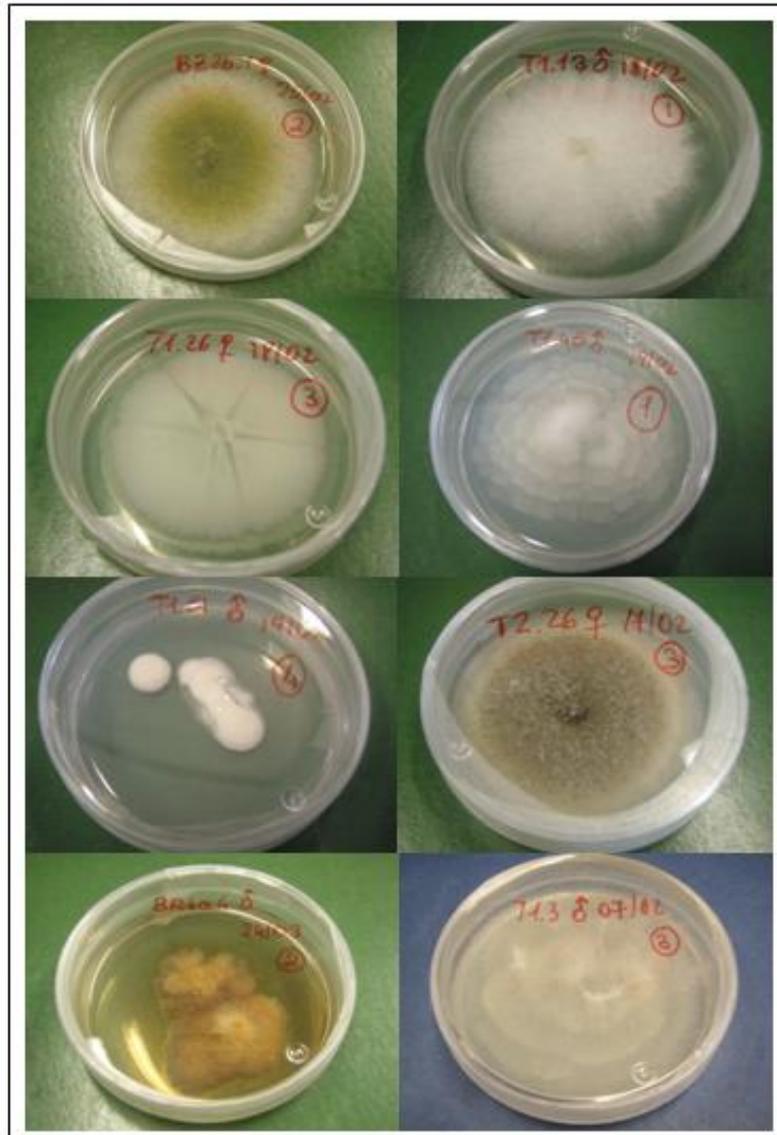


Figura 4.7 - Riprese di alcune specie di funghi individuati; da sinistra a destra e dall'altro in basso, si ha *Aspergillus* sp., *Gliocladium* sp., *Pythium* sp., *Rhizopus* sp., *Beauveria* sp., *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp. e *Mucor* sp. (immagine elaborata dall'autore).

Infine è utile avere a disposizione una tabella riassuntiva che permetta un rapido raffronto tra le specie individuate con relativa percentuale di presenza, suddivisa tra maschi e femmine. (Tabella 4.14).

| Specie | Percentuale totale (%) | Percentuale dei maschi (%) | Percentuale delle femmine (%) |
|--------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| <i>G. morbida</i> | 37.63 | 40.86 | 34.41 |
| <i>F. solani</i> | 30.11 | 24.73 | 35.48 |
| <i>(F. lateritium)</i> | (0.54) | (0) | (0.54) |
| <i>(F. proliferatum)</i> | (0.54) | (0.54) | (0) |
| <i>Penicillium spp.</i> | 82.80 | 89.25 | 76.34 |
| <i>T. roseum</i> | 25.81 | 25.81 | 25.81 |
| <i>Aspergillus spp.</i> | 16.67 | 17.20 | 16.13 |
| <i>Cladosporium spp.</i> | 16.13 | 12.90 | 19.36 |
| <i>Gliocladium spp.</i> | 15.05 | 17.20 | 12.90 |
| <i>Pythium spp.</i> | 11.29 | 13.98 | 8.60 |
| <i>Rhizopus spp.</i> | 9.68 | 5.38 | 13.98 |
| <i>Beauveria spp.</i> | 5.91 | 4.30 | 7.53 |
| <i>Alternaria spp.</i> | 3.76 | 5.38 | 2.15 |
| <i>Epicoccum spp.</i> | 1.08 | 1.08 | 1.08 |
| <i>Mucor spp.</i> | 1.08 | 1.08 | 1.08 |
| <i>Phoma spp.</i> | 0.54 | 0 | 0.54 |

Tabella 4.14 - Riassunto delle specie individuate con relativa percentuale totale e suddivisa tra insetti maschi e femmine.

4.3. Identificazione di *G. morbida* da *P. juglandis* mediante analisi genetica.

L'individuazione di *Geosmithia morbida* tramite *nested*-PCR sui 36 campioni a disposizione, divisi equamente tra i sessi, ha evidenziato una percentuale complessiva di presenza del fungo del 94.44%, col 100.00% di presenza sul totale dei maschi e il 88.89% sul totale delle femmine, percentuali non troppo diverse che non fanno propendere per una differenza nel ruolo di vettore del fungo da parte di un sesso piuttosto che dell'altro. C'è da evidenziare, però, che tramite analisi genetica i maschi risultano tutti vettori del fungo (Tabella 4.15) (Tabella 4.16).

| Eclettore | N° insetti totali | | N° insetti con <i>G. morbida</i> . | |
|---------------|-------------------|----|------------------------------------|----|
| | M | F | M | F |
| BR4a | 3 | 3 | 3 | 3 |
| BR4b | 3 | 3 | 3 | 2 |
| BZ2a | 3 | 3 | 3 | 3 |
| BZ2b | 3 | 3 | 3 | 3 |
| T1 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| T2 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| Totali | 18 | 18 | 18 | 16 |

Tabella 4.15 - Numero di insetti totali analizzati tramite *nested*-PCR e numero di insetti presentanti *G. morbida*.

A conferma del fatto che l'esigua percentuale di negativi (5.56%) non è dovuta ad un deterioramento complessivo del campione, ma indichi realmente un'assenza del fungo, ci sono i risultati della PCR condotta sull'insetto; questi sono positivi per tutti gli insetti analizzati, ciò avvala la percentuale di negativi.

Confrontando le percentuali di presenza complessive e suddivise per sesso derivate da coltura su PDA e i risultati ottenuti tramite analisi genetica, si può notare che la PCR ha evidenziato una percentuale di presenza complessiva maggiore del 56.81%, anche per quanto riguarda la percentuale di presenza nei maschi e nelle femmine è rispettivamente maggiore del 59.14% e del 54.48%. Queste discrepanze possono essere dovute alla natura del fungo, dalla crescita su substrato moderata e facilmente soprafabbile da quella di altre specie, inoltre, la PCR è in grado di amplificare frammenti di DNA anche se presenti in quantità limitata, meno probabile, invece, che una colonia fungina possa svilupparsi da pochissime spore. A confermare ciò, c'è una percentuale complessiva di 11.11% dei campioni che in ripetute sei PCR restituiva prodotti amplificati che, all'osservazione tramite transluminatore, mostrava una quantità di DNA amplificato molto esigua, se non a volte nulla.

L'analisi genetica è stata compiuta anche sui dieci campioni provenienti dalla provincia di Mantova (MN1-10); la PCR sul DNA dell'insetto ha dapprima evidenziato che due campioni non potevano essere considerati nella successiva analisi genetica del fungo perché troppo degradati, tanto che in due PCR consecutive sono risultati nulli.

Le seguenti *nested*-PCR per verificare la presenza di *G. morbida*, effettuate quindi su soli otto campioni mantovani, hanno evidenziato una presenza complessiva del

fungo del 62.50%, mentre non è stato possibile dire nulla riguardo le percentuali di presenza divise per sesso in quanto gli individui provenienti da Bosco Fontana non erano stati precedentemente sessati (Tabella 4.16).

Confrontando la popolazione di Vicenza con quella proveniente dalla provincia di Mantova è evidente che gli individui dei focolai vicentini sono vettori del fungo per il 31.94% in più rispetto alla popolazione mantovana. La differenza però può non essere dovuta ad una reale predisposizione da parte degli scolitidi presenti nei siti vicentini alla simbiosi col fungo, infatti, il metodo di conservazione in etere dei campioni raccolti in provincia di Mantova potrebbe non essere congeniale al mantenimento delle spore del fungo sull'esoscheletro del coleottero, facendo così variare di molto la percentuale di falsi negativi. Inoltre, l'esiguo numero risultante di individui mantovani determina un notevole errore nelle affermazioni fatte.

| Sito (provincia) | Percentuale totale (%) | Percentuale dei maschi (%) | Percentuale delle femmine (%) |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Vicenza | 94.44 | 100.00 | 88.89 |
| Mantova | 62.50 | / | / |

Tabella 4.16 - Confronto tra percentuali totali di presenza del fungo nelle due popolazioni.

Il confronto dei risultati derivati dal sequenziamento prima del DNA dell'insetto e successivamente di quello del fungo sono molto interessanti per stabilire se a livello di sequenze di DNA sussistono differenze tra le due popolazioni, soprattutto relativamente al DNA fungino; questo raffronto è importante poiché nel sito di campionamento di Bosco Fontana l'infezione è latente, mentre *G. morbida* nei focolai vicentini risulta patogena e mortale.

I dati derivati dal sequenziamento dei 12 campioni di scolitide provenienti dai focolai vicentini e degli 8 mantovani dal DNA non danneggiato sono tutti leggibili e non presentano nessuna differenza a livello genetico per la regione osservata che, essendo stata scelta come la più variabile, è la più indicata a presentare differenze qualora presenti.

Le due popolazioni di insetti in realtà appartengono entrambe alla stessa popolazione d'origine; purtroppo non è possibile condurre nessun tipo di analisi

BLAST sulla regione sequenziata poiché, essendo stata scelta per la sua variabilità, non è la regione cui l' NCBI, *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov), fa riferimento come *barcode* di identificazione per *P. juglandis*.

I dati derivati dal sequenziamento dei 12 campioni di fungo provenienti dai focolai vicentini e dei 5 mantovani positivi non sono tutti leggibili, in particolare, due sequenze di *G. morbida* derivate dal sito in provincia di Mantova non erano leggibili ed una terza era troppo corta per qualsiasi raffronto.

A livello genetico le sequenze rimanenti sono identiche per la regione osservata, tranne una proveniente del focolaio di Bolzano Vicentino che presenta un'inserzione puntiforme di base C in posizione 534 (Figura 4.8).

| | |
|---------------------------|------------------------------|
| 1. geosmithia-1_copy_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |
| 2. 2-geoR1_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |
| 3. 5-geoR1_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |
| 4. 7-geoR1_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |
| 5. geosmithia-9_copy_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |
| 6. geosmithia-13_copy | GGGTGAGAGCCCCCGTCCGGTTCGTGCG |
| 7. 17-geoR1_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |
| 8. 21-geoR1_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |
| 9. 22-geoR1_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |
| 10. geosmithia-28_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |
| 11. 31-geoR1_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |
| 12. 35-geoR1_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |
| 13. MN1-geoR1_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |
| 14. MN7-geoR1_copy | GGGTGAGAGCCCC-GTCCGGTTCGTGCG |

Figura 4.8 - Visualizzazione di parte delle sequenze di *G. morbida* tramite in MEGA6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*); è evidente l'inserzione puntuale a livello del campione 13 (immagine elaborata dall'autore).

Sebbene la non manifesta patogenicità di *G. morbida* in Bosco Fontana e l'aggressività dimostrata in provincia di Vicenza, il riscontro su eventuali differenze a livello genetico non ha dato esito positivo. Le cause sono da ricercarsi altrove, anche se la percentuale di errore è elevata, considerato l'esiguo numero di sequenze leggibili per il sito mantovano.

La mutazione puntiforme presente in un'unica sequenza non permette tuttavia particolari deduzioni.

Poiché la regione amplificata e sequenziata, rDNA ITS, è utilizzata come *barcode* fungino, è stata possibile un'analisi BLAST sul sito dell'NCBI, *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov). L'analisi mostra un'identità del 100% con *G. morbida* di tre ceppi americani, due originari della California (U324 e U173) e uno del Colorado (CBS 124663 = CCF 3881), zona nativa della malattia.

5. CONCLUSIONI.

E' innegabile che il cancro rameale del noce si stia diffondendo senza soluzione di continuità negli Stati Uniti, basti pensare che nell'ultimo decennio fungo e insetto hanno progressivamente invaso tutta la costa occidentale degli Stati Uniti e anche parte degli stati orientali, raggiungendo North Carolina e Ohio (Montecchio et al., 2014b). Ora ci si aspetta che nei prossimi decenni tutto l'areale di distribuzione di *J. nigra* possa essere interessato da TCD (Cranshaw e Tisserat, 2012), diffondendo la malattia oltre i confini nazionali, ad esempio in Canada e Mexico (Seybold et al., 2012).

Nei metodi di diffusione sulle lunghe distanze, ciò che ha fatto la differenza è stato il trasferimento umano di merci e materiali, in particolare di legna da ardere, ramaglia di risulta dei processi di lavorazione del noce nero, materiale da pacciamatura e interi tronchi. Questi rappresentano siti idonei a trasportare e mantenere il fungo da alcune settimane a diversi mesi, se non anni (Montecchio et al., 2014; Cranshaw e Tisserat, 2012).

Considerando che la quarantena imposta dagli Stati Uniti è solo interna ai confini nazionali mentre consente l'esportazione di materiale in altri Paesi o continenti, e osservando il sempre maggior potenziamento del commercio internazionale, si può ipotizzare un allargamento delle zone interessate da *P. juglandis* e dunque da TCD.

Il primo rinvenimento del cancro rameale del noce nel nord-est dell'Italia nel settembre 2013 suona come campanello d'allarme per tutta l'Europa.

Lo studio condotto con questa tesi si inserisce nel contesto di un approfondimento delle conoscenze esistenti sull'ecologia di *P. juglandis* e del fungo simbionte *G. morbida* in un contesto, quello italiano, diverso da quello d'origine americano. Il poter disporre di questo tipo di informazioni diventa fondamentale per poter prevedere il potenziale impatto nelle aree di nuova introduzione e per il successivo allargamento dell'areale d'infezione.

Dallo studio è preliminarmente emersa la riconducibilità della popolazione di fungo rinvenuta in Italia a quella dell'areale d'origine americano; questa evidenza di diffusione dell'infezione oltre i confini nazionali dovrebbe far aumentare il grado

di attenzione nei confronti di questa nuova patologia e attivare protocolli di quarantena atti a contenere l'infezione dove già presente e ad evitarla dove non ancora riscontrata.

In secondo luogo, lo studio condotto attraverso coltura su substrato e l'analisi genetica ha evidenziato la maggiore capacità di quest'ultimo metodo di confermare la presenza del fungo, anche qualora i campioni non siano conservati correttamente; questo, unito alla relativa velocità di applicazione, fa di questo metodo il più efficace nel confermare il cancro rameale del noce, anche per futuri controlli.

Quindi, tenendo in maggiore considerazione l'analisi condotta con metodo genetico, si può concludere che quasi il 95.00% degli scolitidi è vettore del fungo, di cui la totalità dei maschi e una percentuale di poco inferiore delle femmine; ciò sta ad indicare che la lotta a questo scoltide va perpetuata a carico di entrambi i sessi, mentre non ha senso sviluppare trappole o altri sistemi di contenimento atti a catturare un sesso piuttosto che l'altro.

Relativamente ai due focolai di infezione rinvenuti, quello vicentino e quello mantovano, il sequenziamento ha stabilito che quelle che si credevano due popolazioni distinte in realtà non presentano differenze a livello di sequenze geniche, a dispetto della non patologicità nel sito di Bosco Fontana; la spiegazione della latenza è, dunque, da ricercare in altri fattori e potrà forse essere utile come metodo di limitazione della malattia.

Infine, le colture su substrato hanno permesso di evidenziare la presenza delle altre specie di funghi associate a *G. morbida*. In particolare è stata constatata che la presenza di *F. solani* non è sempre in associazione con *G. morbida*, anzi, solo in una percentuale irrisoria di casi, circa il 3.00%; è stata inoltre individuata la presenza di circa il 6.00% di *Beauveria spp.*, dato interessante considerando la patogenicità di questo fungo verso alcuni scolitidi. Da ciò si può concludere che *F. solani* non sembra avere un ruolo importante nell'indebolimento e nella colonizzazione delle piante ospiti da parte di *G. morbida*, mentre più interessante potrebbe risultare il ruolo di *Beauveria spp.* in un contesto di lotta e contenimento dello scoltide vettore della malattia.

In conclusione, confermando l'origine americana della popolazione e constatando i gravi danni subiti dalle piantagioni di noce nero nell'areale d'origine della malattia, è fondamentale sviluppare protocolli di lotta e limitazione della malattia; a tal proposito è già in atto una disposizione di trappole a feromoni nel Veneto e nel Friuli-Venezia-Giulia dalla primavera 2014, nonché nei pressi del focolaio in provincia di Mantova ad opera dei Servizi Fitosanitari Regionali (SFR), per il monitoraggio dello scolitide. Inoltre, mentre si cerca di informare i proprietari di piantagione di noce nero sui rischi connessi a questa nuova introduzione, si stanno approntando ricerche e studi col fine di studiare la suscettibilità comparata del noce nero e del noce europeo, nonché dei loro ibridi, più diffusi nel nostro territorio. Ci si interroga anche sulla possibilità di un controllo fitosanitario mediante trattamenti antiparassitari endoterapici, sia curativi, nelle piantagioni già infette, sia preventivi, su individui non ancora attaccati; recenti analisi di laboratorio hanno permesso di selezionare un fungicida estremamente efficace nella devitalizzazione del patogeno in piastra, ma non si conosce la sua funzionalità sull'albero (Montecchio, 2014).

6. BIBLIOGRAFIA.

2002. Convention on Biological Diversity 7-19.04.2002. Alien species that threaten ecosystems, habitats or species. Sixth Ordinary Meeting of the Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity, Decision VI/23, 7-19 april, The Hague, Netherlands.
- Anderson P.K., Cunningham A.A., Patel N.G., Morales F.J., Epstein P.R. e Daszak P. (2004). Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 19:535-544.
- Aukema J.E., Leung B., Kovacs K., Chivers C., Britton K.O., Englin J., Frankel S.J., Haight R.G., Holmes T.P., Liebhold A.M., McCullough D.G. e Von Holle B. (2011). Economic Impacts of Non-Native Forest Insects in the Continental United States. *PloS ONE*, 6(9):e24587.
- Bandyopadhyay R. e Frederiksen R.A. (1999). Contemporary global movement of emerging plant diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 894:28-36.
- Batra L.R. (1963). Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, 66:213-236.
- Battisti A., De Battisti R., Faccoli M., Masutti L., Paolucci P. e Stergulc F. (2013). *Insetti e foreste. Lineamenti di zoologia forestale*, Padova University Press.
- Berryman A.A. (1972). Resistance of conifers to invasion by bark beetle-fungus associations. *BioScience* 22:599-601.
- Blackman M.W. (1928). The genus *Pityophthorus* Eichh. in North America: A revisional study of the Pityophthorini, with descriptions of two new genera and seventy-one new species. *Bulletin of the New York State College of Forestry*, 1(3-6):183.
- Bright D.E. (1981). Taxonomic monograph of the genus *Pityophthorus* Eichhoff in North and Central America. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 118:378.
- Bright D.E. e Stark R.W. (1973). The Bark Beetles and Ambrosia Beetles of California (Scolytidae and Platypodidae). *Bulleting of the California Insect Survey*, 16:169.

- Brockerhoff E.G., Jones D.C., Kimberley M.O., Suckling D.M. e Donaldson T. (2006a). Nationwide survey for invasive wood-boring and bark beetles (Coleoptera) using traps with pheromones and kairomones. *Forest Ecology and Management*, 228:234-240.
- Brockerhoff E.G., Bain J., Kimberley M.O. e Knizek M. (2006b). Interception frequency of exotic bark and ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytinae) and relationship with establishment in New Zealand and worldwide. *Canadian Journal of Forest Research*, 36:289-298.
- Carlson J.C., Mielke M.E., Appleby J.E., Hatcher R., Hayes E.M., Luley C.J., O'Brien J.G. & Rugg D.J. (1993). Survey of black walnut canker in plantations in five central states. *Northern Journal of Applied Forestry*, 10:10-13.
- Castrillo L.A., Griggs M.H., Ranger C.M., Reding M.E. e Vandenberg J.D. (2011). Virulence of commercial strains of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum* (Ascomycota: Hypocreales) against adult *Xylosandrus germanus* (Coleoptera: Curculionidae) and impact on brood. *Biological Control*, 58: 121-126.
- Chen W. e Swart W.J. (2000). First report of stem canker of English walnut caused by *Fusarium solani* in South Africa. *Plant Disease*, 84:592.
- Cranshaw W. (2011). Recently recognized range extensions of the walnut twig beetle, *Pityophthorus juglandis* Blackman (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), in the western United States. *The Coleopterists Bulletin*, 65:48-49.
- Cranshaw W. e Tisserat N. (2008). Walnut twig beetle and Thousand cankers disease of Black walnut. Colorado State University Extension, www.ext.colostate.edu/pubs/insect/0812_alert.pdf.
- Cranshaw W. e Tisserat N. (2012). Questions and Answers about Thousand Cankers Disease of Walnut. Colorado State University Extension, www.ext.colostate.edu/pubs/insect/qa.pdf.
- Cummings J.E. e Kuntz J.E. (1986). Stem canker on black walnut caused by *Fusarium sporotrichioides*. 77th Annual Report of Northern Nut Growers Association Journal, 85-92.

- DAISIE project (2008). Handbook of alien species in Europe. 6th Framework Programme of the European Union, 2:15-28.
- Davis T.S. e Hofstetter R.W. (2011). Reciprocal interactions between the bark-beetle associated yeast *Ogataea pini* and host plant phytochemistry. *Mycologia*, 103:1201-1207.
- Desprez-Loustau M.L., Courtecuisse R., Robin C., Husson C., Moreau P.A., Blancard D., Selosse M.A., Lung-Escarmant B., Piou D. e Sache I. (2010). Species diversity and drivers of spread of alien fungi (sensu lato) in Europe with a particular focus on France. *Biological Invasions*, 12:157-172.
- Fisher M.C., Henk A.D., Briggs C.J., Brownstein J.S., Madoff L.C., McCraw S.H. e Gurr S.J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plants and ecosystems. *Nature*, 484:186-194.
- Frank S. e Bambara S. (2010). Walnut twig beetle and Thousand cankers disease in NC. North Carolina Cooperative Extension, www.ces.ncsu.edu/depts/ent/notes/O&T/trees.
- Francke-Grosmann H. (1967). Ectosymbiosis in wood-inhabiting insects. *Symbiosis*, 2:141-205.
- Furniss R.L. e Carolin V.M. (1977). Family Scolytidae – Bark Beetles. *Western Forest Insects*. 3:401-402.
- Google Earth for Windows Versione 7.1.2.2041. Mountain View, California: Goggle.
- Grant J.F., Windham M.T., Haun W.G., Wiggins G.J. e Lambdin P.L. (2011). Initial Assessment of Thousand Cankers Disease on Black Walnut, *Juglans nigra*, in Eastern Tennessee. *Forests*, 1:744.
- Graves A.D., Coleman T.W., Flint M.L. e Seybold S.J. (2009). Walnut twig beetle and thousand cankers disease: Field identification guide. UC-IPM Website Publication, www.ipm.ucdavis.edu/PDF/MISC/thousand_cankers_field_guide.pdf.
- Haack R.A. (2006). Exotic bark- and wood-boring Coleoptera in the United States: recent establishments and interceptions. *Canadian Journal of Forest Research*, 36:269-288.
- Harrington T.C. (2005). Ecology and evolution of mycophagous bark beetles and their fungal partners. *Insect-Fungal Associations, Ecology and Evolution*, 11:257-291.

- Holmes P.T., Aukema J.E., Von Holle B., Liebhold A. e Sills E. (2009). Economic impacts of invasive species in forests. *The Year in Ecology and Conservation Biology*, 1162:18-38.
- Hulme P.E. (2007). Biological invasions in Europe: drivers, pressures, states, impacts and responses. *Biodiversity Under Threat*, 25:56-80.
- Hulme P.E. (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology*, 46:10-18.
- IUCN (2000). Guidelines For The Prevention Of Biodiversity Loss Cuased By Alien Invasive Species. 51st Meeting of IUNC Council, Gland, Switzerland, february 2000.
- Jesse L., Windham M., Windham A., Randall J., Shour M., Lewis D. e Gleason M. (2012). Thousand cankers Disease of Walnut. USDA NIFA Integrated Pest Management Program, www.ncipmc.org/alerts/thousand_cankers.pdf
- Kirisits T. (2004). Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi. *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*, 10:181-236.
- Kirkendall L.R. e Faccoli M. (2010). Bark beetles and pinhole borers (Curculionidae, Scolytinae, Platipodinae) alien to Europe. *ZooKeys*, 56:227-251.
- Klepzig K.D. e Six D.L. (2004). Bark beetle-fungal symbiosis: Context dependency in complex associations. *Symbiosis*, 37:189-205.
- Knizek M. e Beaver R. (2004). Taxonomy and Systematics of Bark and Ambrosia Beetles. *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*, 5:41-54.
- Kolarik M., Kubàtovà A., Pazoutovà S. e Srutka P. (2004). Morphological and molecular characterization of *Geosmithia putterillii*, *G. pallida* comb. nov. and *G. flava* sp. nov., associated with subcorticolous insects. *Mycol Res*, 108:1053-1069.
- Kolarik M., Kubàtovà A., Cepicka I., Pazoutovà S. e Srutka P. (2005). A complex of three new white-spored, sympatric and host-range limited *Geosmithia* species. *Mycol Res*, 109:1323-1336.

- Kolarik M., Kostovcik M. e Pazoutova S. (2007). Host range and diversity of the genus *Geosmithia* (Ascomycota: Hypocreales) living in association with bark beetles in the Mediterranean area. *Mycol Res*, 11:1298-1310.
- Kolarik M., Kubàtovà A., Hulcr J. e Pazoutovà S. (2008). *Geosmithia* fungi are highly diverse and consistent bark beetle associates: evidence from their community structure in temperate Europe. *Microb Ecol*, 55:65-80.
- Kolarik M. e Kirkendall L.R. (2010). Evidence for a new lineage of primary ambrosia fungi in *Geosmithia* Pitt (Ascomycota: Hypocreales). *Fungal Biol*, 114:676-689.
- Kolarik M., Freeland E., Utley C. e Tisserat N. (2011). *Geosmithia morbida* sp. nov., a new phytopathogenic species living in symbiosis with the walnut twig beetle (*Pityophthorus juglandis*) on *Juglans* in USA. *Mycologia*, 103(2):325-332.
- Leonard E. (2011). Virginia's Black Walnut Trees Face Lethal Threat. Clarke Daily News, www.clarkedailynews.com/virginias-black-walnut-trees-face-lethal-threat.
- Lieutier F. (2004). The bawbilt context in Europe. *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*, 1:3-10.
- Lieutier F., Yart A. e Salle A. (2009). Stimulation of tree defenses by Ophiostomatoid fungi can explain attack success of bark beetles on conifers. *Annals of Forest Science*, 66(8):22.
- Linnakoski R., De Beer Z.W., Niemelä P. e Wingfield M.J. (2012). Associations of conifer-infesting bark beetles and fungi in Fennoscandia. *Insects*, 3:200-227.
- Mack R.N., Simberloff D., Lonsdale W.M., Evans H., Clout M. e Bazzaz F.A. (2000). Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecological application*, 10:689-710.
- Malloch D. e Blackwell M. (1993). Dispersal biology of the ophiostomatid fungi. *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity*. 10:195-206
- Marini L., Haack R.A., Rabaglia R.J., Petrucco Toffolo E., Battisti A. e Faccoli M.(2011). Exploring associations between international trade and environmental factors with establishment patterns of alien Scolytinae. *Biological invasions* 13:2275-2288.

- Mathiesen-Käärik A. (1953). Eine Übersicht über die gewöhnlichsten mit Borkenkäfern assoziierten Bläuepilze in Schweden und einige für Sweden neue Bläuepilze. *Meddelanden från Statens Skogsforskningsinstitut*, 43:1-74.
- MEGA6 for Windows Versione 6.06. Tempe, Arizona: MEGA.
- Montecchio L. (2014). Il cancro rameale del noce. *Veneto Agricoltura*, Legnaro, 1 aprile 2014.
- Montecchio L. e Faccoli M. (2014). First record of Thousand Cankers Disease *Geosmithia morbida* and walnut twig beetle *Pityophthorus juglandis* on *Juglans nigra* in Europe. *Plant Disease*, 98:5.
- Montecchio L., Faccoli M., Mezzalana G. e Vettorazzo M. (2014a). Il cancro rameale del noce. Una nuova emergenza fitosanitaria per l'Europa. *Programma di Sviluppo Rurale per il Veneto*.
- Montecchio L., Fanchin G., Simonato M. e Faccoli M. (2014b). First record of Thousand Cankers Disease fungal pathogen *Geosmithia morbida* and Walnut Twig Beetle *Pityophthorus juglandis* on *Juglans regia* in Europe. *Plant Disease*, apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-07-14-0719-PDN.
- Mooney H.A. e Cleland E.E. (2000). The evolutionary impact of invasive species. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*. 98:5446-5451.
- Nischwitz C. e Murray M. (2011). Thousand Cankers Disease of Walnut (*Geosmithia morbida*). Utah State University Cooperative Extension, www.thousandcankers.com/media/docs/USU_TCD_Factsheet_8_2011.pdf.
- Paine T.D., Raffa K.F. e Harrington T.C. (1997). Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Review of Entomology*, 42:179-206.
- Peay K.G., Kennedy P.G. e Bruns T.D. (2008). Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *BioScience*, 58:799-810.
- Pimentel D., Zuniga R. e Morrison D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* 52:273-288.
- Pitt J.I. e Hocking A.D. (2009). The Ecology of Fungal Food Spoilage. *Fungi and food spoilage*, 1:3-9.

- Pysek P. e Richardson D.M. (2006). The biogeography of naturalization in alien plants. *Journal of Biogeography*, 33:2040-2050.
- Raffa K.F., Aukema B.H., Bentz B.J., Carroll A.L., Hicke J.A., Turner M.G. e Romme W.H. (2008). Cross-scale drivers of natural disturbances prone to anthropogenic amplification: The dynamics of bark beetle eruptions. *BioScience*, 58:501-517.
- Richardson D.M., Pysek P., Rejmànek M., Barbour M.G., Panetta F.D. e West C.J. (2000). Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions*, 6:93-107.
- Sauvard D., Branco M., Lakatos F., Faccoli M. e Kirkendall L. (2010). Weevils and bark beetles (Coleoptera, Curculionidae). *BioRisk* 4:219-266.
- Sabbahi R., Merzouki A. e Guertin C. (2009). Potential effect of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on *Anthonomus signatus* (Coleoptera: Curculionidae) in strawberries. *Biocontrol Science and Technology*, 19(7):729-741.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Bolchacova E., Voigt K. e Crous P.W. (2012). Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy Of Sciences of the United States of America*, 16:6241-6246.
- Seybold S.J., Coleman T.W., Dallara P.L., Dart N.L., Gravea A.D., Pederson L.A. e Spichiger S.E. (2012). Recent collecting reveals new state records and geographic extremes in the distribution of the walnut twig beetle, *Pityophthorus juglandis* Blackman (Coleoptera: Scolytidae), in the United States. *BioOne*, 88(2):277-280.
- Seybold S., Haugen D. e Graves A. (2013a). Thousand Cankers Disease. United States Department of Agriculture: Forest Service, na.fs.fed.us/pubs/palerts/cankers_disease/thousand_cankers_disease_print_res.pdf.
- Seybold S.J., Dallara P.L., Hishinuma S.M. e Flint M.L. (2013b). Detecting and identifying the walnut twig beetle: Monitoring guidelines for the invasive vector of thousand cankers disease of walnut. University of California

- Agriculture and Natural Resources IPM Program,
www.fs.fed.us/psw/publications/seibold/psw_2012_seibold007.pdf.
- Six D.L. (2003). Bark beetle-fungus symbioses. *Insect Symbiosis*, 1:97-114.
- Solheim H. (1993). Ecological aspects of fungi associated with *Ips typographus* in Norway. *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity*, 8:235-242.
- Tisserat N. (1987). Stem canker of black walnut caused by *Fusarium solani* in Kansas. *Plant Disease*, 71:557.
- Tisserat N., Cranshaw W., Leatherman D., Utley C. e Alexander K. (2009). Black walnut mortality in Colorado caused by the walnut twig beetle and thousand cankers disease. *Plant Health Progress*, entnemdept.ufl.edu/pestaalert/thousand_cankers_disease_CO_0810.pdf.
- Trudel R., Lavallée R., Guertin C., Côté C., Todorova S.I., Alfaro R. e Kope H. (2007). Potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the white pine weevil, *Pissodes strobi* (Col., Curculionidae). *Journal of Applied Entomology*, 131(2):90-97.
- USDA Forest Service (2002). Forest Insect and Disease Conditions of the Southwestern Region, 2001. Forestry and Forest Health Publication, www.fs.fed.us/r8/foresthealth/2001conditions/index.html.
- USDA Forest Service (2010). Thousand Cankers Disease of Black Wlanut: How to Identify and Prevent Spread of Thousand Cankers Disease. Forestry and Forest Health Publication, www.fs.fed.us/foresthealth/fhm/sp/tcd/tcd.shtml.
- Utley C.W., Cranshaw S., Seybold J., Graves A.D., Leslie C.A., Jacobi W. e Tisserat N. (2009). Susceptibility of *Juglans* and *Carya* species to *Geosmithia*; a cause of thousand cankers disease. *Phytopathology*, 99:133.
- Utley C., Nguyen T., Roubtsova T., Coggeshall M., Ford T.C., Graulke L.J., Graves A.D., Leslie C.A., McKenna J., Woeste K., Yaghmour M.A., Cranshaw W., Seybold S.J., Bostock R.M. e Tisserat N.A. (2013). Susceptibility of walnut and hickory species to *Geosmithia morbida*. *Plant Disease*, 97:5:601-607.
- Vettorazzo M. e Zampini M. (2007). Organismi di quarantena e prequarantena della piante forestali per l'Unione Europea. In Atti Forum fitoiatrici – Giornate di studio, 8-9, Legnaro, Italia, 24 maggio 2007.

- Vilà M., Espinar J.L., Hejda M., Hulme P.E., Jarosik V., Maron J.L., Pergl J., Schaffner U., Sun Y. e Pysek P. (2011). Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems. *Ecology Letters*, 14:702-708.
- Weber B.C. (1974). An apparent symbiosis between *Fusarium* fungi and ambrosia beetles causes canker on black walnut stems. *Plant Disease*, 58: 1044-1047.
- Wood S.L. (1982). The bark and the ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae) a taxonomic monograph. *Great basin naturalist memoirs*, 6:1123.
- Wood S.L. e Bright D.E. (1992). A catalog of Scolytidae and Platypodidae (Coleoptera). *Great Basin Naturalist Memoirs*, 13:1005.

7. SITOGRAFIA.

- APS Journal, plant disease, <http://apsjournals.apsnet.org/loi/pdis>.
- Clarke Daily News, <http://www.clarkedailynews.com/>.
- Colorado State University Extension, <http://www.ext.colostate.edu/>.
- Entomology & Nematology, <http://entnemdept.ufl.edu/>.
- EPPO Global Database, <http://gd.eppo.int/>.
- Forestry Images, <http://www.forestryimages.org/>.
- Happy Tree, <http://www.happytreeltd.com/>.
- Iowa Tree Pests, http://www.iowatreepests.com/tcd_home.html.
- IUCN, *International Union for Conservation of Nature*, <http://www.iucn.org/>.
- NC State University A&T State University Cooperative Extension,
<http://www.ces.ncsu.edu/>.
- NCBI, *National Center for Biotechnology Information*,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- North Central Region Integrated Pest Management Center,
<http://www.ncipmc.org/>.
- Northeastern Area State and Private Forestry, <http://na.fs.fed.us/>.
- PloS ONE, <http://www.plosone.org/>.
- Thousand Cankers Disease, <http://www.thousandcankers.com/>.
- UC-IPM Online, University of California Agriculture & Natural Resources,
<http://www.ipm.ucdavis.edu/index.html>.
- USDA Forest Service, <http://www.fs.fed.us/publications/>.

RINGRAZIAMENTI.

Desidero ricordare tutti coloro che mi hanno aiutato nella realizzazione dello studio e nella stesura della tesi con suggerimenti, critiche ed osservazioni: a loro va la mia gratitudine.

Ringrazio anzitutto la Dott.ssa Genny Fanchin e il Dott.re Severino Zanella per la grande disponibilità e cortesia dimostratemi.

Un sentito ringraziamento va a tutto il personale dei laboratori di Entomologia Forestale e Patologia Forestale per la gentilezza e comprensione manifestatemi.

Desidero inoltre ringraziare i Servizi Fitosanitari della Regione Veneto per la collaborazione durante le fasi di campo e l'interessamento avuti per l'argomento della tesi.

Un ringraziamento particolare va alle persone a me più care: la mia famiglia e il mio fidanzato per la pazienza e l'incoraggiamento.

Vorrei infine ringraziare amici e parenti tutti per la vicinanza dimostratami.

APPENDICE A – Preparazione del PDA.

La preparazione del PDA è molto semplice dal momento che il *Potato Dextrose Agar* è venduto già pronto all'utilizzo. Le dosi sono di 39 g di PDA per ogni litro di acqua deionizzata.

Tramite bilancia viene pesato il PDA, che si presenta sotto forma di polvere biancastra; in una beuta dalla capacità superiore al totale del composto viene aggiunta mediante cilindro graduato l'acqua alla polvere. Dopo aver tappato la beuta con una garza appallotolata e della stagnola, il tutto viene posto su agitatore magnetico, in modo che tutta la polvere si sciogla in acqua. Dopo qualche minuto, si può sterilizzare la soluzione ponendola in autoclave per 15' a 120 ± 1 °C.

Una volta che la beuta è stata sterilizzata, si può iniziare a riempire le piastre petri con la soluzione, ora amalgamata. Il PDA inizia a solidificare ad una temperatura di circa 50 °C; nel preparare del semplice PDA si può iniziare il lavoro di piastratura ad una temperatura di 40-45 °C, ma, dal momento che si vuole aggiungere l'antibiotico, si deve aspettare che questa scenda almeno a 37-38 °C, per non danneggiare le strutture proteiche dell'antibiotico e renderlo inefficace (streptomicina: 5 ml/l).

La piastratura va eseguita sotto cappa a flusso verticale e lavorando in sterilità; le singole piastre sono riempite mediante una siringa avente un ago dal diametro importante, che, tramite un tubicino, risucchia PDA in via di solidificazione dal fondo della beuta (\emptyset 94 mm/10 ml PDA, \emptyset 60 mm/5 ml PDA). La beuta è posta su un agitatore per mantenere in movimento il liquido.

Una volta completata la piastratura e aver atteso che il PDA si sia solidificato, ogni capsula petri viene chiusa con del parafilm, per evitare contaminazioni esterne.

APPENDICE B – Protocollo di estrazione del DNA, metodo *salting out*.

Il metodo di estrazione *salting out* prevede di aggiungere all'eppendorf contenente il campione di cui si desidera estrarre il DNA 140 µl del buffer di estrazione (0.1 M EDTA). Ora è possibile ridurre in frammenti il campione all'interno dell'eppendorf tramite un pestello sterile, in modo da permettere l'azione del buffer.

Dopo l'aggiunta di 17.5 µl di SDS (Sodio Dodecil Solfato) 10%, un tensioattivo, e di 2 µl di proteinasi K, un enzima che digerisce le proteine, il tutto va lasciato agire da 3h ad un'intera notte, in bagnetto termostato a 55 °C.

Ora è possibile aggiungere 2 µl di RNase, un enzima che degrada l'RNA, e lasciarlo agire per 2-3', dunque, possono essere aggiunti 40 µl di una soluzione satura di NaCl (>6M), prima vortexando per 20' e poi centrifugando per 30' a 14000 rpm.

Adesso è possibile trasferire il supernatante in una nuova eppendorf, mediante micropipetta; si aggiunge un volume di 200 µl di isopropanolo, conservato a -20 °C, necessario per far precipitare il DNA, modificando la solubilità della soluzione.

Dopo aver vortexato bene e centrifugato per 20' a 4 °C a 14000 rpm, si può eliminare il supernatante, versandolo in un becker e tenendo l'eppendorf capovolta su della carta assorbente per qualche minuto, in questo modo si asciuga il pellet sul fondo dell'eppendorf. Il pellet va dilavato aggiungendo nell'eppendorf 500 µl di EtOH 70%, alcool etanolo, dunque, si centrifuga per 10' a 4 °C a 14000 rpm.

Ancora una volta si elimina il supernatante, nello stesso modo in cui si è agito precedentemente.

Il pellet viene poi asciugato in un forno di essiccazione a 37 °C; ora si può sciogliere il DNA con 20 µl di H₂O sterile.

APPENDICE C – La reazione a catena della polimerasi, PCR e *nested*-PCR.

La PCR sintetizza e moltiplica un segmento di DNA a doppia elica partendo da una quantità anche minima di DNA che si desidera riprodurre, fornendole i nucleotidi, con cui comporre i nuovi filamenti, e i primer, brevi sequenze complementari al segmento da riprodurre e punti di innesco per la DNA-polimerasi.

È possibile quindi ricostruire le condizioni che portano alla formazione dei nuovi segmenti di DNA, ponendo in soluzione:

- 2.0 µl del DNA che si intende riprodurre, se necessario anche diluito;
- 1.0 µl di dNTPs (2 mM), nucleotidi liberi per creare i nuovi filamenti;
- 1.0 µl di entrambi i *primer forward* e *reverse* (10 µM);
- 0.2 µl di Taq-polimerasi (5 U/µl), DNA-polimerasi resistente alle alte temperature;
- 4.0 µl di *buffer* (5X) che mantiene il pH stabile e crea l'ambiente adatto per la reazione;
- 2.0 µl di MgCl₂ (25mM), cloruro di magnesio, elemento di supporto per il funzionamento della Taq-polimerasi;
- 8.8 µl di H₂O sterile.

Solitamente si prepara il mix sopra descritto, anche a concentrazioni dimezzate, per poi aliquotarlo nelle eppendorf adattabili al termociclatore.

Dopo aver caricato le eppendorf così preparate nel termociclatore, vengono impostati i parametri di temperatura e durata di ogni singola fase della reazione.

Le tre fasi principali sono quella di denaturazione, *annealing* e prolungamento.

Dopo una prima fase di inzializzazione di 3' a 95 °C, inizia la denaturazione, passaggio di durata 30" in cui la soluzione viene portata a una temperatura di 95 °C. Ora la doppia elica del DNA viene completamente scissa nei due filamenti di cui è composta. Durante la successiva fase di *annealing* la temperatura viene abbassata fino a 60 °C per 30", al fine di permettere il legame dei *primer* alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati. Infine la temperatura viene alzata fino a 72 °C per 1'30" nella fase di prolungamento per massimizzare l'azione della Taq-polimerasi, che determina un allungamento dei *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA. Qui 1' corrisponde a 1 Kbp. Al

termine, il ciclo di amplificazione si chiude con 5' a 72 °C per il prolungamento finale.

Il ciclo principale di denaturazione, *annealing* e prolungamento descritto viene ripetuto generalmente per 35 volte.

La *nested*-PCR funziona esattamente allo stesso modo, ma al termine del primo ciclo di amplificazione, la soluzione ottenuta viene diluita 1:10 e ricaricata per un secondo ciclo completo sul termociclatore.

APPENDICE D – L'elettroforesi su gel.

L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica classicamente utilizzata per analizzare e separare acidi nucleici. Questa tecnica sfrutta le cariche presenti nelle molecole di DNA o RNA (caricate negativamente) per farle migrare, in un campo elettrico, attraverso un gel di agarosio. Il gel funge da setaccio, essendo costituito da una rete di pori, i quali consentono di separare le molecole in base alla loro grandezza: quelle più piccole attraversano più velocemente i pori rispetto a quelle più grandi quindi si avrà una separazione in funzione della velocità.

Per prima cosa va preparato il gel di agarosio (1%); la polvere di agarosio va sciolta a caldo nel TBE nelle proporzioni di 1 g di agarosio ogni 100 ml di TBE (1X); per preparare il TBE (1X) vanno diluiti 20 ml di TBE (5X) con 80 ml di acqua distillata. Ogni set di 24 campioni necessita di circa 30 ml di agarosio. Ogni 10 ml di gel vanno aggiunti 0.2 µl di *SYBR Safe*, un colorante degli acidi nucleici.

Una volta sciolto, il gel fuso va versato nell'apposito vassoio per attendere la solidificazione che avviene quando il colore vira dal trasparente al grigio-biancastro. Nel frattempo, possono essere approntati i campioni in una piastra di Terasaki, aggiungendo per ogni campione 2-3 µl di buffer di caricamento e 4 µl dal campione.

Ora i campioni possono essere caricati nei pozzetti del gel, aggiungendo nel primo 3 µl di marcatore dimensionale. Dopo aver fatto correre il gel per mezz'ora, lo si può controllare al trasluminatore UV.

APPENDICE E – Il processo di purificazione del DNA.

Esistono diverse metodiche per la purificazione del DNA più o meno complesse secondo il grado di purezza e d'integrità che si desidera ottenere.

La purificazione è necessaria per rimuovere le proteine strutturali strettamente associate alle molecole di DNA. Questo scopo viene raggiunto tramite estrazioni con solventi organici (fenolo, cloroformio).

Il protocollo usato prevede l'utilizzo di *strip* per PCR; in ogni fialetta ai 5 µl di campione amplificato vengono aggiunti 0.5 µl di esonucleasi (EXO) e 0.5 µl di fosfatasi (SAP). La *strip* viene messa nel termociclatore per un ciclo che prevede 15' a 37 °C e poi 15' a 80 °C.

Al termine del processo, in una nuova *strip* vengono aggiunti 1 µl del primer (10µM) che si intende usare per il sequenziamento ed una quantità variabile di campione purificato a seconda della sua concentrazione, se debole 1.5 µl, se normale 1 µl e se concentrato 0.8 µl.

Il sequenziamento viene svolto da BMR Genomics (www.bmr-genomics.it), specificando il tipo di prodotto che gli si sta inviando, ossia prodotto della PCR, la lunghezza dello stesso (700 bp per il *barcode*) e il tipo di purificazione eseguita, ossia una reazione enzimatica.

A sequenziamento compiuto, saranno disponibili le sequenze nucleotidiche dei campioni inviati.