



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE DELLE PRODUZIONI VEGETALI

INDIRIZZO PROTEZIONE DELLE COLTURE - CICLO XX

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

Endofiti fungini presenti in strutture riproduttive di Quercus robur.

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Andrea Battisti

Supervisore : Ch.mo Prof. Sergio Mutto Accordi

Dottorando : Genny Fanchin

DATA CONSEGNA TESI

31 gennaio 2008

Dichiarazione

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

Genny Fanchin

31.01.2008

Una copia della tesi sarà disponibile presso <http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

Indice

Indice	3
Riassunto	5
Summary	7
Introduzione	9
1. Il deperimento delle querce	9
1.1 Diffusione.....	10
1.2 Quadro sintomatologico	12
1.3 Possibili cause	15
2. Endofitismo	19
2.1 Colonizzazione e trasmissione endofitica.....	21
2.2 Interazioni ospite/endofita	22
2.3 Strategie di sopravvivenza ed andagonismo bilanciato	24
2.4 Funghi endofiti e deperimento delle querce	25
2.5 Ghiande ed organismi fungini	26
3 Scopo del lavoro	30
Materiali e metodi	31
1 Ghiande mature	31
1.1 La raccolta	31
1.2 Preparazione dei campioni.....	32
2 Semenzali	33
2.1 L'allevamento	33
2.2 Preparazione dei campioni.....	34
3. Ghiande in fase di sviluppo	35
4 Riconoscimento isolati ed analisi statistica	41
Risultati	43
1 Ghiande mature	43
2 Semenzali	74
3. Ghiande in sviluppo.....	87
Discussioni	109
Conclusioni	115

<i>Bibliografia</i>	119
Allegato A	131

Riassunto

Tra le problematiche fitopatologiche, una delle più complesse ed articolate è rappresentata dal deperimento del bosco, che riguarda in particolar modo il genere *Quercus* e particolarmente allarmante in Europa centrale e nelle regioni mediterranee, tra cui anche l'Italia.

Il fenomeno predisposto da vari fattori, sia intrinseci della pianta (corredo genetico, età), sia estrinseci e connessi alla stazione (condizioni edafiche e climatiche), è innescato da condizioni di stress di varia natura ed intensità (azione di parassiti primari, inquinanti, stress idrico). Il deperimento si manifesta attraverso una complessa sintomatologia ed eziologia, in cui intervengono nella fase avanzata del declino alcuni microrganismi fungini ad attitudine endofitica, in grado di colonizzare i tessuti vegetali per molto tempo senza provocare danni apparenti.

Il presente lavoro ha avuto quale obiettivo principale la descrizione della popolazione fungina presente su semi di *Q. robur* L, considerando tutti gli stadi di sviluppo delle ghiande nel tempo, l'influenza della microflora terricola e le differenze tra funghi seedborne interni ed esterni. Successivamente allo scopo di verificare se alcuni dei microrganismi fungini presenti sulle ghiande si trovassero anche sui tessuti vegetali, a partire dagli apici radicali fino alle foglie, sono stati allevati giovani semenzali in condizioni controllate.

La popolazione fungina presente sulle ghiande è risultata principalmente costituita da microrganismi ubiquitari, terricoli, saprofiti ed antagonisti quali *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Alternaria* spp. ed *Epicoccum* spp., mentre *Phomopsis quercina* è stato rilevato quasi esclusivamente su ghiande completamente sviluppate, *Fusicoccum quercus* è stato isolato dai tessuti interni ed esterni di ghiande mature e da fusto e radici dei giovani semenzali, e *Discula quercina* è stato rilevato frequentemente su semi in piena fase di sviluppo.

Non si è trovata correlazione tra una maggior presenza fungina su ghiande che avessero avuto un contatto con il terreno, per un periodo di tempo più o meno lungo, e i rispettivi semenzali allevati, mentre è apparsa importante la differenza quantitativa dell'inoculo fungino presente sul pericarpo esterno e nei cotiledoni interni. Infatti, la popolazione fungina isolata è risultata distribuita esclusivamente sul pericarpo esterno e,

maggiormente, sul residuo del carpello florale: ciò potrebbe rappresentare una via di collegamento tra l'interno e l'esterno del seme. Nei cotiledoni, invece, risulta relativamente bassa la probabilità di isolare organismi fungini.

E' auspicabile, quindi, prolungare le osservazioni iniziate, soprattutto per quanto riguarda la fase florale, quella di post- fecondazione e di sviluppo dell'ovario, indagando microscopicamente la localizzazione reale degli organismi fungini nei diversi tessuti che costituiscono il fiore e la ghianda verificando così se, per le specie fungine endofitiche, avvenga o meno una trasmissione verticale dell'inoculo da pianta madre al seme, e dal seme al nuovo semenzale.

Summary

Forest decline, particularly for *Quercus* genus, is a well known phenomenon, spread in Europe as well as in the all world and with a complex aetiology, that involve interactions between host plant and several abiotic and biotic causes (i.e. tree genetic characteristics, environmental and climatic changes)

Furthermore it has been hypothesized that some endophytic fungi can accelerate the decline of oaks, when trees are subjected to stress. In fact these fungi can become pathogenic, inflicting damage on trees, while often they produce no symptoms for most of their life cycle.

The aim of the present study is to provide information concerning the fungal population present in the *Q. robur* L. acorns, considering all their growth phases, the influence of other soil fungi and the presence of external and internal seed-borne fungi.

Subsequently on the seedlings bred from the acorns, the presence of the same fungal species has been investigated, from the apex of the roots to the leaves.

Penicillium spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Alternaria* spp. and *Epicoccum* spp. are the most numerous species detected, while *Phomopsis quercina* was found only in complete growth acorns, *Fusicoccum quercus* in internal and external tissues of ripened acorns and seedlings, and *Discula quercina* in growing acorns.

No correlation was found between the soil contact and the presence of some particular fungal species in or on the acorns, while a quantitative difference was detected about the fungal *inoculum* on the external pericarp and internal cotyledons.

In particular the fungal population was detected mainly on the flower carpel, less in the cotyledons.

All the data collected were the results of two years of studies and it is important to continue the works on the flower and the post fertilization stages and also on the ovary development, in order to comprehend if the *inoculum* can spread from the plant to the seed.

Introduzione

1. Il Deperimento delle Querce

Nelle regioni temperate e temperato-calde dell'emisfero boreale, il genere *Quercus* comprende almeno 350 specie di alberi e arbusti con foglie persistenti, semipersistenti e caduche (19, 24, 35). In Italia, le formazioni più diffuse sono rappresentate da boschi composti prevalentemente da specie caducifoglie di *Quercus* spp. (27% della superficie forestale totale), seguono i boschi a prevalenza di *Fagus sylvatica* L. (12%) e quelli di altre latifoglie mesofite e mesotermofite (12%) a prevalenza di specie dei generi *Acer*, *Carpinus*, *Ostrya* e *Fraxinus* (35). Data la sua ampia diffusione, in Italia la quercia rappresenta il secondo genere più importante sull'intera area boscata e, nel contesto europeo, la nostra nazione occupa un ruolo rilevante come produttore di questo legno (21, 30).

Nelle ultime 3 decadi, le cenosi quercine sono state interessate da una grave sindrome nota come "*Deperimento delle Querce*" ("Oak Decline" o "Oak Puzzle Disease), diffusa nell'intero areale italiano delle querce ed in quello di numerosi Paesi europei ed extraeuropei (8, 11, 27, 31, 32, 35, 38). Si tratta di una alterazione più o meno rapido dello stato fitosanitario delle piante in relazione soprattutto alle condizioni pedoclimatiche del bosco. Si manifesta con una sintomatologia complessa, più volte riportata da vari autori italiani e stranieri, a cui non corrisponde una causa eziologica ben definita ed univoca, discostandosi per questo motivo dalle malattie ad eziologia nota (8, 11, 27, 30, 31, 32, 38, 42). Fattori biotici ed abiotici alterano l'equilibrio tra piante, microrganismi ed ambiente provocando una diminuzione del vigore vegetativo degli individui vegetali. Conseguentemente, la relazione tra pianta e altri organismi, i quali solitamente possono non essere particolarmente virulenti, risulta sbilanciata in favore di questi ultimi, che trovandosi così in condizioni favorevoli, possono scatenare una serie di danni sull'ospite tanto da renderla più suscettibile a successivi attacchi, fino a condurla alla morte (11, 32).

1.1 Diffusione

Spesso in Europa il deperimento delle querce è risultato successivo con il verificarsi di condizioni climatiche sfavorevoli. Periodi siccitosi sono stati associati al deperimento già dai primi anni del 1900 negli Stati Uniti d'America e in molti paesi europei come Francia e Germania. Quando in Francia nel 1895 morirono migliaia di querce, molti autori riportarono che la causa fosse attribuibile alla siccità del 1893. Ulteriori episodi si verificarono in Germania nel 1911 e tra il 1915 e 1917, ancora una volta considerati una conseguenza di periodi di stress idrico. Altri casi di deperimento si evidenziarono in Francia nel 1920-21, imputati, in quel periodo, a patogeni fungini e primavere fredde. Anche la diffusa mortalità delle querce in ex Unione Sovietica nel 1941-44 è stata messa in relazione con le siccità del 1936, 1938 e 1939, correlata ad inverni severi e ad accentuate variazioni termiche in primavera ed in autunno. Successivamente, anche la Romania fu interessata dal fenomeno nel 1946-47, ritenuto ancora una volta legato alla scarsità d'acqua. Negli ultimi decenni, tuttavia, il deperimento delle querce è divenuto meno episodico e più esteso su scala continentale. La forte mortalità osservata nel periodo 1964-80 in ex Unione Sovietica si diffuse tra il 1982 e il 1997 in Europa centrale e settentrionale su *Quercus robur* L. e *Q. petraea* (Matt.) Liebl. e nelle regioni mediterranee su *Q. robur*, *Q. cerris* L., *Q. frainetto* Ten., *Q. pubescens* Willd. e *Q. suber* L. Allo stesso modo, il deperimento delle querce si diffuse negli Stati Uniti a partire dai primi anni '70 e per tutti gli anni '80 e '90 (27, 30).

Nelle ultime due decadi, il fenomeno è divenuto ulteriormente più frequente e molto più diffuso e rappresenta un problema permanente su larga scala tanto da interessare ormai l'intera Europa (27, 37, 38), gli Stati Uniti (21, 37, 38) e gran parte delle regioni asiatiche (27). Attualmente la gravità del fenomeno risulta ugualmente allarmante in tutti i Paesi interessati e le condizioni peggiori sono state osservate nei querceti della Francia, della Germania, della Repubblica Ceca, del Portogallo, della Polonia e dell'Italia (20).

In Italia il deperimento delle querce è stato segnalato per la prima volta nel 1986 da Ragazzi *et al.* nel Parco Nazionale del Circeo (LT) (20, 37, 39). In seguito è stato descritto in molte regioni centro-settentrionali come riportato nella *Tab. 1* (20).

Oggi il fenomeno è diffuso l'areale quercino ed interessa tutte le specie presenti: *Q. cerris*, *Q. frainetto*, *Q. pubescens* e *Q. robur* (20, 21, 27, 35, 37, 46), oltre a *Q. ilex* L. e *Q. suber* (20, 21, 36).

L'ampia diffusione con cui si manifesta ha destato serie preoccupazioni a causa della sua continua ed ininterrotta progressione, caratterizzata, tuttavia, da differenti intensità in relazione alle diverse aree boschive (21). L'incidenza del fenomeno a livello nazionale può essere quantificata come segue (20, 22, 24):

- nel Nord Italia interessa principalmente *Q. robur* con incidenza del 30% circa;
- nel Centro Italia si hanno gradi di incidenza del 20% per *Q. cerris* e del 10% per *Q. pubescens*;
- nel Sud Italia presenta livelli di incidenza del 35-40%, 30% e 20-25% rispettivamente per *Q. cerris*, *Q. frainetto* e *Q. pubescens*.

Tabella 1 – Distribuzione delle prime osservazioni del deperimento delle querce in Italia.

REGIONE	LOCALITA'	SPECIE INTERESSATA	Bibliografia
Lazio	Parco Nazionale Circeo (LT)	Cerro, Farnetto, Roverella, Farnia	Ragazzi <i>et al.</i> , 1986
Lazio	Viterbo	Cerro	Vannini, 1987
Lazio, Molise, Puglia, Calabria, Basilicata	-	Cerro, Farnetto, Roverella, Farnia	Luisi <i>et al.</i> , 1988
Campania	-	Cerro, Roverella	Cellerino <i>et al.</i> , 1991
Lazio	Tolfa (Roma)	Cerro, Roverella	Motta <i>et al.</i> , 1991
Sicilia	Madonie	Cerro, Leccio, Roverella	Granata e Agosteo, 1991
Friuli Venezia Giulia	Muzzana del Turgnano (UD)	Farnia	Moricca e Ragazzi, 1991
Veneto	Cornuda (TV)	Farnia	Moricca e Ragazzi, 1991
Sicilia	-	Leccio	Grillo e Tirrò, 1992
Toscana	-	Leccio	Blaschke <i>et al.</i> , 1995
Toscana	-	Cerro	Tiberi e Ragazzi, 1998
Emilia Romagna	Mesola (FE)	Leccio	Montecchio <i>et al.</i> 2004
Sardegna	-	Sughera	Franceschini <i>et al.</i> 2000

1.2 Quadro sintomatologico

Il quadro sintomatologico generale caratterizzante il deperimento delle querce evidenzia un diffuso stato di sofferenza della pianta, un diradamento della chioma dovuto all'aumento del processo di abscissione dei rametti e della morte di gemme e branche nella parte alta della chioma, un ingiallimento fogliare precoce ed esteso accompagnato da microfillia, una copiosa produzione di rami epicormici sul fusto, un rallentamento nell'accrescimento legnoso accompagnato dalla presenza di cancri su rami e su fusto, con

fuoriuscita di essudazioni brune, presenza di necrosi longitudinali della corteccia e dei tessuti legnosi con marcato imbrunimento dei vasi xilematici, morte delle radici fini e danneggiamento delle radici di sostegno (27, 36, 37, 39). I vari sintomi non si verificano necessariamente in concomitanza e variano nel loro grado di espressione.

Alcuni studi sulle modalità di crescita di querce deperienti (85) sottolineano la necessità di differenziare almeno due tipi di processo del fenomeno, in base all'intensità, alla durata ed alla frequenza. In un primo caso si può verificare uno stress cronico, dovuto a ripetute defogliazione negli anni e frequenti condizioni siccitose, sfocianti in una diminuzione della crescita diametrale e in una costante riduzione delle riserve energetiche. Le piante perdono la capacità di recupero e non reagiscono positivamente ad eventuali miglioramenti ambientali (85). Questo andamento è stato osservato ad esempio, nel nord Italia su piante di *Q. pedunculata* di circa 40-50 anni che presentavano chiome marcatamente rade e "trasparenti" e mortalità dopo 2 o 3 stagioni vegetative (20).

Un secondo andamento del fenomeno è caratterizzato da piante indebolite da condizioni di stress relativamente intenso e protratto per breve tempo (85). In questi casi il deperimento presenta un andamento apoplettico del deperimento (21) con morte di giovani piante, di non più di 25 anni, nel corso di una sola stagione vegetativa. Il sintomo principale è l'abbondante produzione di rami epicormici su tutta la lunghezza del tronco portanti foglie che presentano dimensioni più ridotte – microfillia – rispetto alla normalità. Lungo il tronco e sulle branche si evidenziano fessurazioni corticali, lunghe circa 4-5 cm e profonde fino ad interessare il tessuto legnoso, da cui fuoriescono sostanze mucillagginose (20, 21, 22, 24).

Le piante adulte, più di 25 anni, raggiungono la morte in un periodo poco più lungo, circa 2 o 3 stagioni vegetative. In questi casi il primo sintomo è dato, ancora una volta, dalla presenza di rami epicormici sul tronco, più o meno fitti. L'emissione di essudati gelatinosi è molto copiosa e spesso avviene poco prima della morte della pianta. In prossimità delle zone di emissione il tessuto corticale risulta necrotizzato (20, 21, 22, 24).

Il quadro sintomatologico caratterizzante il fenomeno varia anche in relazione alla specie colpita (21, 24, 29).

Su *Q. cerris* si assiste ad un diradamento della vegetazione generalizzato o più localizzato sulla chioma, le foglie assumono una colorazione verde pallido, disseccano dal margine verso la parte centrale della lamina e permangono sui rami per un periodo più o meno

lungo. Il fusto e le branche reagiscono producendo rami epicormici caratterizzati da microfillia e presenza di evidenti fessurazioni longitudinali, di dimensioni irregolari. Su queste ultime si osserva la fuoriscita di una mucillagine bruno-scura colante dalla corteccia. Le sezioni trasversali e longitudinali del tronco sono caratterizzate da un imbrunimento del legno, maculiforme o più esteso ad interi settori del fusto, ad andamento basipeto, che della parte aerea si spinge fino alle grosse radici (21, 24, 29).

Q. pubescens presenta la chioma molto rada, trasparente, con una forte percentuale di rami disseccati. I primi sintomi si hanno con la caduta delle gemme all'inizio della stagione vegetativa. Come nel caso precedente quelle che permangono, germogliano e originano foglie pallide molto piccole che successivamente ingialliscono e disseccano, permanendo per lungo tempo sui rami, arcciate verso il basso. Sul fusto la produzione di rami epicormici è ridotta, mentre risulta elevata la presenza di fessurazioni longitudinali ma con limitata emissione di mucillagine (21, 24, 29, 37).

L'ipotesi del "sinergismo", inoltre, considera anche l'inquinamento come fattore importante di stress che, associato ad una diminuzione dell'approvvigionamento idrico e nutritivo nel terreno, ad avverse condizioni edafiche e/o selvicolturali e ad interventi successivi di parassiti secondari ed insetti (26, 42), determina, nella parte aerea della pianta, il disseccamento di gemme e rametti con scarso rendimento fotosintetizzante, da cui deriva una conseguente riduzione dell'apparato radicale (21, 29). In particolare condizioni, le limitate precipitazioni, unite alla bassa fertilità e alla ridotta ritenzione idrica del terreno ed all'instaurarsi di intensi fenomeni di competizione radicale per l'eccessiva densità del soprassuolo, inducono nelle piante stati di stress idrici e trofici intensi e prolungati. La carenza idrica comporta sicuramente molti effetti negativi nella pianta, tra i quali si possono elencare la diminuzione dell'espansione cellulare, la riduzione dell'attività fotosintetica, della respirazione e dell'assimilazione degli elementi nutritivi, un incremento dell'attività di alcuni enzimi idrolitici ed un calo della sintesi proteica, contemporanea ad un aumento della decomposizione di proteine e di amminoacidi (24, 27, 29).

E' possibile confermare che il quadro sintomatologico caratterizzante il deperimento delle querce in Italia si presenta assai articolato e vengono, quindi, di seguito riportati i principali sintomi del deperimento in riferimento alla specie colpita (*Tab. 2*):

Tabella 2 – Sintomi del deperimento nelle specie quercine italiane più diffuse (24).

<i>SINTOMO</i>	<i>Q. cerris</i>	<i>Q. frainetto</i>	<i>Q. pubescens</i>	<i>Q. robur</i>
Fogliazione ritardata	-	-	-	+
Clorosi fogliare	+	-	-	-
Microfillia	-	+	-	-
Caduta delle gemme	-	-	+	-
Chioma ridotta	+	+	+	+
Rami epicormici	++	++	+	++
Fessurazioni longitudinali	+	+	+	+
Emissione mucillaginosa	++	++	+	++
Necrosi del cambio	+	+	-	+
Necrosi dello xilema	+	++	-	++
Apoplessia delle branche	+	+	+	+
Apoplessia della chioma	++	++	+	++
Mortalità	++	++	+	++

1.3 Possibili cause

La principale caratteristica del fenomeno è dato dalla sua complessa eziologia, dovuta all'interazione di molteplici fattori in svariate combinazioni (24, 25, 30, 35, 42). Gli agenti coinvolti, di natura abiotica, biotica ed antropica, possono essere suddivisi in tre categorie (87):

1. **fattori predisponenti**, - che indeboliscono la pianta – costituiti da condizioni stazionali sfavorevoli, profondità e tessitura del terreno, età e densità del popolamento, competizioni radicali, anomalie meteoriche, abbandono o errata conduzione selvicolturale, pascolamento irrazionale;
2. **fattori scatenanti**, - che compromettono la vitalità della pianta – rappresentati da defogliazioni da insetti, salinità, basse temperature invernali, infezioni virali,

susseguirsi di annate siccitose, aumento della temperatura del terreno, cambiamenti nella microflora terricola;

3. **fattori concomitanti** – che causano irrimediabilmente la morte della pianta – includono molti dei fattori sopra citati, attività di insetti del legno e della corteccia, funghi patogeni e altri agenti di debolezza capaci di aggravare lo stato di salute di piante già fortemente debilitate (24, 29, 30, 33, 35, 39).

E' stato ipotizzato che l'aumento e la diffusione del fenomeno siano da imputare all'azione sinergica dei molti fattori coinvolti (20, 30, 42).

In Italia centro-meridionale, come in Europa, uno dei fattori scatenanti più considerati è verosimilmente il protrarsi di lunghi periodi di siccità (3, 8, 11, 20), risultanti da una crescente irregolarità nella distribuzione delle precipitazioni durante la stagione vegetativa, che intensificano il deperimento sia nelle foreste temperate di querce caducifoglie sia in quelle submediterranee (42).

Ritenendo lo stress idrico il principale fattore coinvolto nel deperimento delle querce, sono stati condotti numerosi studi sull'aspetto della fisiologia vegetale che hanno posto in relazione le risposte della pianta con gli stress idrici (8, 23, 27).

E' possibile, innanzitutto, associare le principali specie decidue di *Quercus* alla loro decrescente sensibilità a periodi siccitosi, dato che è stata accertata l'esistenza di una correlazione fra incidenza e grado di tolleranza alla siccità, ponendo al primo posto *Q. rubra*, seguita da *Q. robur* e *Q. petraea*, ed infine *Q. pubescens* (23, 24, 31).

Gli adattamenti fisiologici alla siccità includono un aggiustamento osmotico, forse dovuto ad una variazione della composizione degli zuccheri e un controllo della conduttanza osmotica, del potenziale idrico fogliare e della fotosintesi (23).

Ad esempio, *Q. pubescens*, riuscendo a mantenere potenziali idrici minimo e di base alti (meno negativi) e punti di perdita di turgore cellulare bassi (più negativi), denota la sua maggiore resistenza a periodi di scarsa disponibilità di acqua nel terreno (24, 29). I meccanismi xerofitici di questa specie derivano dalla possibilità di conservare acqua accumulata nei tessuti mediante la chiusura più o meno prolungata degli stomi, dalla presenza di particolari strati di rivestimento e protezione sulle foglie (cere e peli stellati),

dalla buona capacità esplorativa delle radici e dalla capacità di abbassare il potenziale osmotico seguito all'aumento della concentrazione in soluti dei succhi cellulari (29).

Tutti questi aspetti fisiologici riferiti a *Q. pubescens* confermano che la scarsa suscettibilità al deperimento che la caratterizza comprova l'esistenza di una stretta relazione tra condizioni di stress idrico e incidenza del declino (11, 29).

Tra i fattori che successivamente contribuiscono all'aumento dello stato di sofferenza della pianta già indebolita si ha l'azione di insetti defogliatori, batteri, virus e funghi (20, 21, 30).

Vari studi hanno evidenziato che la defogliazione da parte di larve di insetti fillofagi gioca un ruolo fondamentale nella comparsa del declino delle querce. Diversi episodi di declino in Germania avvenuti tra gli anni 1909-47 e 1987-96 sono stati preceduti da defogliazioni da insetti. In querceti della Germania settentrionale, intense defogliazioni nel 1996 hanno comportato una crescente mortalità negli anni successivi. Le specie maggiormente coinvolte sono *Operophtera brumata*, *Tortrix viridana* e, nelle regioni più calde, *Lymantria dispar* (88). Come risultato della defogliazione, il contenuto di amido immagazzinato nelle radici diminuisce sensibilmente o si esaurisce, e la sopravvivenza degli alberi dipende molto da queste riserve. Questa pesante riduzione di carboidrati è presumibilmente responsabile della forte diminuzione o della completa assenza di formazione di legno estivo riscontrabile dopo attacchi in anni consecutivi. Poiché esiste una correlazione tra la concentrazione di carboidrati e la resistenza al gelo dei tessuti vegetali, intense defogliazioni possono portare anche ad una riduzione della resistenza al freddo a seguito della diminuzione delle riserve di zuccheri. Dettagliate analisi in popolamenti di quercia in Germania settentrionale hanno dimostrato che il coleottero silofago *Agrius biguttatus* Fabr. è il più importante tra gli insetti dannosi secondari, e attacca querce indebolite da altri fattori biotici e abiotici (88).

Le querce, sane o deperienti, ospitano svariati microrganismi fungini nel tronco, nei rametti dell'anno, nelle gemme, nelle foglie e nell'apparato radicale, anche in diversi momenti della stagione vegetativa (24, 26, 36). Alcune specie fungine presentano attitudine saprofitaria, altre hanno una forte capacità parassitaria, in grado di limitare o impedire il normale accrescimento della pianta e di accentuarne il deperimento (25, 27, 28, 36).

Cystodendron dryophilum (Pass.) Bubak, *Apiognomonina quercina* (Kleb.) Höhn., *Lembosia quercina* (Ell. et Martin) Tracy et Earle e *Septogloeum dryophilum* Marras sono spesso patogeni fogliari delle querce. Il loro attacco, in condizioni favorevoli, può avvenire durante tutto il corso della stagione vegetativa, generando così una progressiva, e a volte totale, defogliazione. Ne consegue una riduzione fotosintetica, un alterato tasso respiratorio e una generale condizione di stress fisiologico (25).

Tra i funghi che colonizzano i tessuti legnosi si possono citare *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. e *Taphrina kruchii* (Vuill.) Sacc., con incidenza sporadica e limitata, *Cylindrocarpon candidum* (Link.) Wollen., *Diplodia mutila* (Fr.) Mont., *Fusarium eumartii* Carp., *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Ces., *Phoma cavae* Schuelzer e *Phomopsis quercina* (Sacc) Höhn., i quali giocano un importante ruolo nel deperimento (22, 25), in particolare *D. mutila* e *H. mediterraneum*, frequentemente presenti nella regione mediterranea e in tutte le maggiori specie quercine (3, 25, 32). Molti sono esclusivamente cromogeni, in grado di modificare solamente la colorazione del tessuto senza, tuttavia, alterarne la consistenza. Essi sono principalmente rappresentati da *Ceratocystis coerulescens* (Munch) Bakshi e *Ophiostoma piceae* (Munch), con gli anamorfì *Chalara* spp., *Graphium* spp., *Pesotum* spp. e *Sporothrix* spp., la cui presenza è indicativa di stress idrico (3, 22, 25). Molti altri sono ligninolitici, principalmente *Basidiomiceti*, i più frequenti *Cerrena unicolor* (Bull.) Murr., *Schizophyllum commune* Fr. e molte specie di *Phellinus* spp., *Stereum* spp. e *Trametes* spp. Il danno provocato da questi microrganismi è generalmente limitato alla perdita di stabilità meccanica degli organi colonizzati (3, 22, 25). La classe *Basidiomycota* è bene rappresentata tra i patogeni dell'apparato radicale. Gli appartenenti a questa classe possono sopravvivere anche come saprofiti nei residui organici del terreno. Le specie più comuni appartengono ai generi *Armillaria*, *Collybia*, *Ganoderma*, *Grifola* (22, 25).

Esiste, poi, una ulteriore categoria di funghi, definiti tipicamente “patogeni di debolezza”, caratterizzati dalla mancanza di una attività patogena primaria ma capaci di un ruolo importante nel deperimento in determinate condizioni (25, 26, 36). Alcuni esempi sono dati da *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze, *Ceratocystis* sp., *Discula quercina*, *Diplodia* sp., *Fusarium* sp., *Graphium* sp., *Phomopsis quercina* (8, 34, 35, 46, 47, 48) e

Ophiostoma sp. (26), che possono rimanere a lungo nei tessuti ospiti asintomaticamente (3, 26, 41).

Ad altre specie appartenenti ai generi *Acremonium*, *Cytospora*, *Epicoccum*, *Fusarium* e *Trichoderma* (35), *Gliocladium*, *Cladosporium* (8) sono attribuite possibili proprietà antagonistiche nei confronti dei parassiti di debolezza (8, 35, 46, 65).

Infine, una categoria particolare e molto rilevante nella sindrome è costituita da funghi caratterizzati da attitudine “*endofitica*”, presenti in molte piante erbacee ed arboree con una recettività agli endofiti variabile (2, 11).

2. Endofitismo

Le piante di popolamenti naturali di *Quercus* spp. convivono con una moltitudine di microrganismi che possono svolgere nell’ecosistema forestale diverse funzioni e dare luogo a situazioni di convivenza durature nel tempo (5, 12, 33, 43). Tra questi microrganismi si hanno anche gli *endofiti* [dal greco “endon”, dentro e “phyton”, pianta (9, 7, 14)]: capaci di costituire comunità specifiche per ospiti ed ambiente (33, 43), possono, a loro volta, avere un ruolo ecologico nel deperimento o assumere, in fasi determinate della loro vita nella pianta, comportamento tale da accentuare stadi di deperimento in atto (5, 43).

L’endofitismo rappresenta un caso di endobiosi, nel quale l’endobionte dimora e si sviluppa all’interno dei tessuti di una pianta vivente (2, 7). Una categoria di endofiti è rappresentata dai microrganismi fungini ed è stato stimato che possano costituire più di un milione di differenti specie di cui solo una piccola quota, circa il 5% è stata identificata (50).

Si nota che alcuni organismi fungini sono tipicamente epifiti, altri endofiti e altri ancora sono inizialmente epifiti e diventano endofiti solo a stadi avanzati (7, 50). ciò accade poiché l’endofitismo, per certi microrganismi, è probabilmente una strategia che può essere adottata per sopravvivere ad avverse condizioni di vita, tuttavia per altri è un modo di vita predeterminato (7). Risulta evidentemente necessario chiarire il significato del termine.

È possibile affermare che un endofita è, letteralmente, un organismo che vive all’interno di una pianta, in accordo con la prima definizione riportata in letteratura data da De Bary nel

1866 (7). Il significato originario del termine si riferisce esclusivamente alla localizzazione dell'organismo, senza riferimento alla natura dell'endobionte o al tipo di rapporto con l'ospite vegetale (2). In questa ottica l'uso di questo vocabolo è molto ampio e lo spettro di potenziali ospiti ed "ospitati" include piante, batteri, funghi, alghe e insetti (9, 14, 50).

Lo stesso termine è stato più comunemente utilizzato in senso restrittivo per indicare la colonizzazione o l'infezione asintomatica dei tessuti, in altre parole, una interazione microrganismo/pianta che non provoca sintomi di malattia (2, 12, 14, 15, 26, 45, 49). Venivano considerati, così, anche i patogeni latenti ed i patogeni che presentano fasi endofitiche più o meno lunghe, senza specificare né l'effetto sull'ospite, né lo sviluppo successivo (2).

Recentemente, alcuni autori hanno individuato come caratteri distintivi dell'endofitismo la colonizzazione di tessuti interni di piante vive per tutto o parte del ciclo biologico dell'endofita e l'infezione asintomatica (2, 9, 26, 49, 65). Così inteso, si indica non solo l'habitat, ma anche il modo di vita e la strategia di infezione dell'endofita, senza riferimento alla tassonomia o al ciclo infettivo (2).

Nel tempo, quindi, molte sono state le definizioni formulate: Carroll 1991, Wennström 1994, Carroll 1995, Wilson 1995, Chanway 1996, Stone e White 1997, Stone *et al.* 2000. Tutte possono essere riassunte affermando che un endofita è un organismo che vive all'interno del tessuto vegetale in un certo momento del suo ciclo biologico, con il quale instaura relazioni neutrali o mutualistiche e al quale non causa alcun sintomo di malattia (3, 7, 10, 12, 14, 15, 26, 34, 44, 45, 50, 52, 65, 66) se non nel momento in cui la pianta ospite è soggetta a condizioni di stress.

L'aspetto importante che deve essere sottolineato è il tipo di rapporto complessivo che viene ad instaurarsi tra i due soggetti in gioco. Inoltre, il termine descrive uno status transitorio, poiché la stabilità o la variabilità dell'interazione asintomatica dipende da numerosi fattori (14).

Un fungo patogeno rimane tale anche se presenta una lunga fase endofitica asintomatica. L'endofita, inteso in senso stretto, è tale anche se, dopo essersi insediato in una nicchia limitata, ne invade estesamente i tessuti interni e ne provoca il deterioramento (2, 3, 7, 10, 41, 43). A livello molecolare e biochimico il fungo endofita può scatenare realmente delle alterazioni negative, ma tanto deboli da non produrre sintomi visibili a carico della pianta o

dell'organo (7, 65), bloccandosi così in una fase latente, in un intervallo di tempo tra il momento dell'infezione e il momento dell'apparizione del sintomo (65). Si ha prova evidente della sua presenza solamente quando l'ospite subisce uno stress o si approssima alla senescenza, quando cioè si innescano appropriati stimoli ecologici o fisiologici (2, 3, 7, 10, 41, 43, 65, 66). In particolari circostanze, tuttavia, alcuni endofiti possono diventare parassiti e contribuire ad aggravare lo stato di deperimento del suo ospite (3, 10, 33, 34, 43).

2.1 Colonizzazione e trasmissione endofitica

Le strategie di colonizzazione endofitica asintomatica possono essere intracellulari e limitate a singole cellule, intercellulari e localizzate (come nelle foglie), sistemiche inter- ed intracellulari (come nei germogli). Possono essere limitate agli apparati radicali, inter- o intracellulari, o sistemiche all'interno della radice (14, 44).

Le fasi iniziali dell'infezione endofitica sono simili a quelli di altri patogeni: riconoscimento dell'ospite da parte del fungo, germinazione delle spore, penetrazione dell'epidermide e colonizzazione del tessuto vegetale (10, 44, 66). Il fungo deve sempre superare meccanismi difensivi della pianta ospite indotti o preformati, come ad esempio strati cerosi idrorepellenti sulla cuticola fogliare, peli, cellulose e pectine. Dopo la germinazione, molti endofiti possono produrre una miscela di esoenzimi che alterano, ad esempio, la struttura della cuticola e la parete delle cellule epidermiche (10, 44). È il caso di alcune specie appartenenti ai generi *Phomopsis*, *Alternaria*, *Fusarium* o *Phialophora*, capaci di sintetizzare proteasi, lipasi, cellulasi, pectiniasi, amilasi e fenolossidasi, necessari per facilitare la penetrazione diretta dell'ifa e la colonizzazione dell'organo (10, 44). Alcune specie fungine, procedono direttamente alla rottura meccanica della cuticola e alla penetrazione diretta grazie alla formazioni di appressori o austori (10, 14, 44).

I funghi endofiti vengono distinti in due gruppi ecologici in relazione alle loro strategie di sopravvivenza:

- a. endofiti di piante erbacee, detti “*balansiacei*” (14) o “*clavicipitacei*” (10, 52, 66);

b. taxa endofitici di piante arboree “*non-balansiacei*” (14) o “*non-clavicipitacei*” (10, 66).

Al primo gruppo appartengono funghi clavicipitacei membri della tribù *Balansiae* (*Ascomycotina*) (52), che si sviluppano nella pianta ospite esclusivamente erbacea, sistemicamente e intercellularmente all'interno degli organi vegetali (eccetto nelle radici), risultando così in una trasmissione verticale dell'endofita attraverso il seme. Sono in grado di produrre metaboliti secondari e, data la capacità di colonizzare gli spazi intercellulari, dipendono dai nutrienti presenti nell'apoplasto per il loro accrescimento (10, 14, 44, 66).

Il secondo gruppo riunisce molti funghi che appartengono generalmente alla divisione degli Ascomycota ma possono includere specie appartenenti agli *Oomycetes*, *Deuteromycota* e *Basidiomycota* (14, 52) e vengono generalmente isolati da tutti gli organi vegetali di una pianta arborea. La strategia di colonizzazione può essere inter- o intracellulare (14), generalmente altamente localizzata in foglie, peduncoli, rami o corteccia (52). Tuttavia, l'infezione localizzata può divenire più diffusa nel caso di condizioni particolari, ad esempio di senescenza dell'organo vegetale (52).

Nel caso di piante erbacee, è noto che la plumula che emerge dal seme può essere interessata da funghi endofiti già presenti nei tessuti del seme prima della germinazione, o provenire da tessuti infetti appartenenti alla pianta madre (7, 45).

Nel caso di piante arboree, si ha certezza dell'esistenza di trasmissione fungina di tipo orizzontale, esterna cioè ai tessuti ospiti, attraverso spore (7, 45, 52) trasportate per via aerea, idrocora o zoocora (7), largamente influenzata dalle condizioni climatiche in relazione alla germinazione delle spore e alla risultante frequenza d'infezione delle piante ospiti (45). Al contrario, non si ha ad oggi evidenza e prova di trasmissione verticale di endofiti sistemici attraverso semi di piante già colonizzate (7, 45, 52, 66).

2.2 Interazioni ospite/endofita

Nella stretta relazione endofitica che si instaura, la pianta favorisce l'endofita fornendo approvvigionamento nutrizionale e protezione sia dall'ambiente esterno, per esempio dal disseccamento, dalle radiazioni nocive, dagli stress idrici e osmotici, sia dalla

competizione con altri microrganismi, essendo protetto da nemici naturali quali acari, insetti micofagi o funghi iperparassiti, nonché dalle loro azioni antibiotiche (2, 7, 9, 14).

Gli endofiti, d'altro canto, concorrono indirettamente al mantenimento dello stato fitosanitario della pianta attraverso la produzione di metaboliti secondari (7, 9, 14, 15, 44, 45, 50, 65). Alcuni, infatti, sono in grado di produrre fitormoni che promuovono la crescita della pianta mentre altri sintetizzano e accumulano metaboliti tossici, insetticidi biologici e varie micotossine (7, 9, 14, 15, 44, 45, 49, 50, 52, 65). In particolare, alcuni endofiti di piante erbacee, possono migliorare le capacità competitive dell'ospite aumentandone il successo di germinazione, la resistenza a stress idrico e a predatori di semi (49, 50, 52, 65). In casi particolari, un endofita può essere in grado di mediare indirettamente le risposte di resistenza indotta nella pianta (7, 14, 49).

Tuttavia, i funghi endofiti posseggono anche strumenti di aggressione, come enzimi degradatori di componenti vegetali, dai più semplici ai più complessi grazie ai quali innescano i meccanismi necessari alla degradazione del substrato di cui si nutrono (2, 15, 44). I prodotti del loro metabolismo secondario si accumulano nei tessuti della pianta ospite. Se tali metaboliti sono solubili, si diffondono nell'apoplasto, permeano i parenchimi o vengono traslocati attraverso il sistema conduttore e causano inevitabili modificazioni dei normali processi fisiologici della pianta (2). Nel caso di sostanze regolatrici della crescita, ad esempio, possono interferire con l'accrescimento apicale, con la differenziazione delle gemme, con il controllo stomatico, l'abscissione di foglie e frutti, la maturazione e la senescenza (2). Alcuni metaboliti secondari endofitici possono essere applicati in medicina, nell'industria farmaceutica e in agricoltura (9). Ad esempio, *Acremonium* sp., isolato da *Taxus baccata*, produce un peptide, leucinostatina A, con proprietà antifungine attive contro *Pythium ultimum*, anticancerogene e fitotossiche; *Gliocladium* sp. produce una miscela di componenti volatili che inibiscono fortemente patogeni fungini come *Pythium ultimum* e *Verticillium dahliae* (9).

2.3 Strategie di sopravvivenza e antagonismo bilanciato

La strategia di sopravvivenza dell'endobionte risulta estremamente diversificata, variando dal saprofitismo facoltativo al parassitismo, al mutualismo (12, 14, 15, 26, 44, 45, 49, 50, 52, 65). Anche i partners endofitici e le loro relazioni sono varie. Esistono, infatti, patogeni endofiti di alghe, parassiti endofiti di piante o mutualisti endofiti di batteri. Allo stesso modo si hanno diverse interazioni endofitiche di funghi con le piante ospiti: alcuni possono essere patogeni in piante non ospiti, patogeni latenti, saprofiti non visibili o patogeni virulenti in fase di quiescenza. Inoltre, possono essere specifici di organi epigei della pianta, mutualistici o commensali (12, 14, 26, 45, 49, 52). Altri sono funghi esclusivi di piante erbacee che vengono considerati mutualisti obbligati (52).

Nei casi estremi, un fungo può essere un opportunista meramente accidentale, non realmente capace di occupare a lungo termine un particolare tessuto vegetale (14).

In particolare, l'endofitismo rappresenta una vera e propria strategia biologica volta al superamento di condizioni non favorevoli allo sviluppo patogenico quando gli ospiti si trovano in buono stato fisiologico (41, 44), risultando in una sorta di "*antagonismo bilanciato*" fra ospite ed endofita (14, 15, 44).

Il patogeno fungino è un organismo caratterizzato da un comportamento nei confronti dell'ospite distinto da quello dell'endofita, anche se il primo può attraversare uno stadio endofitico, e un endofita può diventare patogeno (7, 14, 65). Tuttavia, molte sono le caratteristiche comuni alle due strategie di sopravvivenza: entrambi vivono occupando gli spazi inter- o intracellulari dei tessuti vegetali, sintetizzano enzimi degradatori, necessari per l'infezione dell'ospite e per digerire le sostanze nutritive, tossine ed ormoni e possono penetrare direttamente nella pianta (7, 14). Ciò che li distingue nettamente è l'evidenza che un patogeno è dotato di fattori di virulenza e di patogenicità, a differenza di un endofita il quale possiede fattori di patogenicità ma non di virulenza (7, 15, 65).

La reazione di difesa della pianta ospite viene attivata nei confronti di entrambi i tipi fungini, con produzione di metaboliti precostituiti e indotti, con risposte meccaniche lente o rapide che il patogeno è in grado di disattivare o superare come l'endofita non può fare (7, 14, 15, 65). Più specificamente, una interazione sbilanciata fra patogeno ed ospite porta a malattia, una interazione tra endofita e ospite produce antagonismo che non porta a malattia

(2, 7, 10, 15, 44, 65). Nel secondo caso, quindi, è impedita la patogenicità e, quanto più a lungo la virulenza e le reazioni difensive della pianta sono in equilibrio tra loro, tanto minore è la possibilità che si verifichi la malattia (2, 14, 15).

Tutte le situazioni descritte sono interazioni che dipendono dallo stato vegetazionale dell'ospite e dallo stato momentaneo dell'organismo endofita. Tutto ciò, unito sia a fattori biotici ed abiotici che agiscono dall'esterno, sia alla sensibilità a ciascun fattore, origina condizioni di antagonismo instabile, di cui non si conoscono ancora i meccanismi di regolazione (2, 12, 14, 49).

2.4 Funghi endofiti e deperimento delle querce

In diverse aree geografiche, climatiche e vegetazionali italiane, sono stati condotti svariati studi finalizzati a definire la composizione della popolazione endofitica fungina di querce sane e deperienti. Si è posta attenzione, inoltre, su eventuali associazioni, sulla specificità all'organo vegetale, sul rapporto con le diverse fasi fenologiche dell'ospite e sul ruolo che alcuni taxa fungini possono avere nell'evoluzione del deperimento (5). Tuttavia, molti aspetti del fenomeno rimangono da chiarire, in particolare la complessità e la variabilità geografica dei patogeni di debolezza determinanti nella fase finale del deperimento delle piante e la loro capacità di vivere nei tessuti allo stato endofitico (46). Per quanto nella maggior parte dei casi le comunità endofitiche fungine non abbiano un effetto apparente sulla fisiologia di un ospite sano, come già detto, avviene che le relazioni mutino in senso negativo qualora la pianta sia sottoposta a stress (2, 3, 6, 8, 34). Lo stress idrico determina mutamenti biofisici e biochimici che possono innescare il passaggio di patogeni latenti da una fase endofitica ad una di attiva patogenicità, con comparsa di sintomi e aggravamento del deperimento stesso (6, 8, 11).

Tra gli endofiti fungini alcuni sono risultati altamente specializzati verso il genere *Quercus*, come nel caso di *Apiognomonium quercina* (Kleb.) Höhn. [con la forma anamorfa *Discula quercina* (West.) Arx], *Colpoma quercinum* (Pers. ex St. Am) Wallr., *Diplodia mutila* Fr. apud Mont., *Biscogniauxia mediterranea*, *Phomopsis quercina* (Sacc.) Höhn. Questi

microrganismi esprimono patogenicità comportando danni a carico di foglie o di rametti di diversa età (5, 7, 8, 46, 47).

Sieber (2007) ed altri autori, hanno riscontrato che alcuni funghi endofiti sono dominanti in roverella e farnia e distribuiti su diversi organi, ad esempio:

- in *Q. pubescens*, *Cladosporium cladosporioides* e *Ulocladium* sp. predominano nelle lamine fogliari, mentre *Phomopsis quercina* e *Apiognomonina quercina* in rametti;
- in *Q. robur*, *Dicarpella dryina*, *Ulocladium* sp., *Apiognomonina quercina*, *Trichoderma viride* vengono isolati frequentemente dalle foglie; *Amphiportha leiphaemia* (Fr.) Butin., *Phomopsis quercina*, *Colpoma quercinum*, *T. viride*, *Nodulisporium* sp., *Eutypella* sp., *Dicarpella dryina* sono frequenti in rametti (5, 8, 10).

La composizione endofitica e la frequenza delle singole specie dipendono da fattori stagionali, dagli organi e dai tessuti vegetali ospiti (8, 10, 14, 26) e la composizione specifica degli endofiti fungini comprende tipicamente poche specie dominanti e numerose specie sporadiche (12).

2.5 Ghiande ed organismi fungini

Il contenuto idrico della ghianda, l'inoculo fungino iniziale sul e nel seme ed i metodi di conservazione influenzano enormemente la presenza e la diffusione dei microrganismi fungini (55).

I semi ortodossi, che oltre ai bassi contenuti idrici tollerano molto bene anche le basse temperature, possono essere conservati con successo per lunghi periodi di tempo (55). Al contrario, le sostenute temperature a cui devono essere conservati i semi recalcitranti e le loro caratteristiche idriche, favoriscono l'insediamento di molte specie fungine e, proprio per questo, risultano velocemente degradabili (17, 55, 73). Le ghiande di farnia perdono più del 70% della loro capacità germinativa proprio a causa di infezioni fungine (55).

L'importanza di questo aspetto di rende evidente considerando che il buono stato fitosanitario ed il vigore vegetativo dei semenzali con il loro successivo accrescimento, dipendono dalla qualità del seme (55).

Le specie fungine associate ai semi variano in relazione alle diverse piante ospiti, alle differenti regioni geografiche e climatiche e negli anni (55). Molti sono funghi filamentosi e si sviluppano solo sulla superficie del seme, altri provocano anche infezioni interne, anche perché in grado di germinare e penetrare nei cotiledoni fino a raggiungere l'embrione (55). Alcuni organismi fungini causano il decadimento o riducono la capacità germinativa del seme, altri ancora possono indurre effetti negativi su semi già germinati o sui nuovi semenzali, altre specie sono presenti ma non causano alcuna alterazione (55). Tuttavia, la diminuzione della capacità germinativa del seme, il decadimento e la perdita di vitalità durante la conservazione e le malattie dei semenzali, rappresentano certamente i maggiori problemi provocati da funghi patogeni (55).

Quando si studiano le relazioni tra seme e microrganismo associato, generalmente si parla di organismi *seedborne*. In particolare, un "patogeno *seedborne*" è un termine usato per indicare ogni agente di infezione, portato sul e/o nel seme, potenzialmente causa di malattia di un semenzale o di una pianta (70, 73). Questo termine include tutti i batteri patogeni, i funghi, i nematodi ed altri microrganismi che possono essere isolati da semi (70, 73). "Micoflora *seedborne*" indica l'associazione tra batteri, funghi o nematodi e i semi, che possono essere o non essere fonte di malattia per il seme o la pianta, inclusa la micoflora sia patogena che saprofita (70, 73).

Un patogeno può essere ristretto ad una specifica area del seme o essere presente in più zone dello stesso seme (70). La posizione dell'inoculo del microrganismo all'interno del seme dipende dal tipo di patogeno, dal modo e dal tempo di infezione, dalle condizioni ambientali al momento dell'infezione, dall'ospite e da vari altri fattori (70). In relazione alla loro localizzazione nel seme, i funghi *seedborne* vengono distinti in esterni ed interni (55, 70).

Nel primo gruppo rientrano alcuni generi fungini che generalmente non sono ospite-specifici e che hanno una importanza secondaria nella perdita di germinabilità (55). Ne sono un esempio *Botryospheria* spp., *Botrytis* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Phialophora* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp. (55).

Tra i più conosciuti seedborne interni si hanno specie di *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botrytis* spp., *Botryodiplodia* spp., *Cephalosporium* spp., *Fusarium* spp., *Phoma* spp., *Schizophyllum* spp. e *Sirococcus* spp. (55, 73). A differenza dei precedenti, questi ultimi possono causare un deterioramento nella qualità del seme e mortalità dei semenzali in pre- e post-emergenza (55, 73).

I sintomi di malattia causati dai seedborne sono generalmente riconducibili all'avvizzimento dei semenzali in pre- e post-emergenza (55, 60, 73) diffusi specialmente nei vivai forestali (60), per i quali si osserva una emergenza molto ridotta ed un decadimento della radichetta appena emersa dal seme (55, 73), tuttavia essi riescono raramente a distruggere completamente il seme (73). *Fusarium* spp. è, per molti semi, uno dei principali generi patogeni presenti nei vivai forestali, causa di damping-off. Su semenzali di farnia *F. solani* provoca clorosi su foglie e fusticino e cancri annuali su tronco e branche (60).

I funghi tellurici, o *soilborne*, frequentemente isolabili dal seme, possono essere anche transienti o contaminanti casuali (68). Spesso *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* spp., *Epicoccum nigrum* e *Fusarium* spp., frequenti sulle foglie, sono presenti anche nei semi, o nei frutti (68, 73). Questo tipo di micoflora può provocare infezione diretta del seme maturo (73). In particolare, *E. nigrum* e *F. solani* sono, tipicamente, contaminanti della superficie della ghianda. Se certi funghi sono specifici del pericarpo, in opposizione ai tessuti embrionali e cotiledonali, si può ipotizzare che possa avvenire una infezione attraverso le fessurazioni naturali comunemente presenti sul pericarpo (61). Altri seedborne fungini, invece, possono infettare l'embrione di specie agrarie, come nel caso di *Alternaria* spp., *Ascochyta fabae*, *Botrytis* spp., *Curvularia lunata*, *Didymella bryoniae*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Macrophomina* spp., *Phoma* spp. e *Phomopsis* spp. (70).

Un concetto importante è quello di “seed-transmitted”, cioè l'infezione dei semenzali da parte di un inoculo seedborne (70, 73). La trasmissione della malattia dal seme al semenzale, il processo di infezione del seme e le relazioni che si instaurano sono influenzati da numerosi fattori (67, 70). Fra i molti si possono elencare le condizioni ambientali durante lo sviluppo del seme e della giovane pianta – temperature, velocità del vento e

piogge (70) – l'ospite ed il suo genotipo, il patogeno ed il suo genotipo, il tipo di inoculo, la qualità del seme, i vettori, gli stati di sviluppo della pianta e le interazioni di tutti nel tempo (67, 70).

L'infezione può avvenire anche sistemicamente, sia attraverso il sistema vascolare o le connessioni plasmodesmiche o direttamente attraverso il fiore o il peduncolo, oppure ci può essere penetrazione della parete dell'ovario, o attraverso aperture occasionali (70, 73). Alcuni funghi vascolari che infettano l'embrione passano sistemicamente dalla pianta madre infetta ai semi, come nel caso di *F. verticillioides* e *F. oxysporum* nel cotone, *Verticillium dahliae* nello spinacio; *Acremonium strictum* colonizza il sorgo migrando dalle radici allo stelo e dalla pianta madre alla progenie attraverso i semi (70).

Certi patogeni fungini seguono la via del polline. Le spore del fungo alloggiano sullo stimma e germinano accrescendosi all'interno dello stilo, infetta l'ovario e si stabilisce nei semi (73).

3. Scopo del lavoro

In passati studi è stato dimostrato come risulti abbastanza comune isolare endofiti da piante erbacee, trasmessi sistemicamente attraverso i tessuti vegetali (12, 49). Inoltre alcuni microrganismi endofiti non sistemici e presenti in piante arboree, vengono trasmessi esclusivamente da una pianta ad un'altra diversa, quindi orizzontalmente, attraverso la sola diffusione delle loro spore nell'ambiente (12).

Lo scopo primario del presente lavoro è di monitorare le presenze fungine nel continuum del ciclo biologico di una pianta e, in questo specifico contesto, di farnia. Ci si propone di osservare i momenti più delicati ed importanti del ciclo: quello della formazione dei semi, del loro sviluppo, della maturazione e dell'affermazione dei semenzali. L'attenzione viene concentrata, quindi, sulle ghiande di farnia durante e dopo lo stadio di maturazione e su semenzali da queste ottenuti, in relazione alle specie fungine presenti. Per raggiungere l'obiettivo primario, si propone di indagare la presenza di una micoflora "seme-specifica" in ghiande che hanno raggiunto la maturità e, successivamente, di monitorare la popolazione fungina presente su semenzali originati da un uguale campione di ghiande. In virtù di tutti i fattori coinvolti nella trasmissione e nella diffusione dell'inoculo fungino, per poter indagare i semenzali risulta necessario trovare il metodo per ridurre l'influenza dei fattori abiotici e soprattutto di eventuali e frequenti contaminazioni. Infine, si è posta l'attenzione su ghiande prima della loro completa maturazione, nel tentativo di monitorare la micoflora presente, a partire dal momento in cui l'ovulo fecondato inizia a distendere e differenziare i tessuti.

L'obiettivo finale è riassumibile in un monitoraggio accurato della fase di riproduzione della farnia nei riguardi dei funghi ad essa associati e nel tentativo di verificare l'esistenza di eventuali legami tra le specie fungine presenti nel tempo, focalizzando eventualmente su funghi endofiti coinvolti nel deperimento delle querce.

Materiali e metodi

La sperimentazione è stata condotta nel periodo 2005-2007 presso i laboratori della Sezione di Patologia Vegetale, Dipartimento Territorio e Sistemi Agroforestali, (Facoltà di Agraria, Università Padova).

Sono state effettuate indagini su ghiande mature, ghiande in fase di sviluppo e semenzali di *Q. robur*, finalizzate all'isolamento di microrganismi fungini seedborne che costituiscono la micoflora di diversi tessuti vegetali.

La ricerca è stata suddivisa nelle seguenti fasi:

- isolamenti della popolazione fungina da cotiledoni e pericarpo di ghiande cadute per abscissione naturale a maturazione;
- isolamenti della micoflora seedborne in semi di farnia dal momento della fecondazione a maturazione quasi completa;
- isolamenti dei miceti presenti in semenzali di *Q. robur* di circa 3 mesi di età allevati in condizioni controllate;
- identificazione delle colonie fungine ottenute;
- analisi statistica dei risultati rilevati.

1. Ghiande mature

1.1 La raccolta

Dopo aver definito i requisiti delle piante di *Q. robur* dalle quali effettuare i prelievi delle ghiande (abbondante produzione di semi; posizione periurbana; buono stato fitosanitario e vigore vegetativo; popolamento rado favorevole alla raccolta; zona non disturbata da animali predatori e dall'azione antropica) per due stagioni consecutive.

Sono state scelte due farnie di circa 80 anni di età, situate nel comune di Montecchio Precalcino (VI) (*Fig. 1*). Per ciascuna pianta è stata delineata la proiezione a terra della chioma e suddivisa in quarti. Solo due delle quattro aree sottostanti la chioma sono state

prese in considerazione: nella prima è stata allestita una rete con maglie di circa 1,5 cm di lato e una superficie di circa 25 mq, sollevata da terra per almeno un metro con l'ausilio di funi assicurate ad alberi limitrofi (*Fig. 2*); il secondo quarto è stato sgomberato con estrema accortezza dalla presenza di vecchie ghiande già cadute a terra e delimitato da picchetti, funi e cartelli di segnalazione.

La raccolta dei semi maturi è stata effettuata nell'intero mese di ottobre sfruttando la naturale abscissione dalla pianta madre e selezionando casualmente, per ciascuna delle quattro aree delimitate, 30 ghiande sane, intere, con normale colorazione e prive di rasure e fori di animali ed insetti secondo il seguente schema operativo:

- 30 ghiande dopo un giorno di permanenza a terra;
- 30 ghiande dopo un giorno di permanenza su rete;
- 30 ghiande dopo 6 giorni di permanenza a terra;
- 30 ghiande dopo 6 giorni di permanenza su rete;
- 30 ghiande dopo 12 giorni di permanenza a terra;
- 30 ghiande dopo 12 giorni di permanenza su rete;

per un totale di 360 ghiande, distribuite su due piante, tre periodi di permanenza e due tipologie di raccolta, e 12 tesi indagate.

1.2 Preparazione dei campioni

La fase preliminare comune a tutte le ghiande raccolte è stata la verifica della loro integrità nei tessuti interni, effettuata per immersione in acqua. I campioni così selezionati sono stati ripuliti esternamente da residui organici con lavaggio in acqua deionizzata sterile addizionata con il tensioattivo *Tween®20* (Poliossietilen sorbitan monomalurato, J. T Baker) per circa 5 minuti e successivo risciacquo in acqua sterile.

Le procedure di laboratorio sono state organizzate ed eseguite, per ciascuna delle 6 tesi considerate per pianta come segue:

- disinfezione di 10 ghiande intere private della cupola con perossido di idrogeno, H₂O₂, al 15% per 15 minuti, e successivi due lavaggi in acqua sterile deionizzata;

- 20 semi, privati della cupola, disinfettati esternamente con perossido di idrogeno al 15% per 15 minuti, sciacquate in due passaggi e processate come di seguito:
 - 10 semi sezionati in due parti e privati del pericarpo esterno. I due cotiledoni ottenuti, ulteriormente divisi a metà, non sono stati sottoposti a disinfezione alcuna;
 - 10 ghiande sezionate in due parti e private del pericarpo esterno. I due cotiledoni ottenuti per seme sono stati sottoposti a disinfezione in perossido di idrogeno al 5% per 5 minuti. È seguito poi un risciacquo in acqua deionizzata sterile e un ulteriore sezionamento dei cotiledoni in due metà ciascuno.

Rispettivamente alle metodologie di processazione di laboratorio appena descritte, tutti i frammenti campione sono stati codificati come segue:

D1 T X	D6 T X	D12 T X
D1 R X	D6 R X	D12 R X
D1 T CN	D6 T CN	D12 T CN
D1 R CN	D6 R CN	D12 R CN
D1 T CS	D6 T CS	D12 T CS
D1 R CS	D6 R CS	D12 R CS

in cui:

D1, D6, D12 = 1, 6, 12 giorni di permanenza; T, R = Raccolta da terra o da rete;
 X = Ghiande intera; CN = Cotiledoni non disinfettati; CS = Cotiledoni disinfettati.

2. Semenzali

2.1 L'allevamento

Per ciascuna delle 6 tesi per pianta indagate contestualmente alla micoflora seedborne, sono state raccolte 20 ulteriori ghiande di farnia e destinate all'ottenimento di giovani semenzali da allevare in condizioni controllate e di sterilità.

Tutto il materiale necessario è stato così predisposto:

- 120 vasi di terracotta, di 12 cm di altezza e 14 cm di diametro all'apertura, contenenti terriccio universale;

- 120 contenitori in vetro cilindrici, della capacità di 3,5 litri, capovolti sulla sommità dei vasi in terracotta per l'ottenimento di una sorta di "microserra" ad elevato tenore di umidità relativa (U.R. 85-95%) (*Fig. 3*);
- ciascuna delle 120 microserra allestite è stata autoclavata a 120° C per 30 minuti e lasciate raffreddare;
- tutte le ghiande raccolte hanno subito una selezione per galleggiamento, un lavaggio in tensioattivo *Tween®20* e una disinfezione in perossido di idrogeno al 15% per 15 minuti;
- successivamente è stata effettuata la semina di due ghiande per microserra in ambiente controllato sotto cappa a flusso laminare per evitare ogni eventuale contaminazione accidentale da parte di spore fungine e/o batteri presenti normalmente nell'aria ed in laboratorio;
- contestualmente al momento di semina, sono stati forniti ad ogni microserra circa 200 ml di acqua, sterilizzata in autoclave a 120°C per 15 minuti, direttamente sul terriccio;

L'allevamento dei giovani semenzali è stato condotto in serra termo-condizionata, a $24 \pm 2^\circ$ C, con fotoperiodo naturale, a partire dal mese di novembre (*Fig. 4*).

2.2 Preparazione dei campioni

Si sono ottenuti 120 semenzali di *Q. robur* dai quali, dopo 90 giorni dalla levata dell'epicotile, sono stati effettuati gli isolamenti della popolazione fungina da tutti gli organi vegetali, come segue, secondo la schematizzazione riportata in *fig. 5*:

Foglie

- prelevate due foglie apicali (F1 ed F2) e 2 foglie basali (F3 ed F4) e trattate intere superficialmente con perossido di idrogeno al 10% per 8 minuti, con successivi due lavaggi in acqua deionizzata sterile;

- per ciascuna foglia sono stati prelevati 3 frammenti di 8mm di diametro, rispettivamente nella zona apicale (A), mediana (M) e basale (B) della lamina fogliare.

Fusticino

- il giovane fusticino è stato reciso a livello del colletto e separato dalle rimanenti foglie;
- il fusticino è stato trattato intero con perossido di idrogeno al 10% per 10 minuti, seguito da due risciacqui successivi;
- prelevati poi 3 frammenti dal fusticino della lunghezza di circa 3 cm ciascuno, rispettivamente a 2, 4 e 6cm di distanza dal colletto (T2, T4, T6) e sezionati longitudinalmente in due parti.

Apparato radicale

- l'apparato radicale di ogni semenzale è stato preventivamente ripulito con acqua dai residui di terriccio;
- dalle radici di assorbimento sono stati prelevati, casualmente, 5 apici radicali e trattati con perossido di idrogeno all'1% per 3 minuti, e successivamente risciacquati;
- dallo stesso apparato radicale è stato prelevato un frammento di radice fittonante ad una distanza di circa 2-3cm dal colletto del semenzale;
- il fittone è stato trattato con perossido di idrogeno al 10% per 15 minuti, risciacquato con acqua sterile e sezionato in due parti nel senso della lunghezza.

3. Ghiande in fase di sviluppo

I prelievi in campo sono stati preceduti da un sopralluogo preventivo finalizzato alla ricerca di ulteriori 3 piante di *Q. robur* nel territorio di Montecchio Precalcino (VI) nella stessa area periferiche delle prove precedentemente descritte. Le 3 piante, aventi gli stessi requisiti di base già elencati, presentavano una chioma abbastanza bassa da poter permettere la raccolta dei semi direttamente dalla pianta prima della naturale disseminazione.

A partire dalla 16° settimana dell'anno, hanno avuto inizio la prova sperimentale e la raccolta dei fiori staminati già fecondati (*Fig. 6*), quelli cioè che presentavano un principio di estensione cellulare, un principio di accrescimento dimensionale, con cadenza bisettimanale, fino a metà settembre, per un totale di 12 raccolte per pianta ^(*).

Sono state prelevate 30 ghiande in fase di sviluppo, anche con l'ausilio di uno sveltatoio telescopico lungo fino a 4 metri. Successivamente, presso i laboratori, i fiori fecondati sono stati separati dal rispettivo peduncolo e lavati con tensioattivo *Tween®20* in soluzione acquosa.

Sono stati disinfettati esternamente con ipoclorito di sodio alla concentrazione dello 0,5% per 2 minuti e risciacquati con acqua deionizzata sterile in due successivi passaggi. Questo ultimo procedimento è stato ripetuto per una seconda volta.

Infine, tutti i campioni sono stati sezionati in 2 parti con bisturi.

A partire dalla 23° settimana dell'anno, all'inizio del mese di giugno, il protocollo di preparazione dei semi campionati è stato riformulato per poter far fronte alle loro accresciute dimensioni e alla quasi completa maturazione del pericarpo.

Tutte le 30 ghiande raccolte sono state separate dalla loro cupola. Tutte sono state lavate preliminarmente con *Tween®20* in soluzione con acqua sterile deionizzata per circa 2-3 minuti. Terminata questa prima fase, tutti i semi sono stati processati secondo lo schema seguente:

- da 10 ghiande è stato asportato l'intero pericarpo esterno, con l'uso di un bisturi, e disinfettato con perossido di idrogeno al 15% per un tempo di 15 minuti. In seguito, il pericarpo è stato sottoposto a due risciacqui successivi in acqua sterile e poi diviso in 4 frammenti;
- i cotiledoni rimasti dalla precedente procedura, sono stati sezionati in due metà ciascuno (4 frammenti cotiledonali totali per seme) e non disinfettati;
- 10 semi interi sono stati disinfettati con perossido di idrogeno al 15% per 15 minuti. Asportato il pericarpo si sono ottenuti i due cotiledoni interni per ghianda. Questi ultimi sono stati trattati ulteriormente con H₂O₂ al 5% per 5 minuti e risciacquati

con acqua sterile in due passaggi. Entrambi i cotiledoni sono stati sezionati in due metà ciascuno;

- ulteriori 10 ghiande intere sono state unicamente trattate con tensioattivo *Tween®20* in soluzione acquosa.

Contestualmente alle metodologie descritte, per ogni ghianda in sviluppo è stato separato il tessuto costituente il carpello florale, lo stimma residuo (*Fig. 6*).

(*)

16° settimana : 16-22 aprile;

17° settimana: 23-29 aprile;

19° settimana: 7-13 maggio;

21° settimana: 21-27 maggio;

23° settimana: 4-10 giugno;

25° settimana: 18-24 giugno;

27° settimana: 2-8 luglio;

29° settimana: 16-22 luglio;

31° settimana: 30 luglio 5 agosto;

34° settimana: 20-26 agosto;

36° settimana: 3-9 settembre;

38° settimana: 17-23 settembre.



Figura 1 – *Q. robur* madre destinata alla raccolta di semi maturi



Figura 2 – Rete allestita sotto chioma destinata alla raccolta.



Figura 3 – Allestimento microserre per l'allevamento di semenzali di *Q. robur*.



Figura 4 – 120 microserre conservate per tutto l'inverno in serra termocondizionata.

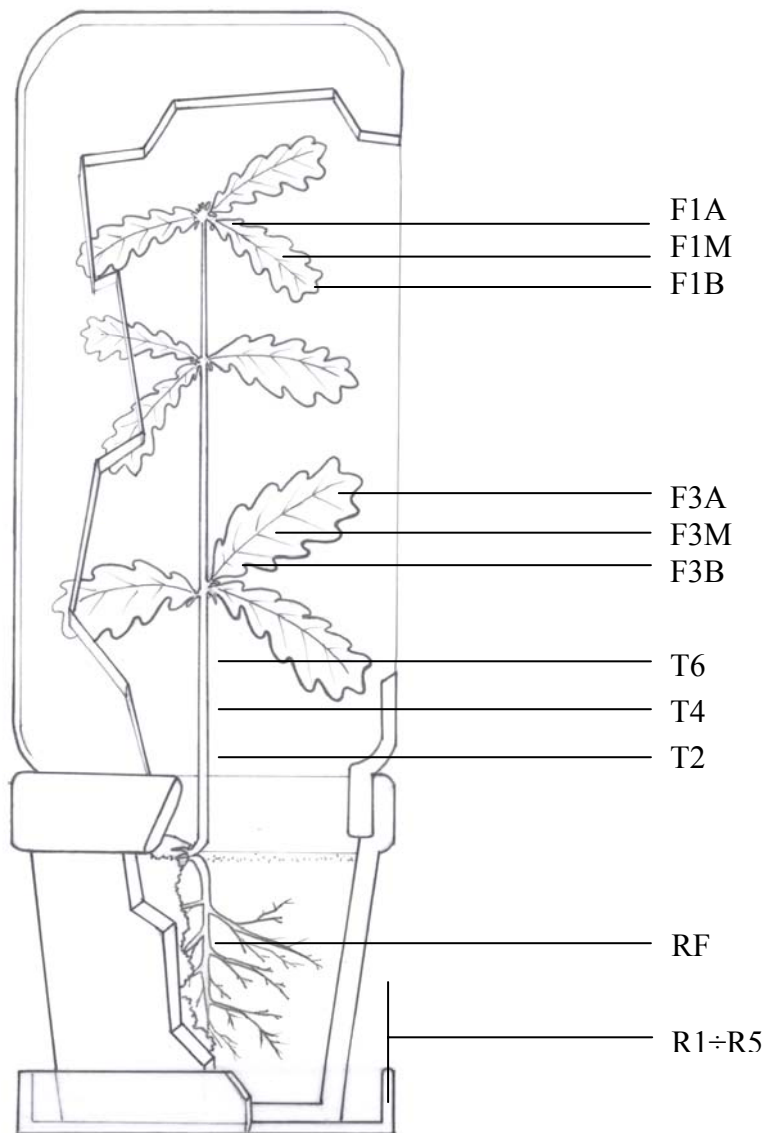


Figura 5 – Codifica dei frammenti prelevati dai semenzali (Baitelli A.).



Figura 6 – Fiore staminato fecondato in fase di sviluppo. Al centro del seme è visibile il residuo dello stimma tricarpellare.

4. Riconoscimento degli isolati ed analisi statistica.

Ciascun frammento vegetale di ghiande e semenzali allestito nella fase di laboratorio è stato posto ad incubare a 25°C al buio all'interno di capsule Petri da 90 mm di diametro sterili, contenenti 10 ml di substrato di crescita artificiale Potato Dextrose Agar (PDA, Difco Laboratories, 39 g/litro), preventivamente sterilizzato in autoclave a 120°C per 15 minuti e addizionato con 40 ml/litro di tetraciclina HCl (Ambramicina® 250 mg in capsule, Scharper).

L'accrescimento delle colonie fungine è stato monitorato con cadenza giornaliera al fine di ottenere colonie pure da successivi isolamenti dai frammenti. Tutte le colonie sono state allevate nelle stesse condizioni appena descritte fino alla produzione di strutture di riproduzione che ne agevolassero la diagnosi.

L'analisi dei miceli fungini è stata condotta al microscopio ottico considerandone le principali caratteristiche morfologiche e riproduttive e riferendosi alle seguenti chiavi diagnostiche: *Fungi and food spoilage* (84), *The Fusarium laboratory manual* (75), *Introduction to food- and airborne fungi* (76), *Identification of common Aspergillus species* (77), *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (78), *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* (79), *Manuale di Patologia Vegetale* (80), *Illustrated Genera of Ascomycetes* (81), *Combined Keys to Illustrated Genera of Ascomycetes* (82).

I dati di tutti gli isolamenti relativi alle specie fungine presenti nei tessuti vegetali sono stati ripartiti secondo frequenze categoriche binarie (0-1), per le quali è stata verificata la non adattabilità alla distribuzione normale.

Il test d'indipendenza del *chi quadrato*, χ^2 , per $p \leq 0.5$, è stato applicato per determinare le significatività delle differenze tra i seguenti gruppi:

- Grado di contaminazione dei tessuti secondo modalità di raccolta;
- Numero di generi fungini in relazione alla parte interna ed esterna delle ghiande;
- Confronti fra modalità di raccolta;
- Confronti fra frequenze di isolamento, epoche di raccolta e tessuti colonizzati;

Per ciascuna entità fungina isolata il parametro considerato nella descrizione dei dati è stata la frequenza di isolamento, così calcolata:

$$F. I. \% = (N_i / N_t) * 100, \quad \text{dove:}$$

Ni = numero di frammenti da cui è stato isolato un fungo;

Nt = numero di frammenti totali per prova.

Nello studio condotto sui semenzali allevati, il parametro principale considerato è stato la frequenza relativa di isolamento, dato dalla:

$$F. R. \% = (N_i / N_t) * 100, \quad \text{dove:}$$

Ni = numero di colonie dell'isolato fungino in esame;

Nt = numero totale di colonie ottenute nella prova.

Inoltre, per descrivere la quantità di ghiande colonizzate da almeno una specie fungina sul totale delle ghiande campionate, è stato considerato il seguente parametro:

$$\text{Grado di contaminazione} = (N_g / N_{gt}) * 100$$

con:

Ng = numero ghiande colonizzate da almeno una specie fungina;

Ngt = numero di ghiande totali.

Per verificare se due gruppi appartenevano alla stessa popolazione nell'ambito dei confronti effettuati tra i diversi gradi di contaminazione relativamente alle modalità di raccolta delle ghiande mature e i periodi di permanenza su terra o su rete, è stato applicato il test statistico non parametrico di Mann-Whitney, con livello di significatività del 5%.

Infine, per i confronti tra più gruppi è stato applicato il test non parametrico di Kruskal-Wallis con $p \leq 0.5$, seguito da un confronto multiplo *post-hoc* con il test di Dunn.

Per l'interpretazione dei risultati è stato impiegato il software statistico *XLSTAT* versione 2007.8.01, Addinsoft™.

Risultati

1. Ghiande mature

Dall' isolamento degli organismi fungini su piastra sono stati identificati 39 generi: 33 nella prova condotta nell'anno 2005 e 29 nella prova del 2006 (Tab. 3). Il genere *Penicillium* presenta la frequenza di isolamento maggiore: più del 40% nel 2005 e poco superiore al 25% nel 2006. Le maggiori frequenze di isolamento successive sono riferibili ai generi *Alternaria* (circa il 30% nella seconda prova e circa il 10% nella prima), *Fusarium* (15-25%) ed *Epicoccum* (10-15% circa), seguiti da *Scopulariopsis* con circa il 14% di presenza nella prima prova ed il 6% nella seconda, *Trichoderma* tra il 10% ed il 15% e *Cladosporium* con frequenza del 6-8% (Figg. 6 e 7). *Phomopsis* sp., *Cytospora* sp. e *Fusicoccum* sp., isolati dalle ghiande in entrambe le prove, mostrano frequenze del 5-10% nella seconda, e del 4,44%, 0,83% e 4,17% rispettivamente, nella prima sperimentazione. Comprese tra il 2% ed il 5% risultano le frequenze di isolamento dei generi *Mucor* (3,89%), *Ulocladium* (3,33%), *Aspergillus* (2,78%), *Rhizoctonia* (2,5%), *Nigrospora* (2,22%), *Gloeosporium* (2,22%) e *Didymella* (2,22%). Frequenze inferiori al 2% si hanno per *Aspergillus* sp. (1,39%), *Botrytis* sp. (1,39%), *Gloeosporium* sp. (1,67%), *Nectria* sp. (1,39%), *Nigrospora* sp. (1,39%), *Pythium* sp. (1,67%) e *Zygorhynchus* (1,39%) nella prova condotta nel 2005, *Beltrania* sp. (1,67%), *Pyrenochaeta* sp. (1,67%) e *Sporothrix* sp. (1,67%). Infine, sporadici sono risultati i generi *Ascochyta*, *Calcarisporium*, *Cryphonectria*, *Cylindrocarpon*, *Geotrichum*, *Humicola*, *Moniliella*, *Ophiostoma*, *Paecilomyces*, *Pestalotia*, *Phoma* e *Sordaria*, isolati con frequenze inferiori all'1% (Tab. 3, Figg. 6 e 7).

Nel complesso, le specie fungine isolate dalle ghiande sono risultate 55, distribuite nelle due diverse raccolte e nei tre momenti della sperimentazione. *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp. sono rappresentati da 7 e 5 specie rispettivamente, seguiti da *Alternaria*, *Cytospora*, *Epicoccum*, *Gliocladium* e *Phomopsis*, ciascuno con 2 specie (Tab. 3).

Tabella 3 Frequenze di isolamento relative ai generi isolati da ghiande mature (*N.c.*: non classificato)

Generi Fungini	2005 F. I. %	2006 F. I. %
<i>Alternaria</i> sp.	9,44	28,33
<i>Ascochyta</i> sp.	-	0,28
<i>Aspergillus</i> sp.	1,39	2,78
<i>Beltrania</i> sp.	-	1,67
<i>Botrytis</i> sp.	1,39	1,11
<i>Calcarisporium</i> sp.	-	0,28
<i>Cladosporium</i> sp.	6,11	7,50
<i>Cryphonectria</i> sp.	0,28	-
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	0,56	-
<i>Cytospora</i> sp.	0,83	7,22
<i>Dydimella</i> sp.	0,28	2,22
<i>Epicoccum</i> sp.	7,78	12,78
<i>Fusarium</i> sp.	18,33	24,17
<i>Fusicoccum</i> sp.	4,17	6,39
<i>Geotrichum</i> sp.	-	0,28
<i>Gliocladium</i> sp.	0,56	0,28
<i>Gloeosporium</i> sp.	1,67	2,22
<i>Humicola</i> sp.	-	0,28
<i>Microsphaeropsis</i> sp.	0,83	0,83
<i>Moniliella</i> sp.	0,56	-
<i>Mucor</i> sp.	5,28	3,89
<i>N. c. 1</i>	0,56	-
<i>Nectria</i> sp.	1,39	-
<i>Nigrospora</i> sp.	1,39	2,22
<i>Ophiostoma</i> sp.	0,28	-
<i>Paecilomyces</i> sp.	0,28	-
<i>Penicillium</i> sp.	41,11	25,56
<i>Pestalotia</i> sp.	0,28	-
<i>Phoma</i> sp.	0,56	-
<i>Phomopsis</i> sp.	4,44	7,22
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	0,83	1,39
<i>Pythium</i> sp.	1,67	-
<i>Rhizoctonia</i> sp.	0,28	2,50
<i>Scopulariopsis</i> sp.	13,89	6,39
<i>Sordaria</i> sp.	-	0,56
<i>Sporothrix</i> sp.	1,11	1,67
<i>Trichoderma</i> sp.	12,50	9,44
<i>Ulocladium</i> sp.	0,28	3,33
<i>Zyghorhynchus</i> sp.	1,39	0,28

2005

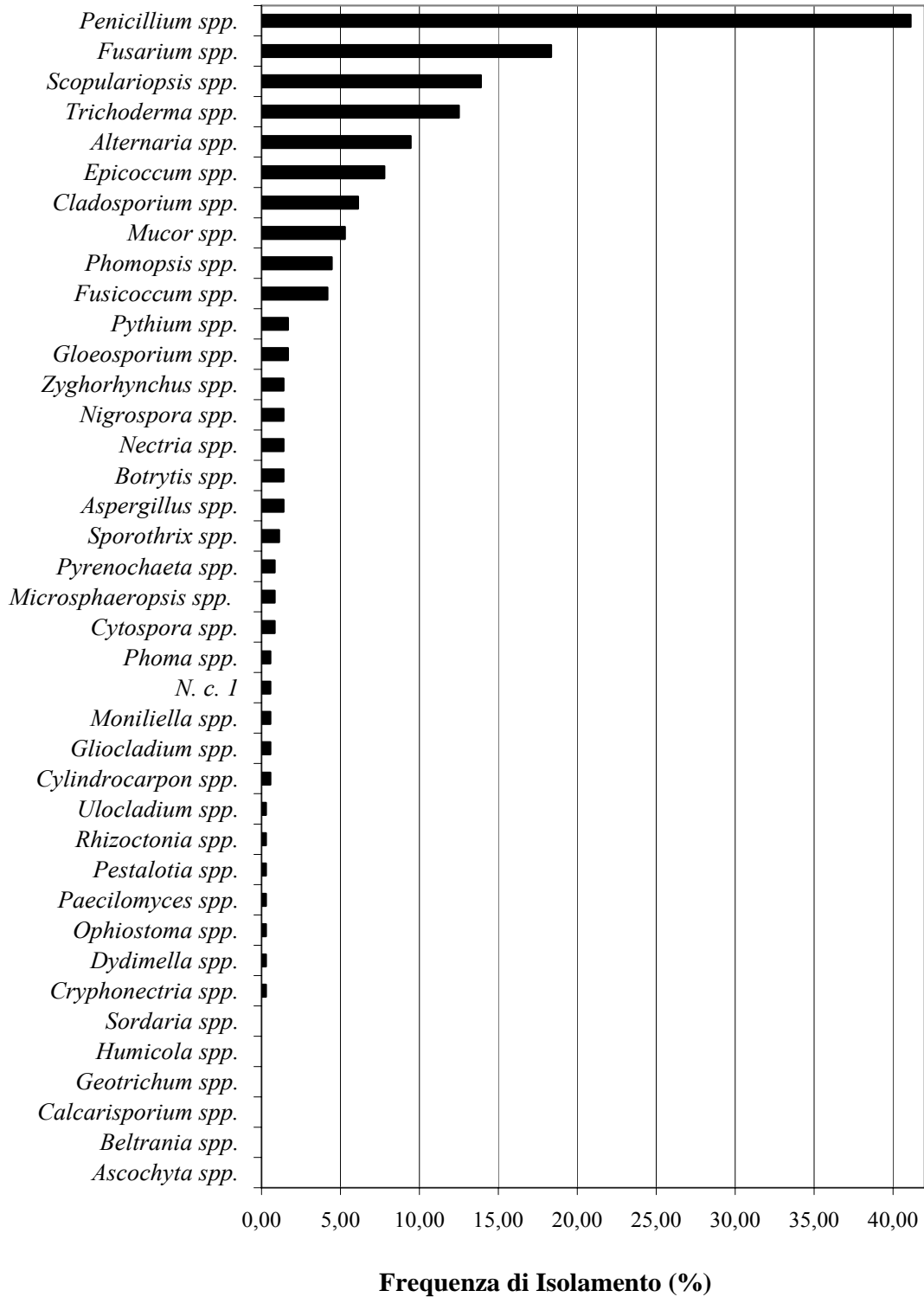


Figura 6. Frequenze di isolamento dei generi fungini isolati da ghiande nella prima prova (N.c.: Non classificato)

2006

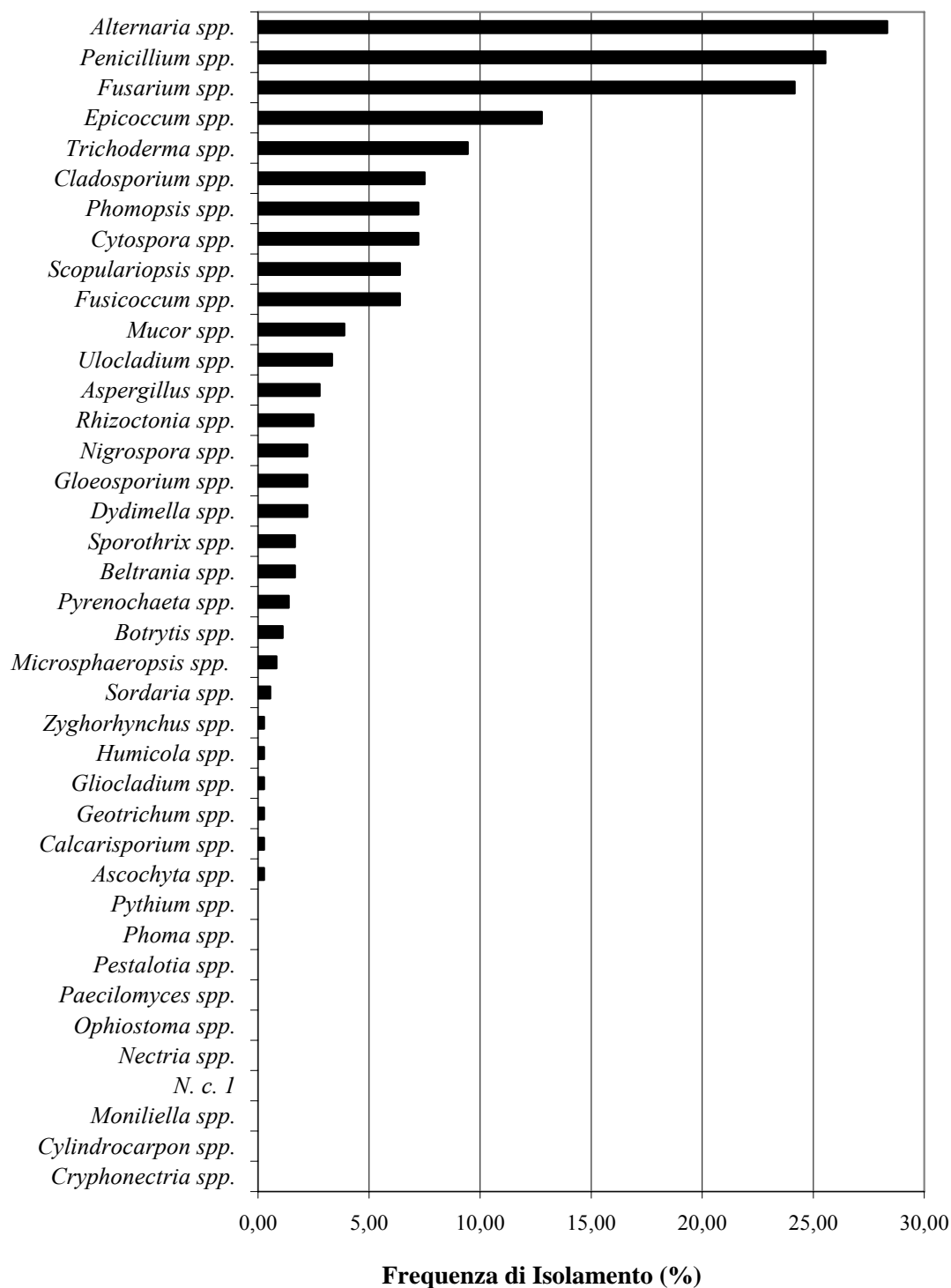


Figura 7 - Frequenze di isolamento dei generi fungini isolati da ghiande osservate nel 2006 (*N.c.:* *Non classificato*)

Tabella 3. Frequenze di isolamento relative alle specie fungine isolate da ghiande mature*(N.c.: Non classificato)*

F.I. % SPECIE FUNGINA	2005						2006					
	TERRA			RETE			TERRA			RETE		
	D1	D6	D12	D1	D6	D12	D1	D6	D12	D1	D6	D12
Alternaria alternata	6,67	5,00	8,33	10,00	11,67	5,00	18,33	30,00	16,67	25,00	21,67	21,67
Alternaria infectoria	-	1,67	-	5,00	-	3,33	3,33	5,00	10,00	8,33	3,33	6,67
Ascochyta sp.	-	-	-	-	-	-	-	1,67	-	-	-	-
Aspergillus Sez. Niger	1,67	3,33	-	1,67	1,67	-	-	1,67	6,67	-	1,67	6,67
Beltrania sp.	-	-	-	-	-	-	3,33	-	5,00	-	-	1,67
Botrytis cinerea	-	3,33	1,67	1,67	1,67	-	3,33	-	-	1,67	-	1,67
Calcarisporium parasiticum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,67	-	-
Cladosporium cladosporioides	6,67	6,67	8,33	13,33	1,67	-	5,00	5,00	8,33	5,00	13,33	8,33
Cryphonectria parasitica	-	-	-	-	-	1,67	-	-	-	-	-	-
Cylindrocarpon sp.	-	1,67	-	-	1,67	-	-	-	-	-	-	-
Cytospora sp. 1	-	-	-	1,67	-	-	5,00	3,33	1,67	5,00	3,33	-
Cytospora sp. 2	-	-	-	-	3,33	-	8,33	1,67	-	13,33	1,67	-
Didymella sp.	-	-	-	-	1,67	-	3,33	3,33	-	-	5,00	1,67
Epicoccum nigrum	-	11,67	6,67	8,33	1,67	-	11,67	11,67	13,33	5,00	8,33	-
Epicoccum sp.	5,00	8,33	3,33	1,67	-	-	8,33	3,33	1,67	6,67	5,00	1,67
Fusarium graminearum	1,67	1,67	3,33	11,67	-	3,33	-	5,00	1,67	1,67	5,00	1,67
Fusarium lateritium	-	-	-	-	-	-	-	3,33	-	-	-	-
Fusarium proliferatum	1,67	3,33	1,67	3,33	1,67	8,33	8,33	3,33	-	5,00	26,67	25,00
Fusarium solani	1,67	33,33	5,00	10,00	3,33	15,00	6,67	6,67	1,67	3,33	13,33	11,67
Fusarium sp. 1	-	-	-	-	-	-	-	1,67	-	-	-	-
Fusarium sp. 2	-	-	-	-	-	-	-	1,67	-	-	-	-
Fusarium verticillioides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,00	-	1,67
Fusicoccum quercus	1,67	3,33	1,67	-	15,00	3,33	10,00	3,33	8,33	6,67	1,67	8,33
Geotrichum candidum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,67	-
Gliocladium catenulatum	-	1,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gliocladium roseum	-	-	1,67	-	-	-	1,67	-	-	-	-	-
Gloeosporium sp. 1	-	-	-	6,67	-	-	8,33	-	-	-	-	-
Gloeosporium sp. 2	1,67	-	-	-	1,67	-	1,67	1,67	1,67	-	-	-
Humicola dimorphospora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,67	-	-
Microsphaeropsis sp.	-	-	3,33	1,67	-	-	-	3,33	1,67	-	-	-
Moniliella sp.	1,67	1,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucor sp.	16,67	5,00	8,33	1,67	-	-	3,33	10,00	5,00	-	3,33	1,67
N. c. 1	-	-	-	1,67	-	1,67	-	-	-	-	-	-
Nectria sp.	-	3,33	1,67	1,67	1,67	-	-	-	-	-	-	-
Nigrospora sphaerica	1,67	1,67	1,67	1,67	1,67	-	1,67	3,33	-	1,67	6,67	-
Ophiostoma sp.	1,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paecilomyces variotii	-	1,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicillium sp.	30,00	10,00	8,33	38,33	85,00	75,00	15,00	21,67	25,00	31,67	23,33	36,67
Pestalotia sp.	1,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phoma glomerata	1,67	-	-	-	-	1,67	-	-	-	-	-	-
Phomopsis oblonga	-	-	-	-	-	-	-	1,67	1,67	1,67	3,33	1,67
Phomopsis quercina	-	3,33	3,33	5,00	11,67	3,33	6,67	5,00	6,67	5,00	10,00	-
Pyrenochaeta sp.	-	-	3,33	1,67	-	-	5,00	-	1,67	-	1,67	-
Pythium intermedium	-	8,33	1,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhizoctonia solani	-	1,67	-	-	-	-	6,67	3,33	3,33	-	-	1,67
Scopulariopsis asperula	6,67	21,67	21,67	8,33	6,67	18,33	5,00	6,67	5,00	3,33	3,33	15,00
Sordaria fimicola	-	-	-	-	-	-	-	3,33	-	-	-	-
Sporothrix sp.	3,33	-	3,33	-	-	-	1,67	-	-	-	6,67	1,67
Trichoderma aureoviride	-	3,33	8,33	-	-	10,00	-	-	-	-	-	-
Trichoderma hamatum	3,33	1,67	-	3,33	3,33	5,00	6,67	5,00	1,67	-	5,00	-

Trichoderma harzianum	6,67	8,33	16,67	1,67	1,67	1,67	-	1,67	-	-	5,00	5,00
Trichoderma koningii	-	-	-	-	-	-	-	-	3,33	1,67	-	1,67
Trichoderma pseudokoningii	-	-	-	-	-	-	6,67	1,67	-	-	-	11,67
Ulocladium botrytis	-	1,67	-	-	-	-	-	3,33	5,00	6,67	5,00	-
Zyghorhynchus heterogamus	-	6,67	-	-	-	1,67	-	-	-	1,67	-	-

Nell'ambito delle colonie fungine ottenute *Alternaria alternata* e *Scopulariopsis asperula* presentano le frequenze maggiori, 15% e 10,14%. Compresi tra il 5% ed il 10% risultano *Cladosporium cladosporioides* (6,8%), *Epicoccum nigrum* (6,53%), *Fusarium proliferatum* (7,36%), *Fusarium solani* (9,31%), *Fusicoccum quercus* (5,28%) e *Phomopsis quercina* (5%) (Tab. 3).

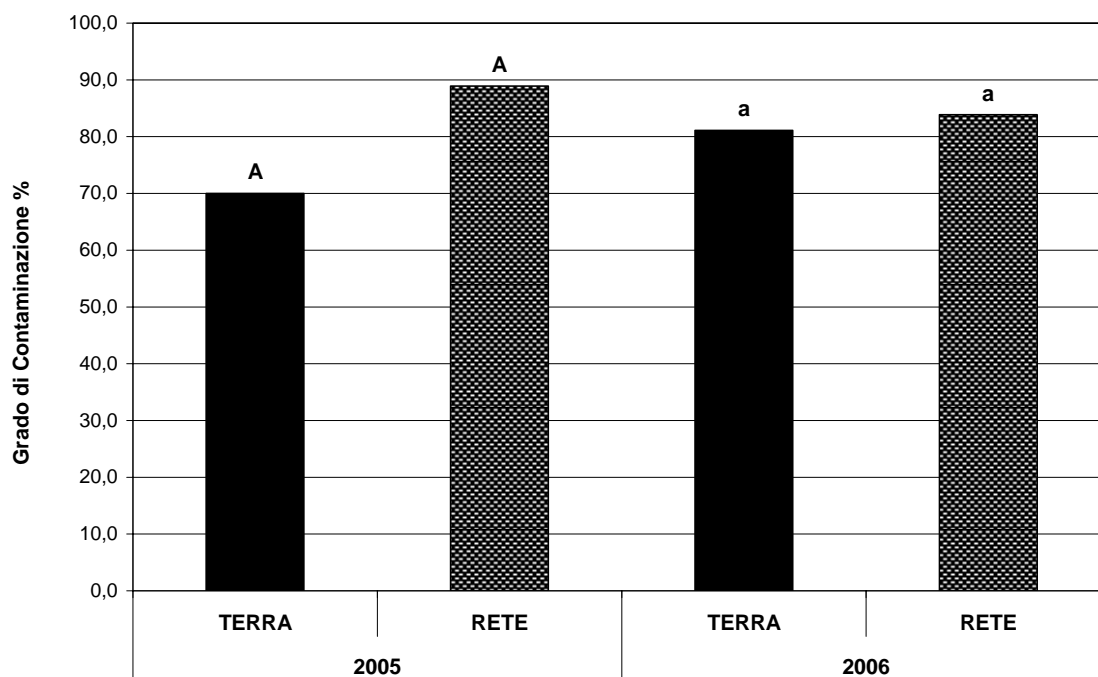


Figura 8. – Grado di contaminazione fungina di ghiande mature, distribuite secondo modalità di raccolta.

Tabella 4. – Test non parametrico per due campioni, Mann-Whitney.

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale: Terra/Rete 2005		Test di Mann-Whitney / Test bilaterale: Terra/Rete 2006	
U	2,000	U	4,000
Valore atteso	4,500	Valore atteso	4,500
Varianza (U)	5,100	Varianza (U)	5,250
p-value (bilaterale)	0,400	p-value (bilaterale)	1,000
alfa	0,05	alfa	0,05

In *Fig. 8* vengono visualizzati i gradi di contaminazione fungina riscontrati sui semi di *Q. robur* relativamente alla modalità di raccolta effettuata. In entrambi gli anni, si riscontra una presenza di inoculo fungino del 70-90% delle ghiande osservate. Inoltre, non si riscontrano differenze significative tra il grado di contaminazione di ghiande raccolte da terra e quello di ghiande raccolte da rete, come risulta dal test statistico Mann-Whitney, per $p \leq 0.5$ (*Tab. 4*).

Osservando la distribuzione delle ghiande nelle diverse situazioni considerate, si evidenziano i dati relativi ai livelli di contaminazione riscontrati per semi raccolti terra e da rete dopo 1, 6 e 12 giorni (*Fig. 9*). Dagli esiti ottenuti dai test di Mann-Whitney si hanno differenze significative per $p \leq 0.5$ risultano maggiori il grado di contaminazione di ghiande cadute su rete e raccolte dopo un giorno, e di ghiande raccolte da rete dopo il sesto giorno di permanenza (*Tab. 5*). Negli altri casi osservati i livelli di contaminazione variano dal 50% al 90% delle ghiande esaminate e non presentano differenze significative tra modalità di raccolta.

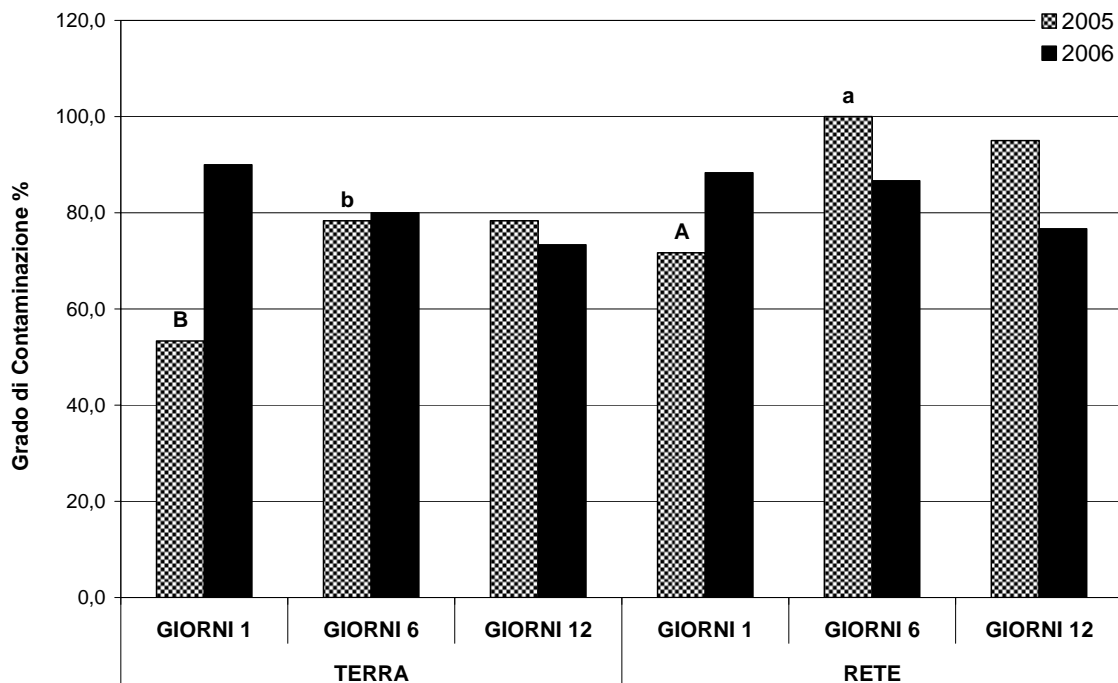


Figura 9 – Grado di contaminazione di ghiande mature in relazione ai giorni di permanenza.

Un ulteriore aspetto, osservato in *Fig. 10*, è relativo al grado di contaminazione fungina delle ghiande relativamente ai tessuti colonizzati, interni o esterni, e alla modalità di raccolta, terra o rete. In tutte le situazioni considerate ed in entrambi gli anni di studio risulta che dal 100% dei pericarpi delle ghiande di *Q. robur* campionate è possibile isolare almeno una specie fungina, senza distinzioni tra il sito di permanenza temporanea considerata. Al contrario, i valori ricavati per i tessuti cotiledonali risultano inferiori rispetto ai pericarpi. Differenze statisticamente significative si possono osservare tra il grado di contaminazione dei tessuti interni delle ghiande cadute a terra o su rete, con valori maggiori in quest'ultimo caso (80% circa) (*Tabella 6*). Questo ultimo aspetto considerato, tuttavia, non è verificato anche per l'anno 2006.

Tabella 5 – Test Mann-Whitney per confronti tra modalità di raccolta.

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale: Terra/Rete - Giorni 1 - 2005		Test di Mann-Whitney / Test bilaterale: Terra/Rete - Giorni 1 - 2006	
U	1,000	U	2,000
Valore atteso	2,000	Valore atteso	2,000
Varianza (U)	1,000	Varianza (U)	1,500
p-value (bilaterale)	< 0,0001	p-value (bilaterale)	0,667
alfa	0,05	alfa	0,05
Test di Mann-Whitney / Test bilaterale: Terra/Rete - Giorni 6 - 2005		Test di Mann-Whitney / Test bilaterale: Terra/Rete - Giorni 6 - 2006	
U	1,000	U	0,000
Valore atteso	2,000	Valore atteso	2,000
Varianza (U)	1,000	Varianza (U)	1,500
p-value (bilaterale)	< 0,0001	p-value (bilaterale)	0,221
alfa	0,05	alfa	0,05
Test di Mann-Whitney / Test bilaterale: Terra/Rete - Giorni 12 - 2005		Test di Mann-Whitney / Test bilaterale: Terra/Rete - Giorni 12 - 2006	
U	0,000	U	2,000
Valore atteso	2,000	Valore atteso	2,000
Varianza (U)	1,667	Varianza (U)	1,667
p-value (bilaterale)	0,333	p-value (bilaterale)	0,667
alfa	0,05	alfa	0,05

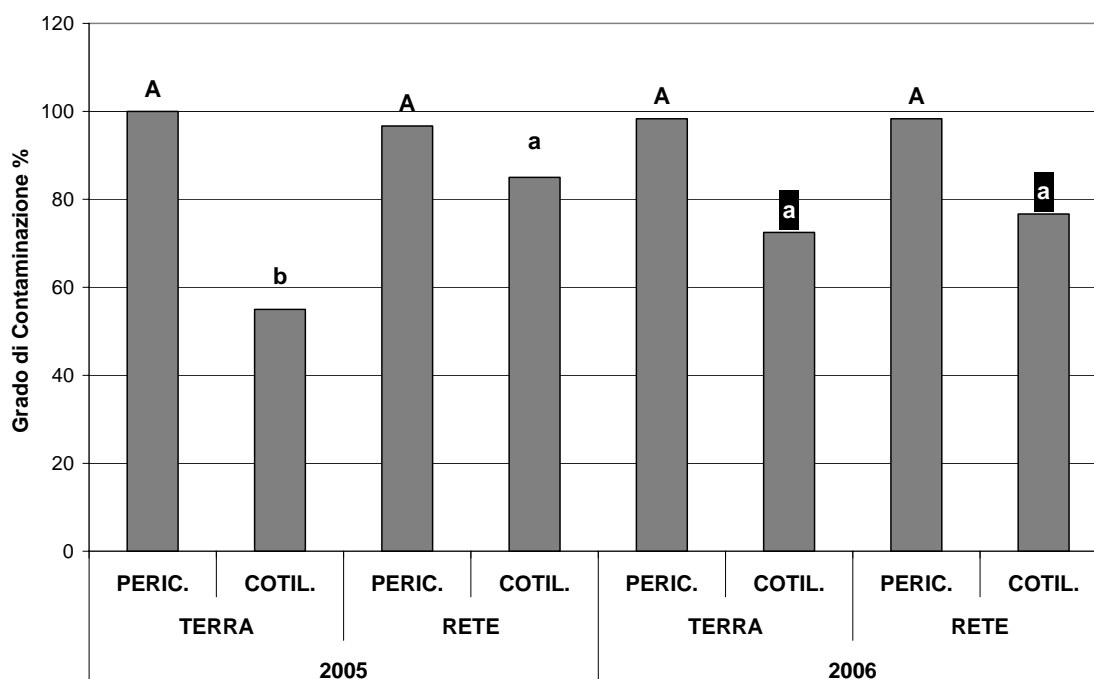


Figura 10 – Grado di contaminazione di ghiande in relazione ai tessuti pericarpo e cotiledoni

Tabella 6 – Test di indipendenza χ^2 tra tessuto e modalità di raccolta.

Test d'indipendenza tra Terra/Rete - 2005: Pericarpo		Test d'indipendenza tra Terra/Rete - 2005: Cotiledoni	
Chi-quadro corretto (osservato)	3,378	Chi-quadro corretto (osservato)	21,400
Chi-quadro corretto (critico)	3,841	Chi-quadro corretto (critico)	3,841
GDL	1	GDL	1
p-value	0,066	p-value	< 0,0001
alfa	0,05	alfa	0,05
Test d'indipendenza tra Terra/Rete - 2006: Pericarpo		Test d'indipendenza tra Terra/Rete - 2006: Cotiledoni	
Chi-quadro corretto (osservato)	0,071	Chi-quadro corretto (osservato)	0,934
Chi-quadro corretto (critico)	3,841	Chi-quadro corretto (critico)	3,841
GDL	1	GDL	1
p-value	0,790	p-value	0,334
alfa	0,05	alfa	0,05

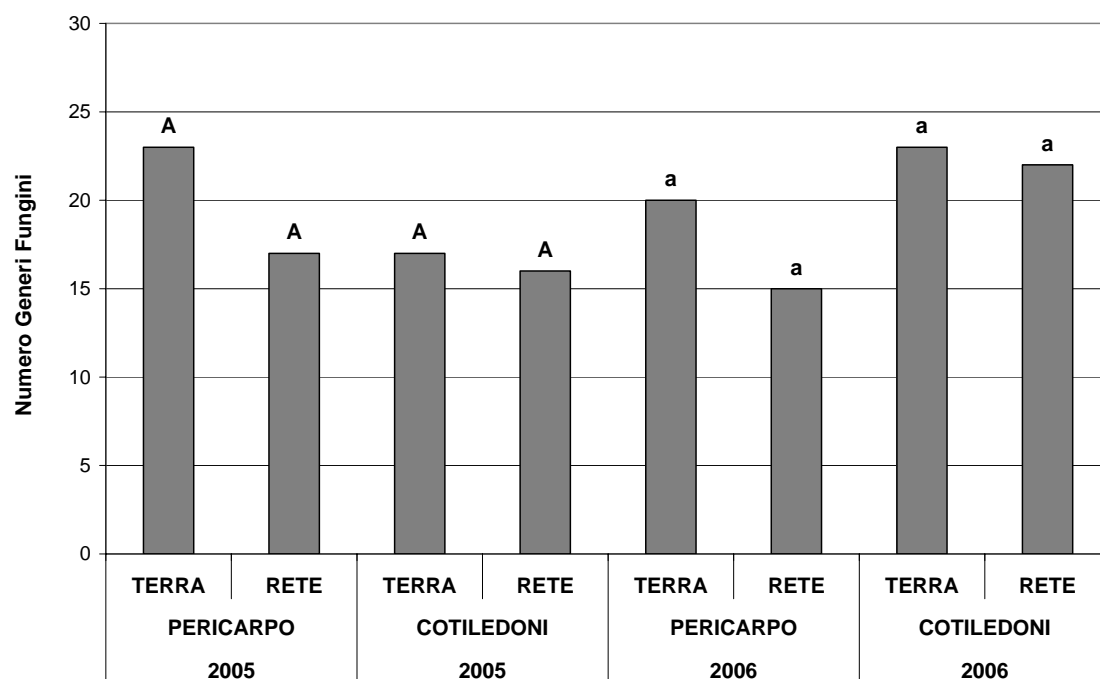


Figura 11 – Numero di generi fungini su tessuti dei semi in relazione alla modalità di raccolta

Tabella 7 – Test di indipendenza tra tessuto e modalità di raccolta per generi fungini.

Test d'indipendenza Interno/Esterno : Tessuto - 2005		Test d'indipendenza Interno/Esterno: Tessuto - 2006	
Chi-quadro corretto (osservato)	1,422	Chi-quadro corretto (osservato)	6,122
Chi-quadro corretto (critico)	7,815	Chi-quadro corretto (critico)	7,815
GDL	3	GDL	3
p-value	0,700	p-value	0,106
alfa	0,05	alfa	0,05

Le differenze tra le ghiande raccolte da terra e da rete, nel contesto dei tessuti interni o esterni, sono state studiate anche considerando il numero di generi fungini totali rilevati su ciascuna situazione considerata (*Fig. 11*). Associati al test d'indipendenza χ^2 (*Tab. 7*), i dati evidenziati non presentano alcuna differenza. La quantità di generi isolati dalla parte esterna della ghianda variano da 15 a 23, e nei cotiledoni da 16 a 23, con valori relativamente più elevati per le raccolte da terra. Anche tra i diversi tipi di tessuto, in relazione alla medesima modalità di raccolta, si riscontra che molto simile è la quantità di generi presenti sulle ghiande, tuttavia con valori sempre maggiori per ghiande provenienti dal terreno (*Fig. 11*).

Infine, si riportano di seguito i dati distribuiti nel tempo, per la stagione 2005 e per la stagione 2006 (*Fig. 12 e 13*).

E' possibile osservare che il grado di contaminazione fungina del pericarpo assume valori sempre molto alti, compresi tra il 95% ed il 100% delle ghiande campionate, sia nel corso delle osservazioni effettuate nel 2005, sia nel 2006. Dalla elaborazione dei dati relativi ai cotiledoni si hanno risultati variabili. Nel corso della prova condotta nel 2005 almeno il 30% delle ghiande raccolte da terra dopo il primo giorno presentano cotiledoni colonizzati da organismi fungini, valore che aumenta al 67% con il protrarsi della permanenza al suolo fino al sesto giorno, stabilizzandosi. Un andamento simile si riscontra nei cotiledoni di ghiande provenienti da rete, sebbene con valori più elevati: il 60% dei cotiledoni raccolti al primo giorno evidenzia la presenza di almeno una specie fungina, ed il grado di contaminazione aumenta al sesto ed al dodicesimo giorno raggiungendo il 95%-100% (*Fig.12*). Nei campioni della seconda prova non si hanno uguali andamenti. L'85% dei cotiledoni di ghiande raccolte dopo un giorno di permanenza al suolo e da rete risultano contaminati da almeno una specie fungina, per passare al 62% su terra e al 65% su rete. Queste ultime variazioni descritte, tuttavia, non trovano riscontro dalla elaborazione dei dati: non si hanno differenze statisticamente significative nel grado di contaminazione posto in relazione al tempo, sia per quanto riguarda i tessuti interni di ghiande da terra, sia da rete (*Fig. 13*).

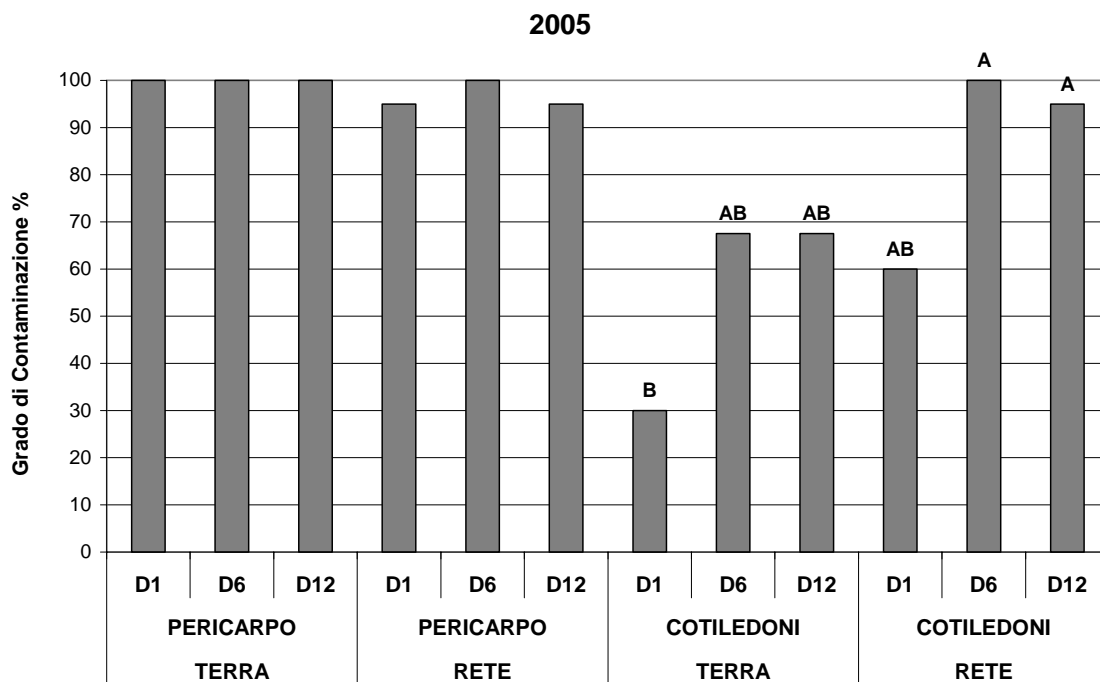


Figura 12 – Grado di contaminazione fungina su tessuti dei semi in relazione agli intervalli di tempo 1, 6, 12 giorni, 2005

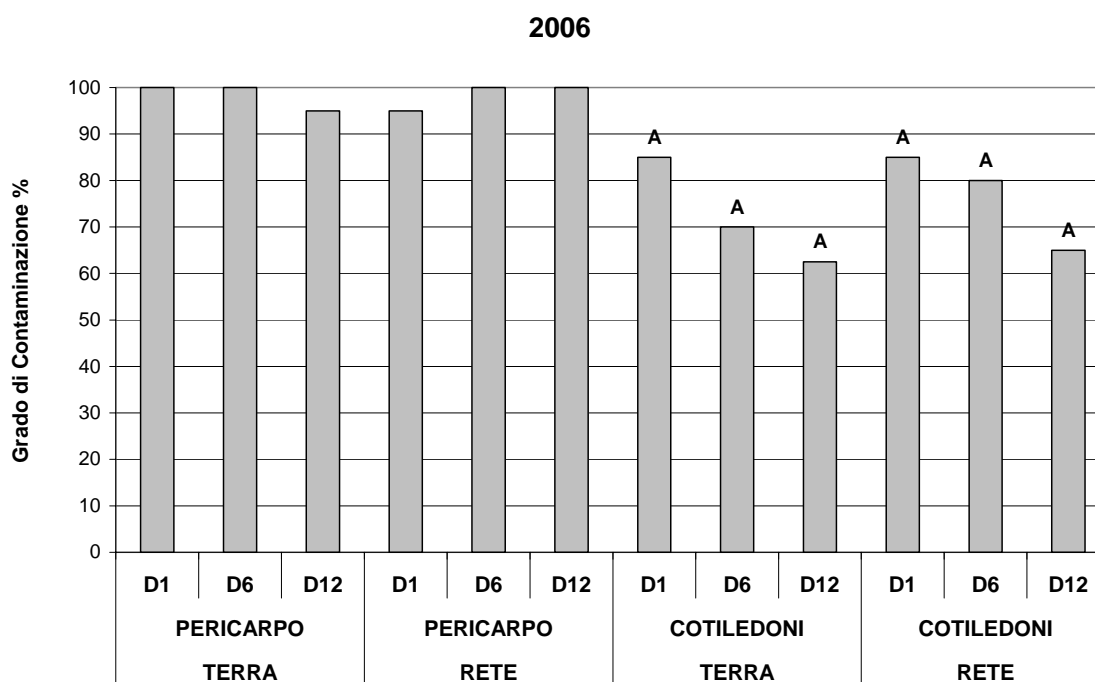


Figura 13 – Grado di contaminazione fungina su tessuti dei semi in relazione agli intervalli di tempo 1, 6, 12 giorni, 2006

I valori calcolati da una ulteriore elaborazione statistica dei dati raccolti sono stati riuniti in tre distribuzioni di valori χ^2 , rappresentativi del livello di significatività statistica nei confronti effettuati tra:

- le due modalità di raccolta (terra/rete) in relazione all'intervallo di tempo di permanenza (*Tab. 8*);
- i tre momenti di raccolta delle ghiande in relazione alla modalità di raccolta (*Tab. 9*);
- il tessuto della ghianda da cui sono stati effettuati gli isolamenti (pericarpo/cotiledoni) in relazione sia alla modalità, sia al momento di raccolta (*Tabb. 10 e 11*)

Tabella 8 – Valori di χ^2 per i confronti tra le modalità di raccolta di ghiande mature.

SPECIE FUNGINA	2005			2006		
	TERRA - RETE			TERRA - RETE		
	D1	D6	D12	D1	D6	D12
<i>Alternaria alternata</i>	0,436	1,745	0,536	0,786	1,087	0,484
<i>Alternaria infectoria</i>	3,077	1,008	2,034	1,365	0,209	0,436
<i>Ascochyta sp.</i>	-	-	-	-	1,008	-
<i>Aspergillus Sez. Niger</i>	-	0,342	-	-	-	-
<i>Beltrania sp.</i>	-	-	-	2,034	-	1,034
<i>Botrytis cinerea</i>	1,008	0,342	1,008	0,342	-	1,008
<i>Calcarisporium parasiticum</i>	-	-	-	1,008	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,481	1,878	5,217 *	-	2,502	-
<i>Cryphonectria parasitica</i>	-	-	1,008	-	-	-
<i>Cylindrocarpon sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Cytospora sp. 1</i>	1,008	-	-	-	-	1,008
<i>Cytospora sp. 2</i>	-	2,034	-	0,776	-	-
<i>Didymella sp.</i>	-	1,008	-	2,034	0,209	1,008
<i>Epicoccum nigrum</i>	5,217 *	4,821 *	4,138 *	1,745	0,370	8,571 **
<i>Epicoccum sp.</i>	1,034	5,217 *	2,034	0,120	0,209	-
<i>Fusarium sp. 1</i>	-	-	-	-	1,008	-
<i>Fusarium sp. 2</i>	-	-	-	-	1,008	-
<i>Fusarium graminearum</i>	4,821 *	1,008	-	1,008	-	-
<i>Fusarium lateritium</i>	-	-	-	-	2,034	-
<i>Fusarium proliferatum</i>	0,342	0,342	2,807	0,536	12,810 ***	17,143 ***
<i>Fusarium solani</i>	3,793	18,033 ***	3,333	0,702	1,481	4,821 *
<i>Fusarium verticillioides</i>	-	-	-	6,316 *	-	1,008
<i>Fusicoccum quercus</i>	1,008	4,904 *	0,342	0,436	0,342	-
<i>Geotrichum candidum</i>	-	-	-	-	1,008	-
<i>Gliocladium catenulatum</i>	-	1,008	-	-	-	-
<i>Gliocladium roseum</i>	-	-	1,008	1,008	-	-
<i>Gloeosporium sp. 1</i>	4,138 *	-	-	5,217 *	-	-
<i>Gloeosporium sp. 2</i>	1,008	1,008	-	1,008	1,008	1,008
<i>Humicola dimorphospora</i>	-	-	-	1,008	-	-
<i>Microsphaeropsis sp.</i>	1,008	-	2,034	-	2,034	1,008
<i>Moniliella sp.</i>	1,008	1,008	-	-	-	-
<i>Mucor sp.</i>	8,107	3,077	5,217 *	2,034	2,143	1,034
<i>N. C. 1</i>	1,008	-	1,008	-	-	-
<i>Nectria sp.</i>	1,008	0,342	1,008	-	-	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	-	1,008	-	0,702	-
<i>Ophiostoma sp.</i>	1,008	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	-	1,008	-	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	0,926	67,699 ***	54,857 ***	4,658 *	0,048	1,915
<i>Pestalotia sp.</i>	1,008	-	-	-	-	-
<i>Phoma glomerata</i>	1,008	-	1,008	-	-	-
<i>Phomopsis oblonga</i>	-	-	-	1,008	0,342	-
<i>Phomopsis quercina</i>	3,077	3,003	-	0,152	1,081	4,138 *
<i>Pyrenochaeta sp.</i>	1,008	-	2,034	3,077	1,008	1,008
<i>Pythium intermedium</i>	-	5,217 *	1,008	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	1,008	-	4,138 *	2,034	0,342
<i>Scopulariopsis asperula</i>	0,120	5,551 *	0,208	0,209	0,702	3,333
<i>Sordaria fimicola</i>	-	-	-	-	2,034	-
<i>Sporothrix sp.</i>	2,034	-	2,034	1,008	4,138 *	1,008
<i>Trichoderma aureoviride</i>	-	2,034	0,100	-	-	-
<i>Trichoderma hamatum</i>	-	0,342	3,077	4,138 *	-	1,008
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,878	2,807	8,107 **	-	1,034	3,077
<i>Trichoderma koningii</i>	-	-	-	1,008	-	0,342
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	-	-	-	4,138 *	1,008	7,434 **
<i>Ulocladium botrytis</i>	-	1,008	-	4,138 *	0,209	3,077
<i>Zygorhynchus sp.</i>	-	4,138 *	1,008	1,008	-	-

N. c.: non classificato.

Tabella 9 – Valori di χ^2 per i confronti tra i momenti di raccolta (***: *altamente significativo*; **: *molto significativo*; *: *significativo*)

SPECIE FUNGINA	2005		2006	
	D1 - D6 - D12		D1 - D6 - D12	
	TERRA	RETE	TERRA	RETE
<i>Alternaria alternata</i>	0,536	1,784	3,732	0,253
<i>Alternaria infectoria</i>	2,011	2,880	2,517	1,356
<i>Ascochyta sp.</i>	-	-	2,011	-
<i>Aspergillus Sez. Niger</i>	2,034	1,011	5,349	5,349
<i>Beltrania sp.</i>	-	-	2,880	2,011
<i>Botrytis cinerea</i>	2,034	1,011	4,045	1,011
<i>Calcarisporium parasiticum</i>	-	-	-	2,011
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,166	13,333 **	0,775	2,607
<i>Cryphonectria parasitica</i>	-	2,011	-	-
<i>Cylindrocarpon sp.</i>	2,011	2,011	-	-
<i>Cytospora sp. 1</i>	-	2,011	1,034	2,880
<i>Cytospora sp. 2</i>	-	4,045	7,241 *	13,333 **
<i>Didymella sp.</i>	-	2,011	2,045	3,580
<i>Epicoccum nigrum</i>	7,165 *	7,241 *	0,104	4,971
<i>Epicoccum sp.</i>	1,482	2,011	3,401	1,831
<i>Fusarium sp. 1</i>	-	-	2,011	-
<i>Fusarium sp. 2</i>	-	-	2,011	-
<i>Fusarium graminearum</i>	0,511	9,123 **	3,580	1,646
<i>Fusarium lateritium</i>	-	-	4,045	-
<i>Fusarium proliferatum</i>	0,511	3,401	5,648	11,386 **
<i>Fusarium solani</i>	31,442 ***	4,807	2,105	4,027
<i>Fusarium verticillioides</i>	-	-	-	9,216 *
<i>Fusicoccum quercus</i>	0,511	12,975 **	2,156	2,753
<i>Geotrichum candidum</i>	-	-	-	2,011
<i>Gliocladium catenulatum</i>	2,011	-	-	-
<i>Gliocladium roseum</i>	2,011	-	2,011	-
<i>Gloeosporium sp. 1</i>	-	8,182 *	10,286 **	-
<i>Gloeosporium sp. 2</i>	2,011	2,011	-	-
<i>Humicola dimorphospora</i>	-	-	-	2,011
<i>Microsphaeropsis sp.</i>	4,045	2,011	2,034	-
<i>Moniliella sp.</i>	1,011	-	-	-
<i>Mucor sp.</i>	4,815	2,011	2,517	2,034
<i>N.C. 1</i>	-	1,011	-	-
<i>Nectria sp.</i>	2,034	1,011	-	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	1,011	2,034	5,349
<i>Ophiostoma sp.</i>	2,011	-	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	2,011	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	12,907 **	32,335 ***	1,905	2,566
<i>Pestalotia sp.</i>	2,011	-	-	-
<i>Phoma glomerata</i>	2,011	2,011	-	-
<i>Phomopsis oblonga</i>	-	-	1,011	0,511
<i>Phomopsis quercina</i>	2,045	3,750	0,194	6,316 *
<i>Pyrenochaeta sp.</i>	4,045	2,011	3,580	2,011
<i>Pythium intermedium</i>	7,241 *	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	2,011	-	1,047	2,011
<i>Scopulariopsis asperula</i>	6,480 *	4,838	0,212	8,125 **
<i>Sordaria fimicola</i>	-	-	4,045	-
<i>Sporothrix sp.</i>	2,045	-	2,011	5,349
<i>Trichoderma aureoviride</i>	5,648	12,414 **	-	-
<i>Trichoderma hamatum</i>	2,034	0,297	1,831	6,102 *
<i>Trichoderma harzianum</i>	3,648	-	2,011	3,103
<i>Trichoderma koningii</i>	-	-	4,045	1,011
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	-	-	5,349	14,566 ***
<i>Ulocladium botrytis</i>	2,011	-	2,880	3,865
<i>Zyghorhynchus sp.</i>	8,182 *	2,011	-	2,011

N. c.: Non classificato

Tabella 10 Valori di χ^2 per i confronti tra i tessuti di ghiande analizzate nel 2005.
 (***:altamente significativo; **: molto significativo; *: significativo)

SPECIE FUNGINA	2005					
	X - CNS - CS			X - CNS - CS		
	T D1	T D6	T D12	R D1	R D6	R D12
<i>Alternaria alternata</i>	8,571 *	2,105	5,673	7,778 *	4,205	2,105
<i>Alternaria infectoria</i>	-	2,034	-	6,316 *	-	1,034
<i>Ascochyta sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus Sez. Niger</i>	2,034	4,138	-	2,034	2,034	-
<i>Beltrania sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-	4,138	2,034	2,034	2,034	-
<i>Calcarisporium parasiticum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3,750	2,143	1,745	7,212 *	2,034	-
<i>Cryphonectria parasitica</i>	-	-	-	-	-	2,034
<i>Cylindrocarpon sp.</i>	-	2,034	-	-	2,034	-
<i>Cytospora sp. 1</i>	-	-	-	2,034	-	-
<i>Cytospora sp. 2</i>	-	-	-	-	4,138	-
<i>Didymella sp.</i>	-	-	-	-	2,034	-
<i>Epicoccum nigrum</i>	-	15,849 ***	3,750	10,909 **	2,034	-
<i>Epicoccum sp.</i>	6,316 *	10,909 **	4,138	2,034	-	-
<i>Fusarium sp. 1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium sp. 2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium graminearum</i>	2,034	2,034	1,034	15,849 ***	-	1,034
<i>Fusarium lateritium</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium proliferatum</i>	2,034	4,138	2,034	1,034	2,034	5,673
<i>Fusarium solani</i>	2,034	11,850 **	2,105	1,111	1,034	5,490
<i>Fusarium verticillioides</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Fusicoccum quercus</i>	2,034	4,138	2,034	-	10,196 **	1,034
<i>Geotrichum candidum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Gliocladium catenulatum</i>	-	2,034	-	-	-	-
<i>Gliocladium roseum</i>	-	-	2,034	-	-	-
<i>Gloeosporium sp. 1</i>	-	-	-	8,571 *	-	-
<i>Gloeosporium sp. 2</i>	2,034	-	-	-	2,034	-
<i>Hemicola dimorphospora</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Microsphaeropsis sp.</i>	-	-	4,138	2,034	-	-
<i>Moniliella sp.</i>	2,034	2,034	-	-	-	-
<i>Mucor sp.</i>	24,00 ***	6,316 *	10,909 **	2,034	-	-
<i>N. c. 1</i>	-	-	-	2,034	-	2,034
<i>Nectria sp.</i>	-	1,034	2,034	2,034	2,034	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	2,034	2,034	2,034	2,034	2,034	-
<i>Ophiostoma sp.</i>	2,034	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	2,034	2,034	-	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	29,048 ***	7,778 *	5,673	14,101 ***	10,196 **	13,333 **
<i>Pestalotia sp.</i>	2,034	-	-	-	-	-
<i>Phoma glomerata</i>	2,034	-	-	-	-	2,034
<i>Phomopsis oblonga</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis quercina</i>	-	4,138	4,138	2,105	5,175	1,034
<i>Pyrenochaeta sp.</i>	-	-	4,138	2,034	-	-
<i>Pythium intermedium</i>	-	5,673	2,034	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	2,034	-	-	-	-
<i>Scopulariopsis asperula</i>	3,750	15,516 ***	14,337 ***	1,745	2,143	20,260 ***
<i>Sordaria fimicola</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Sporothrix sp.</i>	4,138	-	4,138	-	-	-
<i>Trichoderma aureoviride</i>	-	4,138	10,909 **	-	-	7,778 *
<i>Trichoderma hamatum</i>	4,138	2,034	-	4,138	4,138	6,316 *
<i>Trichoderma harzianum</i>	8,571 *	10,909 **	24,000 ***	2,034	2,034	2,034
<i>Trichoderma koningii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Ulocladium botrytis</i>	-	2,034	-	-	-	-
<i>Zygorhynchus sp.</i>	-	8,571 *	-	-	-	2,034

N. c.: non classificato.

Tabella 11 Valori di χ^2 per i confronti tra i tessuti di ghiande analizzate nel 2006
 (***:altamente significativo; **: molto significativo; *: significativo)

SPECIE	2006					
	X - CNS - CS			X - CNS - CS		
	T D1	T D6	T D12	R D1	R D6	R D12
<i>Alternaria alternata</i>	6,902 *	6,190 *	3,840	0,533	3,732	1,375
<i>Alternaria infectoria</i>	1,034	6,316 *	3,333	1,745	1,034	2,143
<i>Ascochyta sp.</i>	-	2,034	-	-	-	-
<i>Aspergillus Sez. Niger</i>	-	2,034	8,571 *	-	2,034	3,750
<i>Beltrania sp.</i>	1,034	-	2,105	-	-	2,034
<i>Botrytis cinerea</i>	1,034	-	-	2,034	-	2,034
<i>Calcarisporium parasiticum</i>	-	-	-	2,034	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2,105	2,105	0,436	2,105	12,404 **	5,673
<i>Cryphonectria parasitica</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Cylindrocarpon sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Cytospora sp. 1</i>	2,105	1,034	2,034	6,316 *	4,138	-
<i>Cytospora sp. 2</i>	1,745	2,034	-	12,404 **	2,034	-
<i>Didymella sp.</i>	1,034	1,034	-	-	2,105	2,034
<i>Epicoccum nigrum</i>	4,205	2,264	8,077 *	2,105	5,673	-
<i>Epicoccum sp.</i>	3,055	4,138	2,034	3,750	2,105	2,034
<i>Fusarium sp. 1</i>	-	2,034	-	-	-	-
<i>Fusarium sp. 2</i>	-	2,034	-	-	-	-
<i>Fusarium graminearum</i>	-	2,105	2,034	2,034	6,316 *	2,034
<i>Fusarium lateritium</i>	-	1,034	-	-	-	-
<i>Fusarium proliferatum</i>	5,673	1,034	-	-	6,307 *	6,400 *
<i>Fusarium solani</i>	0,536	3,75	2,034	1,034	0,288	0,323
<i>Fusarium verticillioides</i>	-	-	-	4,444	-	2,034
<i>Fusicoccum quercus</i>	1,111	1,034	0,436	2,143	2,034	3,055
<i>Geotrichum candidum</i>	-	-	-	-	2,034	-
<i>Gliocladium catenulatum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Gliocladium roseum</i>	2,034	-	-	-	-	-
<i>Gloeosporium sp. 1</i>	0,436	-	-	-	-	-
<i>Gloeosporium sp. 2</i>	2,034	2,034	2,034	-	-	-
<i>Hemicola dimorphospora</i>	-	-	-	2,034	-	-
<i>Microsphaeropsis sp.</i>	-	4,138	2,034	-	-	-
<i>Moniliella sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Mucor sp.</i>	1,034	4,444	6,316 *	-	1,034	2,034
<i>N.C. 1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Nectria sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	2,034	1,034	-	2,034	8,571 *	-
<i>Ophiostoma sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	2,353	14,337 ***	8,533 *	11,245 **	6,894 *	13,923 ***
<i>Pestalotia sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Phoma glomerata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis oblonga</i>	-	2,034	2,034	2,034	1,034	2,034
<i>Phomopsis quercina</i>	2,143	2,105	2,143	2,105	3,333	-
<i>Pyrenochaeta sp.</i>	6,316 *	-	2,034	-	2,034	-
<i>Pythium intermedium</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	2,143	1,034	1,034	-	-	2,034
<i>Scopulariopsis asperula</i>	2,105	0,536	2,105	4,138	4,138	3,137
<i>Sordaria fimicola</i>	-	4,138	-	-	-	-
<i>Sporothrix sp.</i>	2,034	-	-	-	2,143	2,034
<i>Trichoderma aureoviride</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma hamatum</i>	8,571 *	6,316 *	2,034	-	2,105	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	2,034	-	-	2,105	2,105
<i>Trichoderma koningii</i>	-	-	4,138	2,034	-	2,034
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	3,750	2,034	-	-	-	4,205
<i>Ulocladium botrytis</i>	-	1,034	2,105	3,750	2,105	-
<i>Zyghorhynchus sp.</i>	-	-	-	2,034	-	-

Di seguito, vengono descritti i dati raccolti per specie fungine isolate dalle ghiande che risultano, da indagini bibliografiche, coinvolte nel deperimento della quercia. Inoltre, si considerano i microrganismi fungini che presentano frequenze di isolamento rilevanti, e che sono comunque presenti anche dagli isolamenti effettuati sui tessuti cotiledonali.

Nelle *figure 13 e 14* si riportano i dati relativi all'isolato fungino *A. alternata*. Ad una prima analisi, questa specie risulta maggiormente presente nel secondo anno di sperimentazione, con andamento discontinuo osservato tra le due modalità di raccolta ed il prolungarsi del periodo di permanenza a terra o su rete. Ciò nonostante, gli esiti statistici non confermano reali differenze tra le due tipologie di raccolta, e neppure nel tempo. In particolare (*Fig 13*), si osserva che *A. alternata* è sempre presente sul tessuto pericarpale del seme con frequenze superiori a quelle che si riscontrano per i cotiledoni, nel corso di entrambe le prove condotte. Nei tessuti cotiledonali, la presenza del fungo varia da frequenze di isolamento del 15% e del 30% con andamenti eterogenei, che mostrano differenze statisticamente significative solo tra le più elevate frequenze di isolamento rilevate su pericarpo rispetto ai tessuti cotiledonali nell'ambito delle raccolte da terra e da rete nel primo giorno e tra il primo ed il sesto per i semi raccolti da terra (*Fig. 14*).

La specie *Cladosporium cladosporioides* presenta diverse frequenze di isolamento statisticamente molto significative tra il primo giorno di permanenza delle ghiande su rete, in cui il valore raggiunge il 13%, il sesto ed il dodicesimo giorno, solo nel contesto del primo anno di lavoro. Per i dati del secondo anno non sono state verificate differenze statistiche. Inoltre, risulta significativo il confronto fra il dodicesimo giorno di permanenza delle ghiande su terra, che presenta una frequenza di isolamento di *C. cladosporioides* poco superiore all'8%, e su rete da cui non è stato isolato il fungo in esame (*Fig. 15*). In particolare, analizzando la presenza della specie fungina sul pericarpo e sui cotiledoni del seme, si evidenziano due casi in cui le differenze risultano significative: nella raccolta da rete al primo giorno nella prima prova, dove la frequenza su pericarpo raggiunge il 30% contro il 5% sui cotiledoni, e nella raccolta da rete dopo 6 giorni di permanenza, in cui la frequenza di isolamento su pericarpo è del 35% (*Fig. 16*).

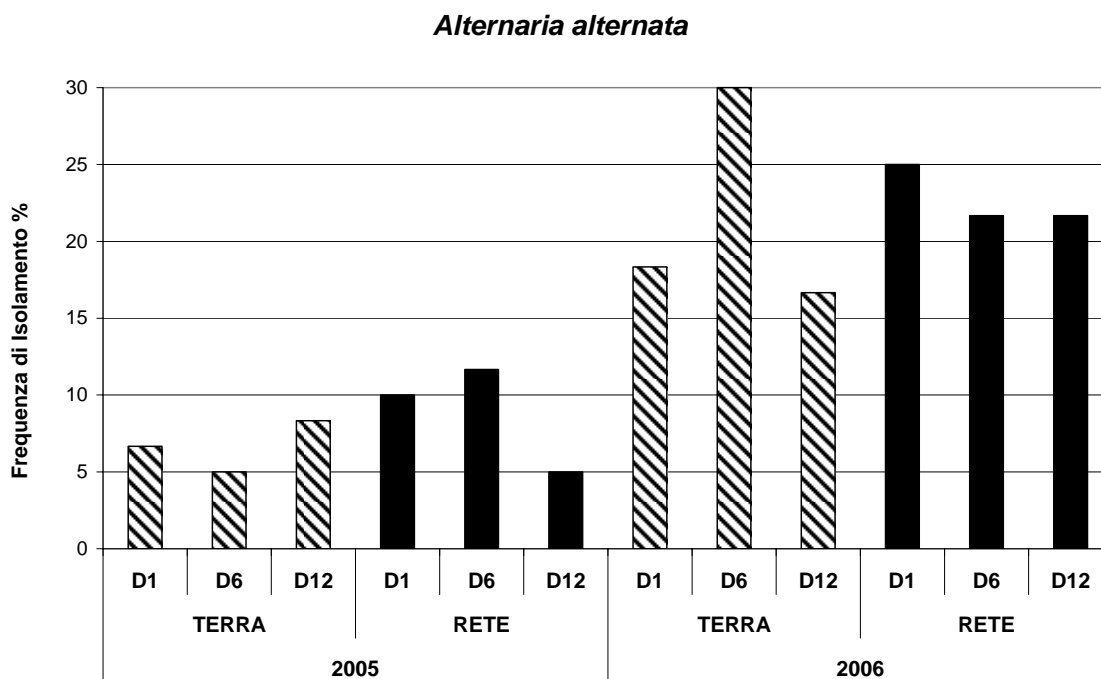


Figura 13 – Frequenze di isolamento di *A. alternata* da ghiande mature (nero: rete; righe: terra; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo).

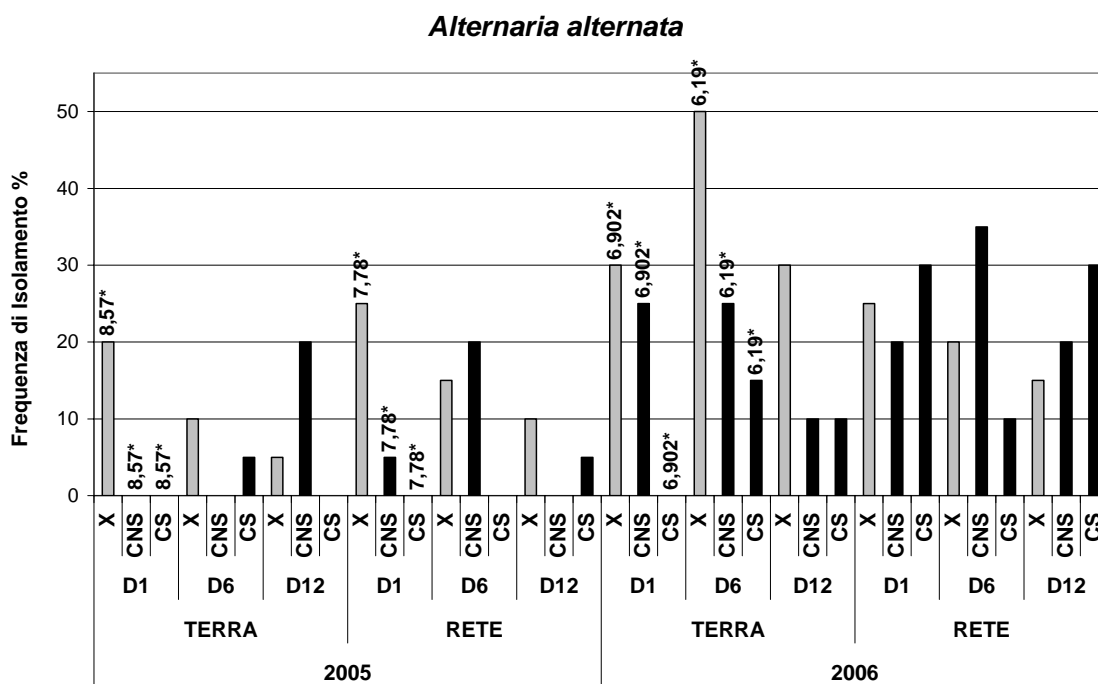


Figura 14 – Frequenza di isolamento di *A. alternaria* da tessuti interni ed esterni di ghianda (nero: cotiledoni; grigio: pericarpo; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo).

Cladosporium cladosporioides

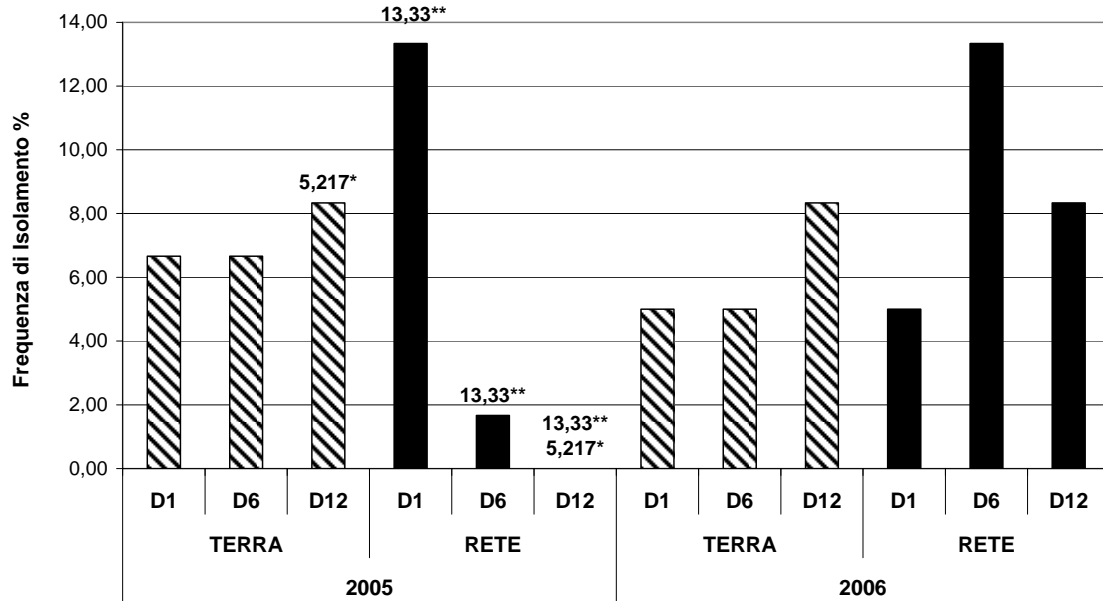


Figura 15 – Frequenze di isolamento di *C. cladosporioides* da ghiande mature (nero: rete; righe: terra; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo).

Cladosporium cladosporioides

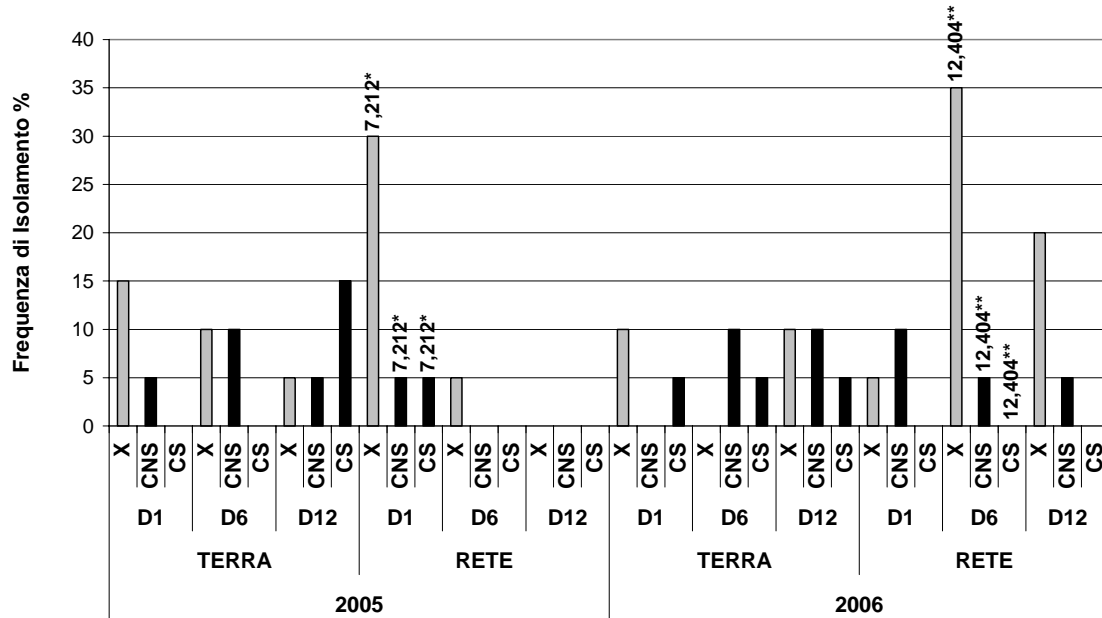


Figura 16 – Frequenza di isolamento di *C. cladosporioides* da tessuti interni ed esterni di ghianda (nero: cotiledoni; grigio: pericarpo; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo)

Epicoccum nigrum

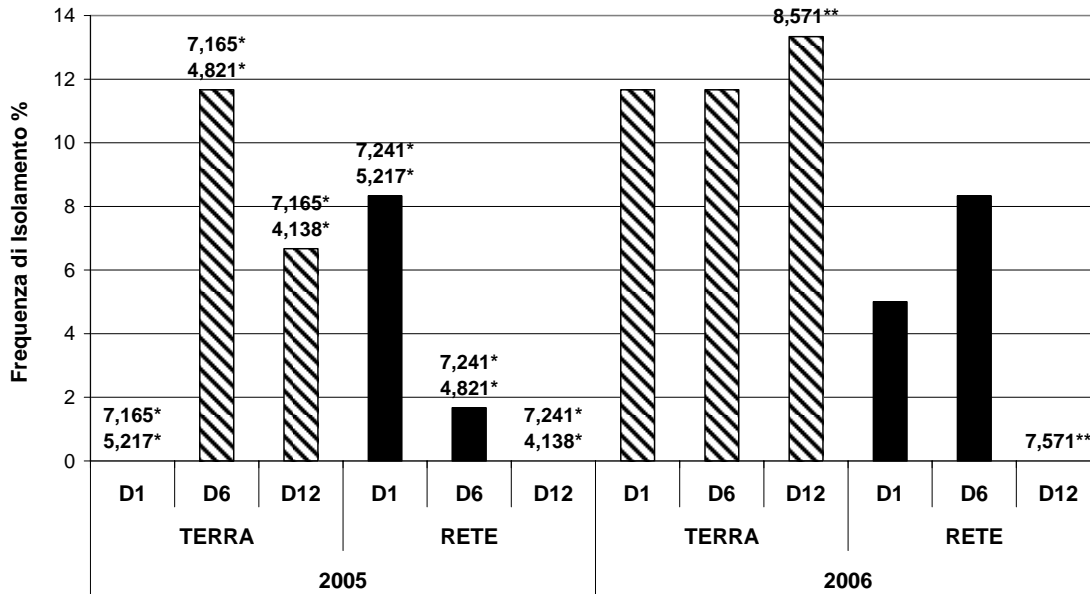


Figura 17 – Frequenze di isolamento di *E. nigrum* da ghiande mature (nero: rete; righe: terra; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo).

Epicoccum nigrum

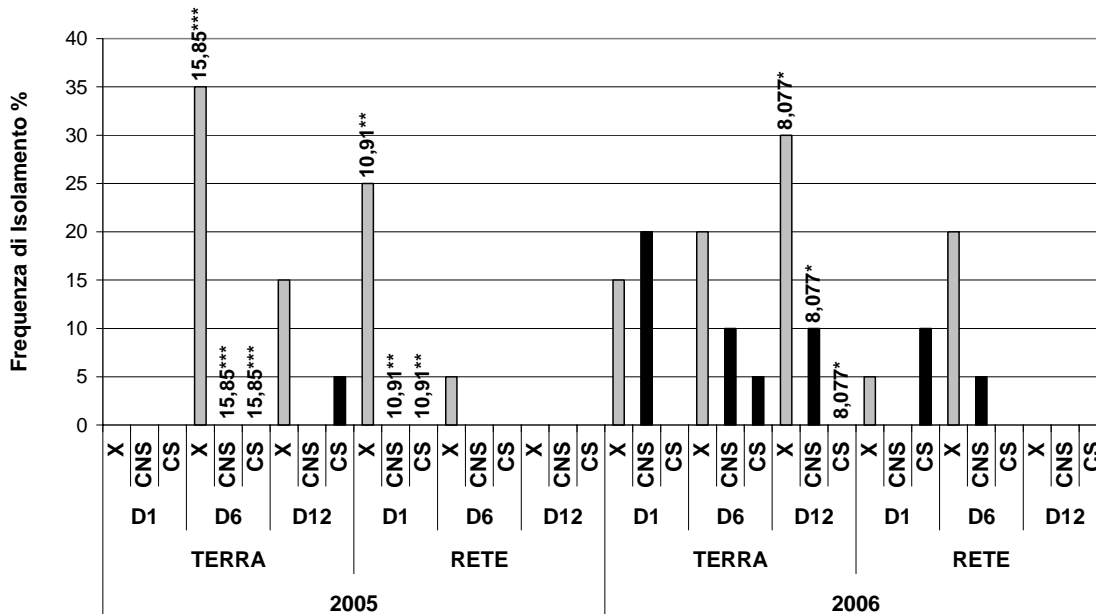


Figura 18 – Frequenza di isolamento di *E. nigrum* da tessuti interni ed esterni di ghianda (nero: cotiledoni; grigio: pericarpo; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo)

Epicoccum nigrum presenta frequenze di isolamento massime del 12-13% in entrambe le prove condotte, su ghiande che provengono dal terreno, e isolamenti numericamente inferiori per quanto riguarda le ghiande da rete. Nel confronto fra raccolta da terra e da rete si riscontra una differenza sulla quantità di inoculo presente nell'ambito del primo giorno, per cui assente da terra e presente su rete con frequenza dell'8%. Differenze significative si riscontrano anche nei successivi intervalli di tempo, con andamenti contrari rispetto al precedente: risulta infatti sempre maggiore l'inoculo fungino presente su ghiande che hanno avuto contatto con il terreno. Nel corso della seconda sperimentazione il solo dato significativo è relativo al numero di isolamenti ottenuti da semi provenienti da terra e da rete dopo il dodicesimo giorno dalla disseminazione (Fig. 17). Analizzando i dati relativi ai tessuti del seme si riscontrano alcune frequenze discontinue per le due annate di prova. La percentuale di inoculo ottenuta da terra dopo 6 giorni e da rete dopo un giorno è costituita esclusivamente dalla quota di inoculo presente sulla parte esterna delle ghiande. Su semi di terra al dodicesimo giorno la presenza di inoculo di *E. nigrum* si riscontra sia su pericarpo, sia nei tessuti cotiledonali, con frequenze del 30% nel primo caso e del 10% nel secondo (Fig. 18).

Nell'ambito del genere *Fusarium*, sono state isolate quattro specie principali: *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. solani* e *F. proliferatum*, tra le quali le ultime due presentano maggiori frequenze di isolamento totali.

F. solani (Fig. 19) è stato rilevato da tutti i blocchi di prova con frequenza discontinue. Apparentemente, sembra essere maggiormente presente nelle ghiande di rete, anche se si evidenzia un valore elevato nella raccolta di terra dopo 6 giorni di permanenza altamente significativo nei confronti del relativo valore di rete. La maggior quantità di inoculo su seme di rete è comprovata dall'analisi statistica dei dati solo nel confronto fra ghiande raccolte dopo 12 giorni dalla abscissione, e nel complesso della seconda prova non sembrano esserci differenze fondamentali. In relazione ai tessuti colonizzati, *F. solani* è sempre presente nella parte esterna e, non in tutti i casi, lo si rileva anche nei cotiledoni con frequenze comprese tra il 5% ed il 20%. Valori massimi del 40% e del 55% si riscontrano in corrispondenza delle raccolte da rete dopo 6 giorni (2005). Nel complesso, tuttavia, non

si evidenziano differenze significative tra la quantità di inoculo del pericarpo e nei cotiledoni (Fig. 20).

Per la specie *Fusarium proliferatum* si riscontrano alte percentuali di isolamento da ghiande raccolte da rete (circa il 25%) dopo 6 e 12 giorni di permanenza, con livelli altamente significativi paragonabili alle più basse frequenze relative alle corrispondenti raccolte da terra, nel corso della prova condotta nel 2006 (Fig. 21). Nel pericarpo rivela una presenza discontinua, come per i tessuti interni, con valori concentrati nelle ghiande raccolte da rete dopo 6 e dopo 12 giorni dalla disseminazione naturale. In questi casi la quota di inoculo presente esternamente al seme è più elevata rispetto alle quote interne (Fig. 22).

Fusicoccum quercus è stato spesso isolato, con frequenze che variano dal 2% circa fino al 15% nell'ambito di ogni situazione. La Fig. 23 mostra una differenza significativa tra la presenza del fungo su ghiande cadute da 6 giorni su rete o su terra, ed una altamente significativa tra i tre momenti della raccolta da rete, nel contesto della prima sperimentazione. Si può notare, inoltre, come il variare della quantità di inoculo fungino non segua un andamento costante tra le quattro diverse situazioni, e come le significatività rilevate nel primo anno non siano confermate anche dai dati ottenuti nel secondo. Le frequenze relative alla distribuzione del fungo sui tessuti interni ed esterni variano dal 5% al 15%, con un massimo molto significativo per il pericarpo di ghiande raccolte da rete dopo 6 giorni, rispetto alla presenza nei cotiledoni. Infine, i diversi intervalli di permanenza sul terreno o sulla rete e le due rispettive modalità di raccolta, in generale, sembrano non influire sulla presenza di *F. quercus* (Fig. 24).

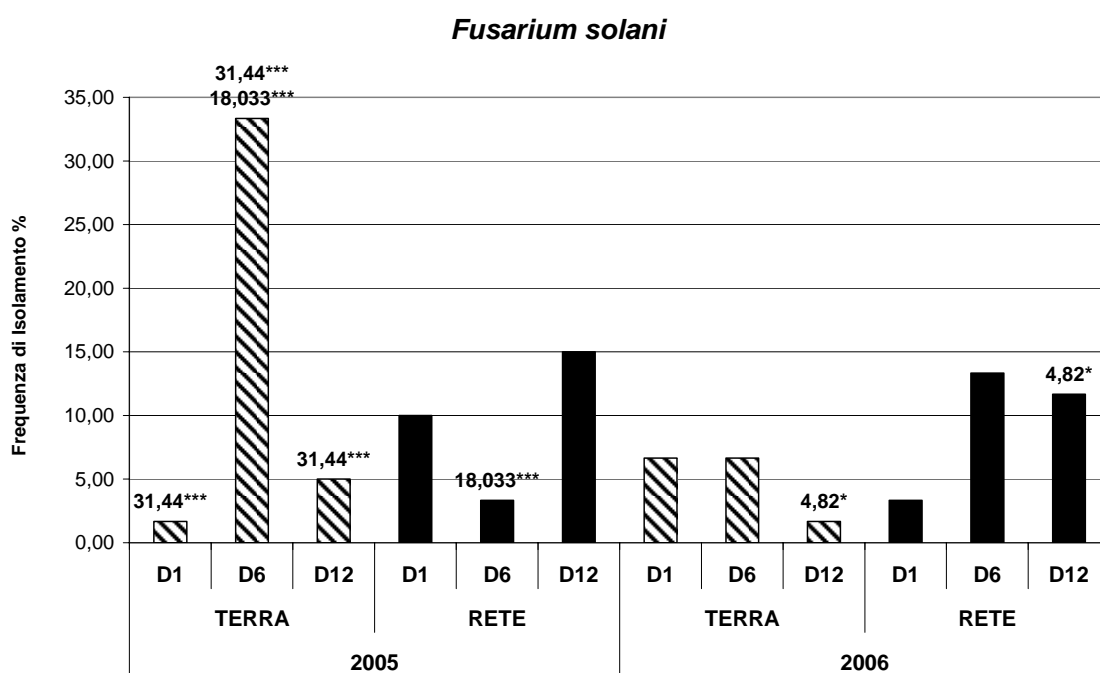


Figura 19 – Frequenze di isolamento di *F. solani* da ghiande mature (nero: rete; righe: terra; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo).

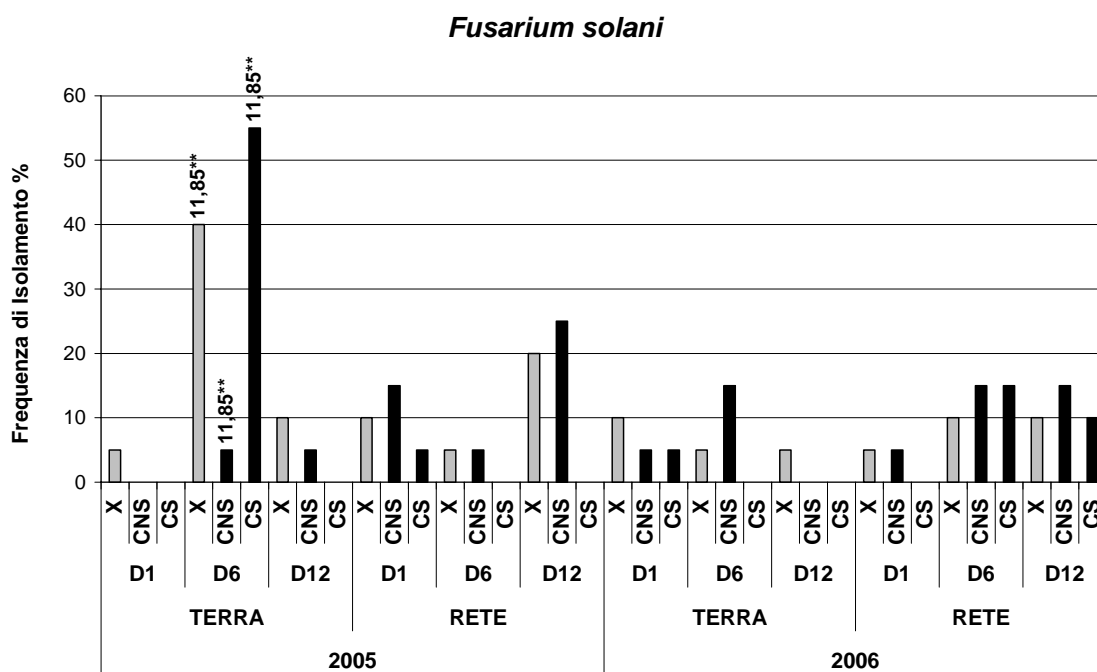


Figura 20 – Frequenza di isolamento di *F. solani* da tessuti interni ed esterni di ghianda (nero: cotiledoni; grigio: pericarpo; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo)

Fusarium proliferatum

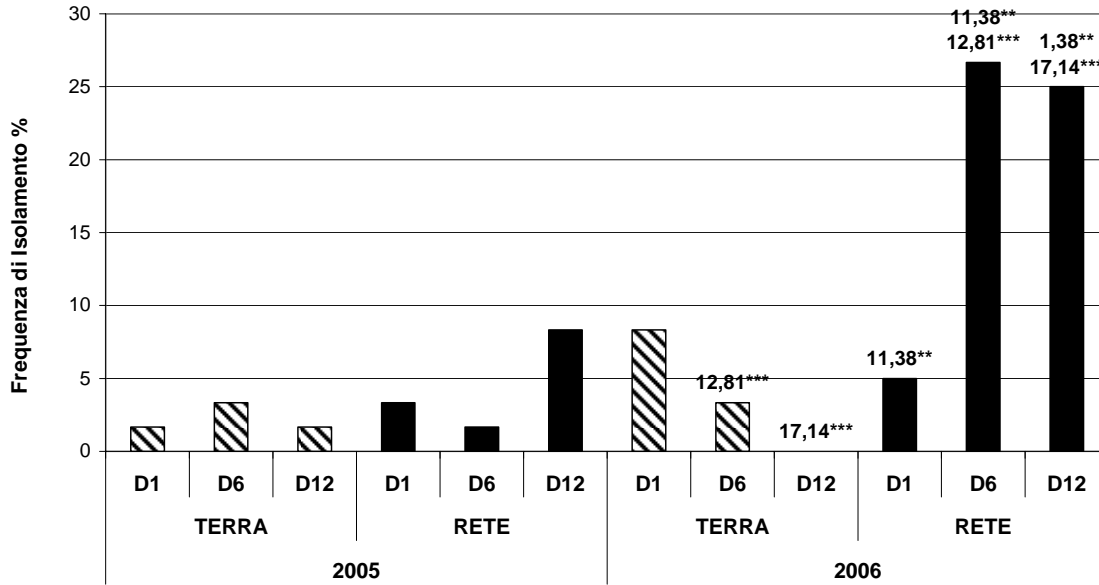


Figura 21 – Frequenze di isolamento di *F. proliferatum* da ghiande mature (nero: rete; righe: terra; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo).

Fusarium proliferatum

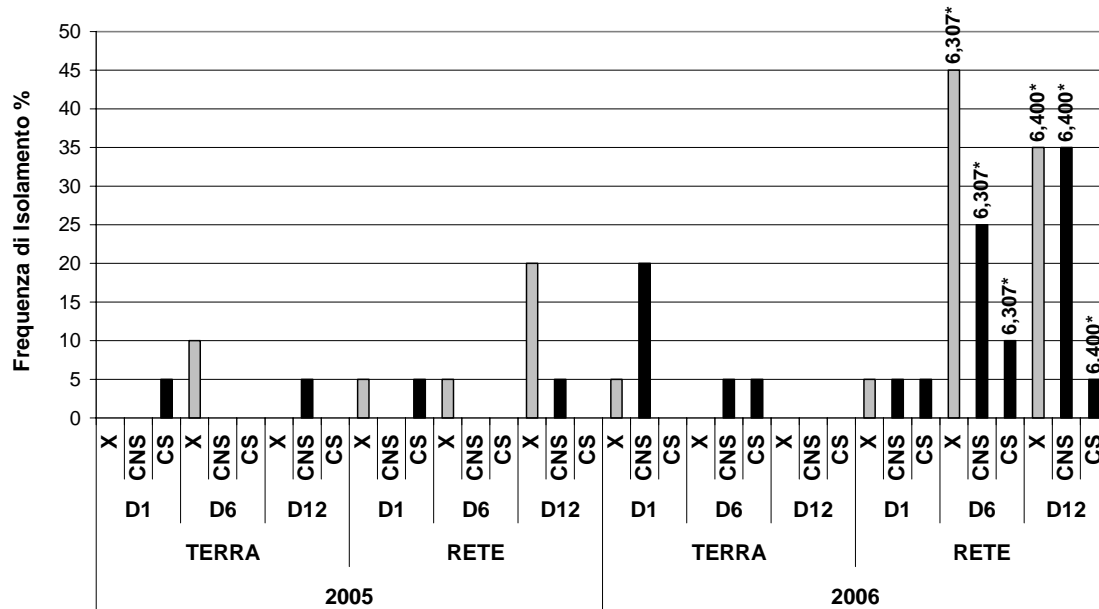


Figura 22 – Frequenza di isolamento di *F. proliferatum* da tessuti interni ed esterni di ghianda (nero: cotiledoni; grigio: pericarpo; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo)

Fusicoccum quercus

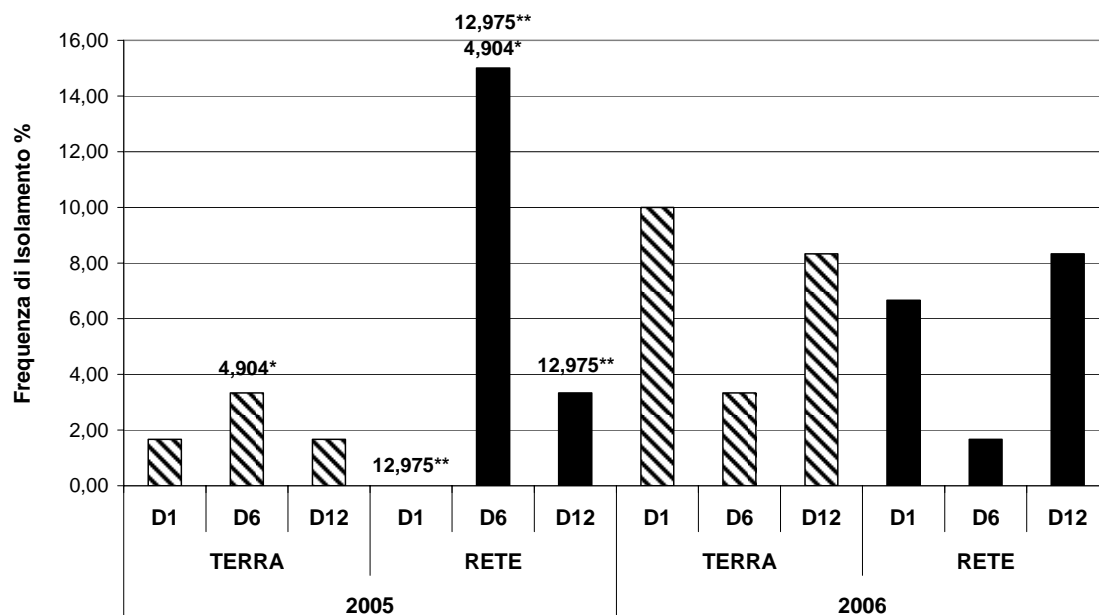


Figura 23 – Frequenze di isolamento di *F. quercus* da ghiande mature (nero: rete; righe: terra; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo).

Fusicoccum quercus

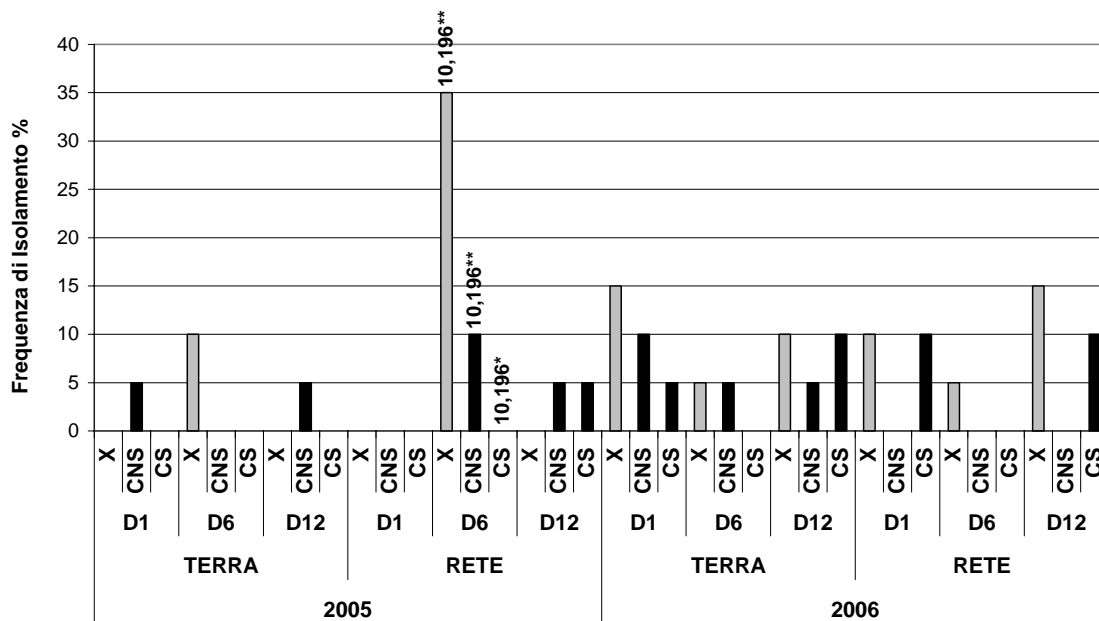


Figura 24 – Frequenza di isolamento di *F. quercus* da tessuti interni ed esterni di ghianda (nero: cotiledoni; grigio: pericarpo; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo)

Phomopsis quercina

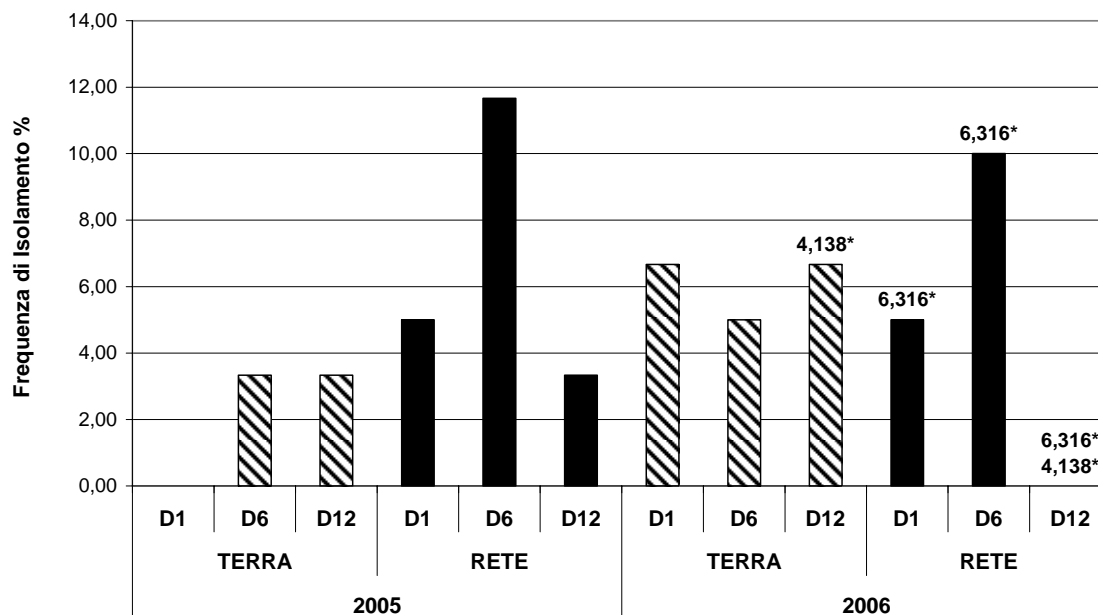


Figura 25 – Frequenze di isolamento di *P. quercina* da ghiande mature (nero: rete; righe: terra; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo).

Phomopsis quercina

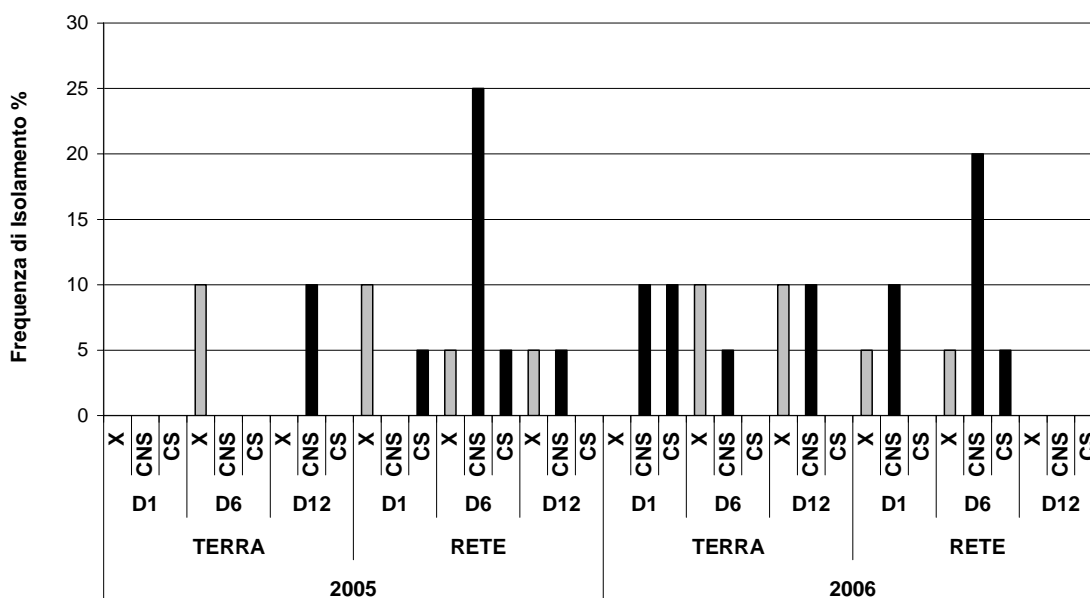


Figura 26 – Frequenza di isolamento di *P. quercina* da tessuti interni ed esterni di ghianda (nero: cotiledoni; grigio: pericarpo; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo)

La specie *Phomopsis quercina* è presente in tutti i gruppi di raccolta delle due annate, con frequenze di isolamento variabili dal 3,5% al 12%. Dai dati raccolti nel 2005 e analizzati non risultano differenze significative tra le modalità di raccolta e gli intervalli di tempo considerati. Per quanto riguarda il 2006, invece si riscontra una maggior presenza del fungo nelle ghiande raccolte da terra e da rete dopo il 12° giorno di permanenza, sebbene su terra sia presente con una bassa frequenza di isolamento (6%). Inoltre, non si riscontra un andamento costante nella quantità di inoculo nel tempo, con differenze significative solo nel confronto all'interno dei gruppi di rete, dovuto tuttavia alla completa assenza dopo il 12° giorno (*Fig. 25*). Si riportano, poi, i dati relativi alla distribuzione della specie nei tessuti del seme (*Fig. 26*) ed è possibile notare che, dall'analisi statistica, non si riscontrano differenze significative tra le combinazioni osservate.

Scopulariopsis asperula risulta tra le specie più frequenti, soprattutto nell'ambito della prima prova condotta. E' un fungo rilevato sia su terra che su rete per ciascuno dei tre intervalli di tempo considerati per le raccolte. Significativa risulta la differenza tra una raccolta da rete dopo 6 giorni rispetto alla relativa raccolta da terra. Nel caso delle ghiande cadute a terra nel 2005 e quelle cadute su rete nel 2006, si riscontrano minori frequenze di isolamento dopo un solo giorno di permanenza. Frequenze di isolamento relativamente elevate si hanno dopo 6 e 12 giorni da terra (più del 20%) e si calcola una differenza statistica molto significativa per i dati relativi alle ghiande raccolte da rete nel 2006, con un 15% al dodicesimo giorno nettamente superiore al 3% relativo al primo ed al sesto giorno (*Fig. 27*).

In dettaglio, frequenze di isolamento molto elevate si hanno dai dati rilevati dai tessuti cotiledonali, con differenze all'interno di una stessa modalità di raccolta altamente significative tra pericarpo e cotiledoni (*Fig. 28*).

Scopulariopsis asperula

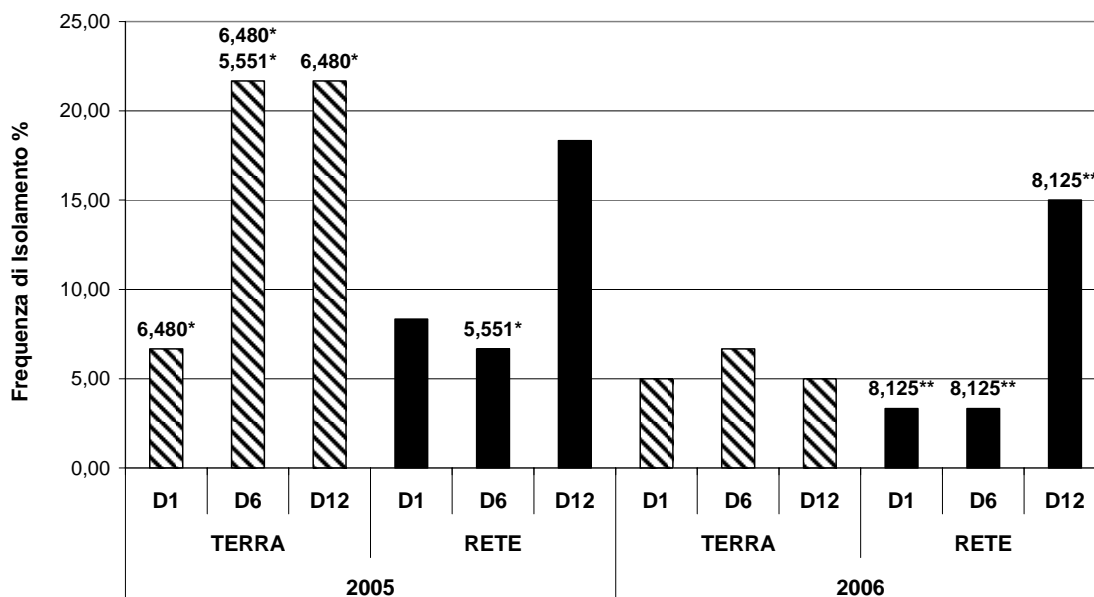


Figura 27 – Frequenze di isolamento di *S. asperula* da ghiande mature (nero: rete; righe: terra; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo).

Scopulariopsis asperula

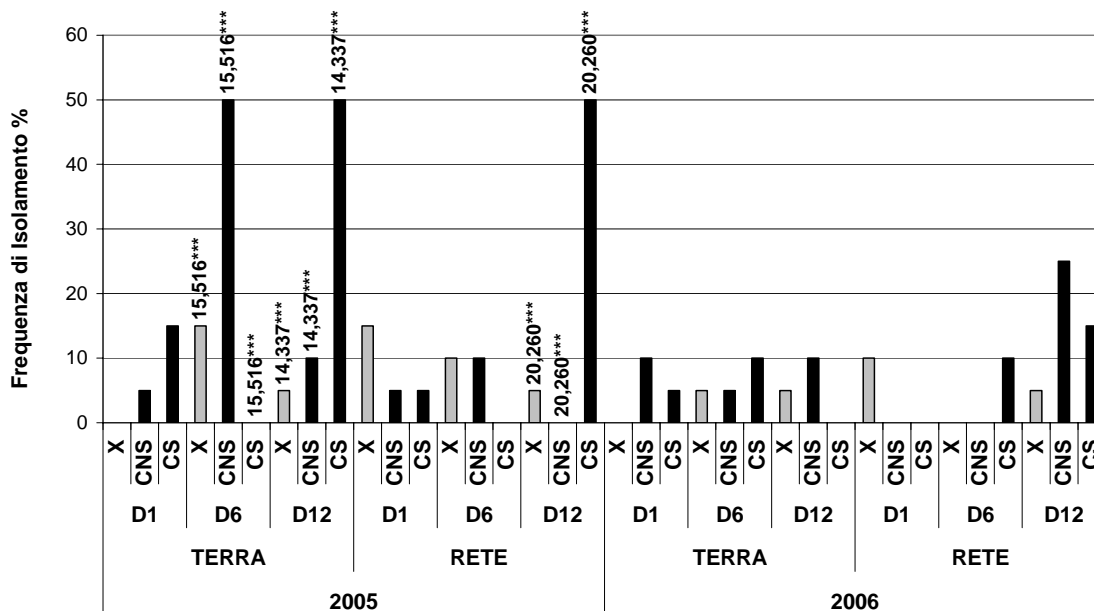


Figura 28 – Frequenza di isolamento di *S. asperula* da tessuti interni ed esterni di ghianda (nero: cotiledoni; grigio: pericarpo; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo)

E' stato verificato se alcune specie fungine risultassero presenti esclusivamente sul pericarpo o solamente nei tessuti interni alle ghiande, indistintamente dalla modalità di raccolta e dai tempi di permanenza. Tra tutti i generi solo uno, *Sporothrix* sp., è presente esclusivamente nei cotiledoni, trattati o non trattati, nel corso della ricerca di entrambi le annate. Le frequenze di isolamento risultano variare tra il 5% ed il 10%, tuttavia, non risultano differenze significative tra le diverse situazioni (Fig. 29).

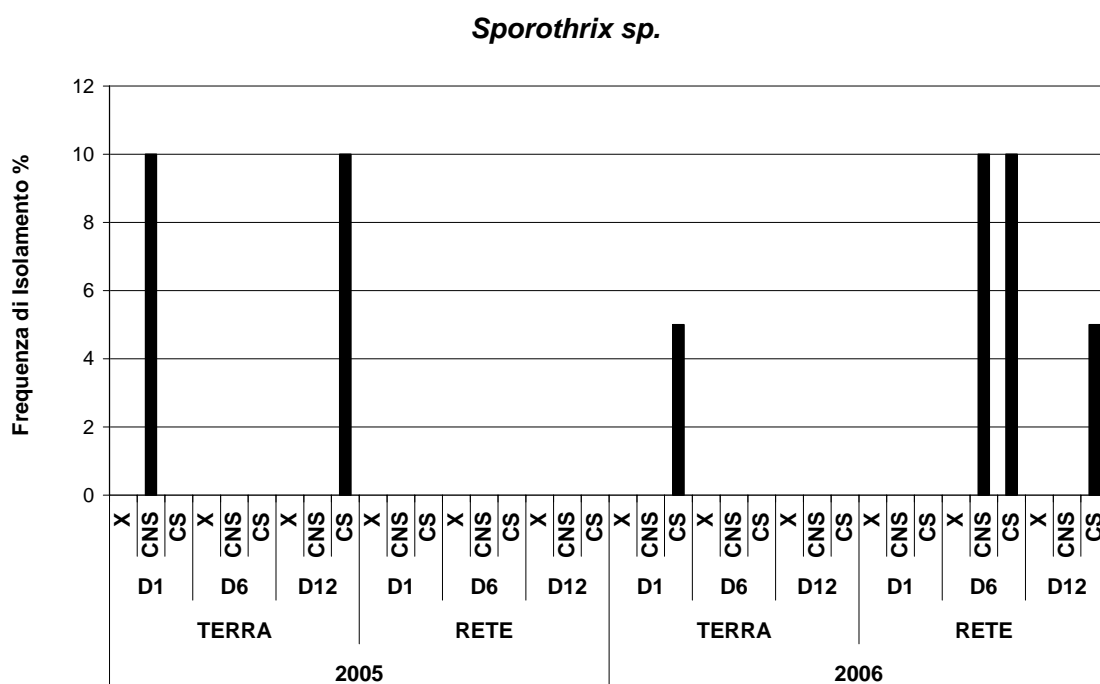


Figura 29 – Frequenza di isolamento di *Sporothrix* sp. da tessuti interni ed esterni di ghianda. (nero: cotiledoni; grigio: pericarpo; *: significativo; **molto significativo; *** altamente significativo)

2. Semenzali

Dai tessuti dei semenzali ottenuti dalla ghiande raccolte, seminate ed allevate, sono stati isolati complessivamente 43 generi fungini, riportati in *tabella 12* con riferimento alle loro frequenze di isolamento totali rilevate nei semenzali ottenuti da semi raccolti da terra e da rete. Nella *figura 30* si evidenzia un primo gruppo fungino caratterizzato da elevate frequenze di isolamento tra cui, il maggiormente rappresentato è il genere *Fusarium* con frequenze del 26% per semenzali originati da ghiande raccolte da rete e del 14% nel caso della raccolta da terra, seguito da *Penicillium* sp., isolato con frequenze comprese tra il 10% ed il 14% e *Trichoderma* sp., con il 10% ed il 6% per le rispettive situazioni. In ciascun caso, le frequenze di isolamento risultano maggiori nei semenzali ottenuti dalla semina di ghiande provenienti da rete (*Tab. 12, Fig. 30*).

Un secondo gruppo di generi fungini presenta frequenze più ridotte, comprese tra il 2% ed il 4%, come nel caso di *Rhizoctonia* sp. (presente esclusivamente su semenzali da terra), *Eurotium* sp. e *Alternaria* sp., *Humicola* sp., *Codinea* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp. e *Acremonium* sp. solo per semenzali “da terra”.

Un ultimo gruppo, caratterizzato da una maggiore numerosità di generi fungini, presenta frequenze di isolamento non superiori al 2%, nel quale risultano tra gli altri *Gliocladium* sp., *Fusicoccum* sp., *Mucor* sp., *Ulocladium* sp., *Eupenicillium* sp., *Discula* sp. e *Botrytis* sp. (*Tab. 12, Fig. 30*).

Tabella 12. – Frequenze di isolamento relative ai generi isolati da semenzali di farnia.

	Semenzali da terra	Semenzali da rete
Generi fungini	F. I. %	F. I. %
<i>Acremonium spp.</i>	2,86	1,11
<i>Alternaria spp.</i>	2,14	4,37
<i>Aspergillus spp.</i>	3,02	0,08
<i>Basidiomicete</i>	0,32	0,08
<i>Beltrania spp.</i>	0,16	-
<i>Byssochlamys spp.</i>	0,16	0,63
<i>Botrytis spp.</i>	1,59	0,08
<i>N.c. spp. 1</i>	0,71	0,79
<i>Cladosporium spp.</i>	2,38	0,87
<i>Codinea spp.</i>	2,30	0,24
<i>Geniculosporium spp.</i>	-	0,56
<i>Dydimella spp.</i>	0,24	0,32
<i>Discula spp.</i>	0,24	0,79
<i>Epicoccum spp.</i>	0,24	0,24
<i>Eupenicillium spp.</i>	0,08	1,43
<i>Eurotium spp.</i>	2,46	2,94
<i>Fusarium spp.</i>	14,29	26,11
<i>Fusicoccum spp.</i>	1,27	1,75
<i>Gliocladium spp.</i>	0,95	0,79
<i>Monacrosporium spp.</i>	0,16	-
<i>Humicola spp.</i>	3,25	1,27
<i>Microsphaeropsis spp.</i>	0,24	0,32
<i>Moniliella spp.</i>	0,08	0,48
<i>Mucor spp.</i>	1,67	0,08
<i>Paecilomyces spp.</i>	-	0,32
<i>Penicillium spp.</i>	9,76	13,17
<i>Phialophora spp.</i>	0,32	0,16
<i>Phoma spp.</i>	0,24	0,24
<i>Phomopsis spp.</i>	0,56	0,16
<i>Pyrenochaeta spp.</i>	2,30	0,71
<i>Pythium spp.</i>	-	0,08
<i>Ramichloridium spp.</i>	0,24	-
<i>Rhinocladiella spp.</i>	0,63	-
<i>Rhizoctonia spp.</i>	3,81	-
<i>Scopulariopsis spp.</i>	1,59	2,38
<i>Ophiostoma spp.</i>	2,06	0,71
<i>Sporothrix spp.</i>	0,16	1,51
<i>Trichocladium spp.</i>	-	0,08
<i>Trichoderma spp.</i>	5,79	10,56
<i>Tritirachium spp.</i>	-	0,08
<i>Ulocladium spp.</i>	0,95	1,43
<i>Zyghorhynchus spp.</i>	0,56	-

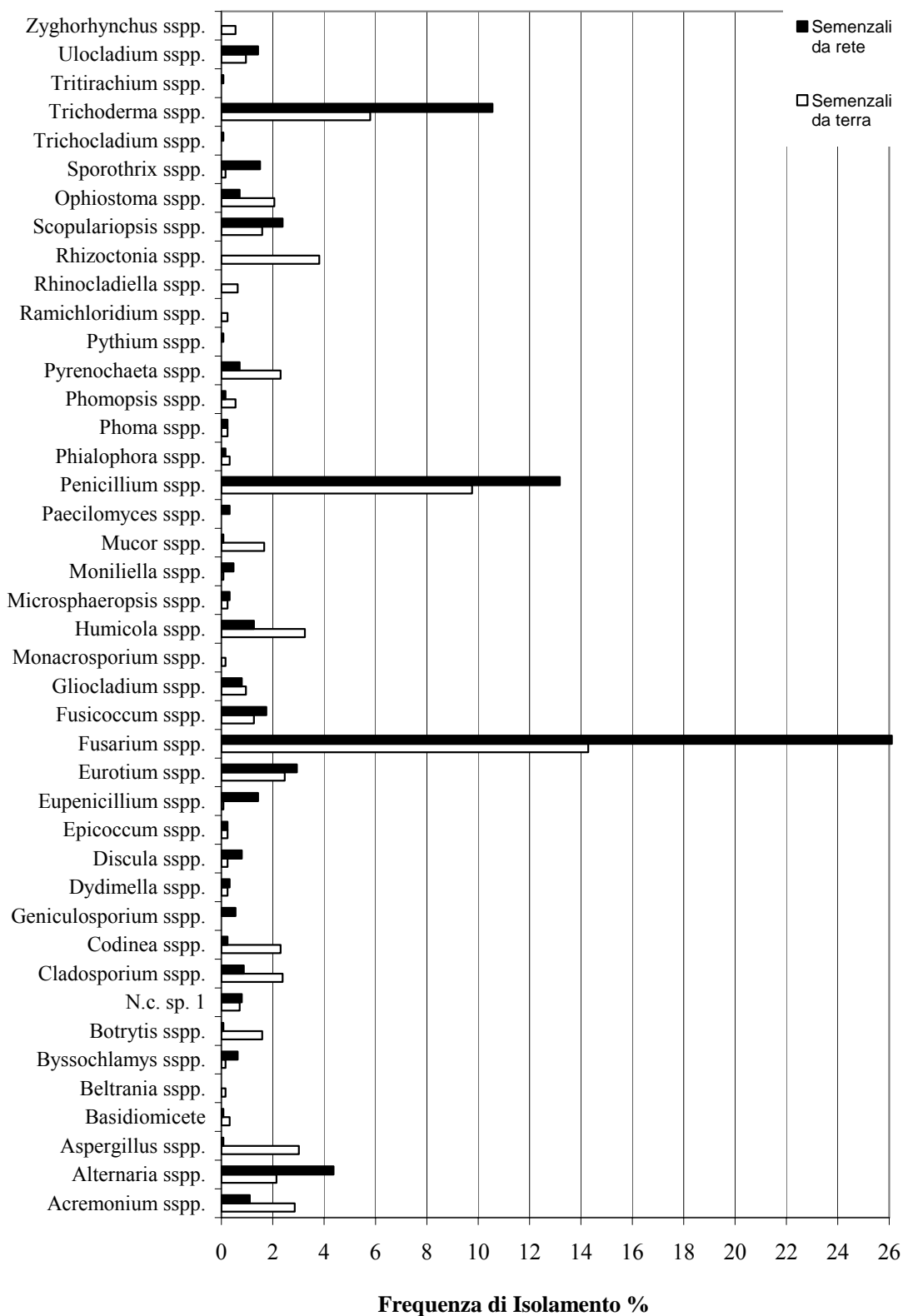


Figura 30. Distribuzione delle frequenze di isolamento relative ai generi fungini presenti in semenzali di *Q. robur*.

Tabella 13 – Frequenze Relative delle specie fungine su semenzali.

Specie Fungina	FOGLIE	FUSTO	RADICI	Totali
	F. R. %	F. R. %	F. R. %	F. R. %
<i>Acremonium sp.</i>	0,81	0,60	1,30	2,71
<i>Alternaria alternata</i>	1,24	2,27	0,81	4,33
<i>Alternaria infectoria</i>	0,05	0,05	-	0,11
<i>Aspergillus Sez. Niger</i>	0,60	-	-	0,60
<i>Aspergillus Sez. Flavi</i>	1,30	-	0,22	1,52
<i>Beltrania sp.</i>	-	-	0,11	0,11
<i>Byssochlamys nivea</i>	0,32	0,11	0,11	0,54
<i>Botrytis cinerea</i>	0,81	0,11	0,22	1,14
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,62	0,27	0,32	2,22
<i>Codinea sp.</i>	0,11	0,65	0,97	1,73
<i>Geniculosporium sp.</i>	-	0,05	0,32	0,38
<i>Dydimella sp.</i>	-	0,22	0,16	0,38
<i>Discula quercina</i>	-	0,54	0,16	0,70
<i>Epicoccum nigrum</i>	0,11	0,00	0,22	0,32
<i>Eupenicillium sp.</i>	0,16	0,27	0,60	1,03
<i>Eurotium sp. Sez. Glaucus</i>	1,24	0,11	2,33	3,68
<i>Fusarium sp. 1</i>	0,38	0,32	0,65	1,35
<i>Fusarium graminearum</i>	-	-	0,16	0,16
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,32	0,60	2,87	3,79
<i>Fusarium proliferatum</i>	0,49	0,92	3,25	4,65
<i>Fusarium solani</i>	1,30	1,68	4,65	7,63
<i>Fusarium verticillioides</i>	2,60	2,22	5,14	9,96
<i>Fusicoccum quercus</i>	0,81	0,43	0,81	2,06
<i>Gliocladium catenulatum</i>	-	-	0,22	0,22
<i>Gliocladium roseum</i>	-	0,11	0,87	0,97
<i>Monacrosporium sp.</i>	-	0,05	0,05	0,11
<i>Humicola fuscoatra</i>	0,38	0,16	0,97	1,52
<i>Humicola dimorphospora</i>	0,16	0,22	1,19	1,57
<i>Microsphaeropsis sp.</i>	0,11	0,22	0,05	0,38
<i>Mucor sp.</i>	0,05	-	1,14	1,19
<i>N. c. 1</i>	0,16	0,60	0,27	1,03
<i>Paecilomyces variotii</i>	0,11	-	-	0,11
<i>Paecilomyces persicinum</i>	0,11	-	-	0,11
<i>Penicillium sp.</i>	7,52	0,70	7,41	15,64
<i>Phialophora malorum</i>	-	-	0,16	0,16
<i>Phoma glomerata</i>	-	-	0,32	0,32
<i>Phomopsis quercina</i>	-	0,11	0,38	0,49
<i>Pyrenochaeta sp.</i>	0,43	0,32	1,30	2,06
<i>Pythium intermedium</i>	-	-	0,05	0,05
<i>Ramichloridium sp.</i>	0,16	-	-	0,16
<i>Rhinochloidiella sp.</i>	0,43	-	-	0,43
<i>Rhizoctonia solani</i>	1,41	0,43	0,76	2,60
<i>Scopulariopsis asperula</i>	0,32	0,54	1,84	2,71
<i>Ophiostoma sp.</i>	1,03	0,43	0,43	1,89
<i>Sporothrix sp.</i>	1,03	0,11	-	1,14
<i>Trichocladium piriformis</i>	-	-	0,05	0,05
<i>Trichoderma aureoviride</i>	0,05	-	0,11	0,16
<i>Trichoderma hamatum</i>	-	-	0,11	0,11
<i>Trichoderma harzianum</i>	2,49	0,97	4,38	7,85
<i>Trichoderma koningii</i>	1,24	0,27	1,52	3,03
<i>Tritirachium album</i>	0,05	-	-	0,05
<i>Ulocladium botrytis</i>	0,38	0,65	0,60	1,62
<i>Zyghorhynchus heterogamus</i>	-	-	0,38	0,38

In *tabella 13* vengono riportate tutte le specie fungine identificate seguite dalle rispettive frequenze relative (F. R. %) totali risultanti dagli isolamenti effettuati da foglie, fusticino ed apparato radicale dei semenzali. Su foglie le specie più frequenti risultano *F. verticillioides* (2,6%), *T. harzianum* (2,49%), *C. cladosporioides* (1,62%), *Rhizoctonia solani* (1,41%), *F. solani* e *Aspergillus sez. Flavi.* (1,3%), *A. alterata* e *Eurotium sp.* (1,24%). Su fusto si hanno *A. alternata* (2,27%), *F. verticillioides* (2,22%) e *F. solani* (1,68%) seguite da altre specie con minore frequenza. Dall'apparato radicale le frequenze maggiori si riscontrano per *F. verticillioides* (5,14%), *F. solani* (4,65%), *T. harzianum* (4,38%), *F. proliferatum* (3,25%), *F. oxysporum* (2,87%) e *Eurotium sp.* (2,33%).

Da un confronto tra gli isolamenti relativi alle ghiande mature si riscontrano 37 specie di funghi comuni alla popolazione fungina isolata dagli organi dei semenzali. Si descriveranno di seguito le specie fungine ottenute in relazione alle frequenze relative di isolamento calcolate per ciascun sito organo vegetale (*).

In *figura 31* si riportano i dati relativi al fungo *F. verticillioides*, il quale presenta frequenze relative eterogenee tra i diversi organi, ed una maggiore presenza riscontrabile su semenzali originati da ghiande raccolte da rete. Questa specie presenta un valore massimo in corrispondenza dell'apparato radicale dei semenzali appartenenti al gruppo "rete - giorni 1" (circa 1,6%) che decresce all'aumentare del periodo di permanenza delle ghiande di origine. In generale, si evidenziano frequenze relative piuttosto alte in tutti gli apparati radicali esaminati, spesso con valori prossimi a quelli corrispondenti ai fusti osservati. Sulle foglie è presente sporadicamente nelle piante "da terra" e costantemente su semenzali dei gruppi "rete - giorni 1", "rete - giorni 6", "rete - giorni 12", distribuito sia su foglie apicali, sia basali.

(*) I grafici riportano i seguenti codici: *FG* = foglie; *a* = apicali; *b* = basali; *T* = fusticino; *R* = apparato radicale; *TOT* = F. R. % totale per gruppo.

Per quanto riguarda *F. solani* si riscontrano frequenze relative totali maggiori nei semenzali provenienti da ghiande “rete – giorni 12”, sui quali si osserva un andamento decrescente passando dall’analisi dell’apparato radicale, con frequenza del 2,5%, al fusto (1,5%), alle foglie. La presenza di questa specie è sporadica nelle piante appartenenti ai gruppi “terra – giorni 12”, “terra – giorni 1” e “rete – giorni 1”. Sui fusticini è quasi sempre presente, seppur con basse frequenze relative (*Fig. 32*).

F. proliferatum mostra una maggiore abbondanza nei tessuti dei semenzali originati da ghiande raccolte da rete, con eccezione per gli individui appartenenti al primo giorno di permanenza, dai quali è stato isolato solo da apici e fittone, con frequenze relative che non raggiungono l’1%. Inoltre, è assente su tutte le piante della categoria “terra – giorni 12”. Sul tronco si riscontrano frequenze relative da 0,8% all’ 1% circa solo per le raccolte da rete nel sesto e dodicesimo momento. Questa specie cje risulta quasi assente sulle foglie di tutte le situazioni osservate (*Fig. 33*).

L’ultima specie appartenente al genere *Fusarium* osservata è *F. oxysporum*, le cui frequenze sono riportate in *fig. 34*. E’ un fungo sempre isolato dall’apparato radicale sul quale si riscontrano le frequenze maggiori in riferimento agli altri tessuti vegetali, seguite cioè dai valori ottenuti dagli isolamenti da fusto e infine dalle foglie, nelle quali è sporadica. Si osserva che le frequenze relative di radici e fusto hanno un andamento crescente, passando da semenzali del gruppo “terra – giorni 1” e “terra – giorni 6”, fino a “terra – giorni 12”, e decrescente nel gruppo di “rete” dal primo al dodicesimo giorni. La sua presenza risulta, in generale, minore rispetto a *F. proliferatum*, *F. solani* e *F. verticillioides*.

Fusarium verticillioides

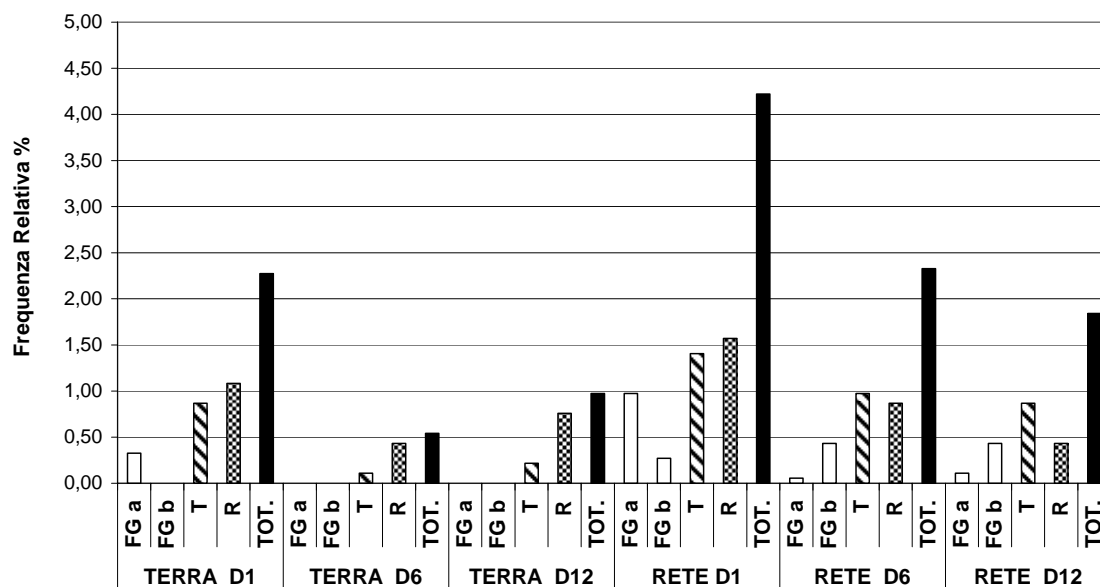


Figura 31 – Frequenze relative di *F. verticillioides* su organi di semenzali di farnia (nero:totale; bianco: foglie; righe: fusto; punti: radici).

Fusarium solani

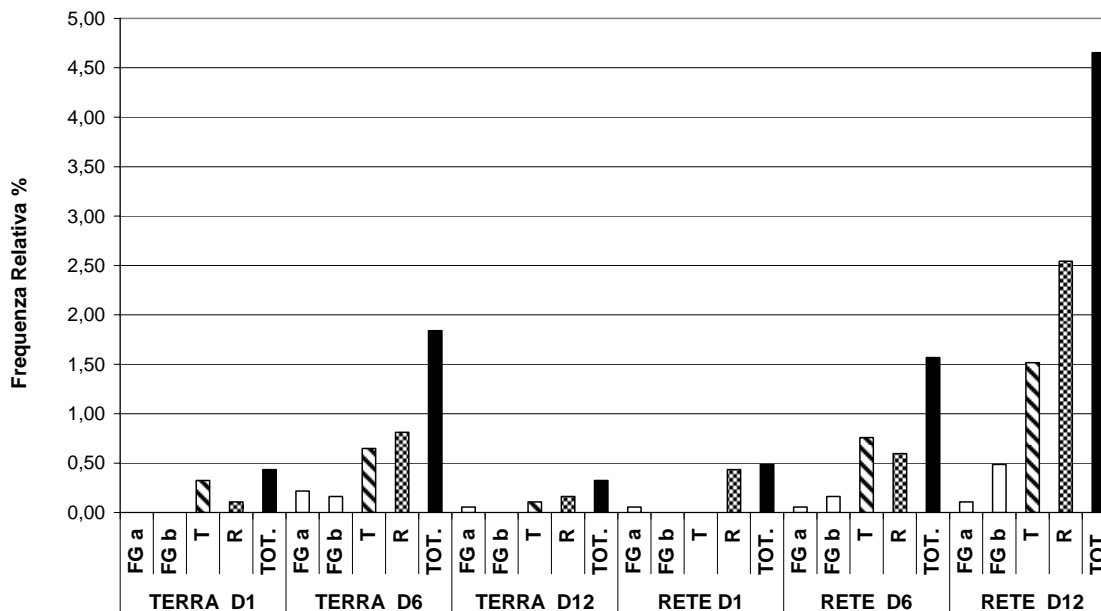


Figura 32 – Frequenze relative di *F. solani* su organi di semenzali di farnia (nero:totale; bianco: foglie; righe: fusto; punti: radici).

Fusarium proliferatum

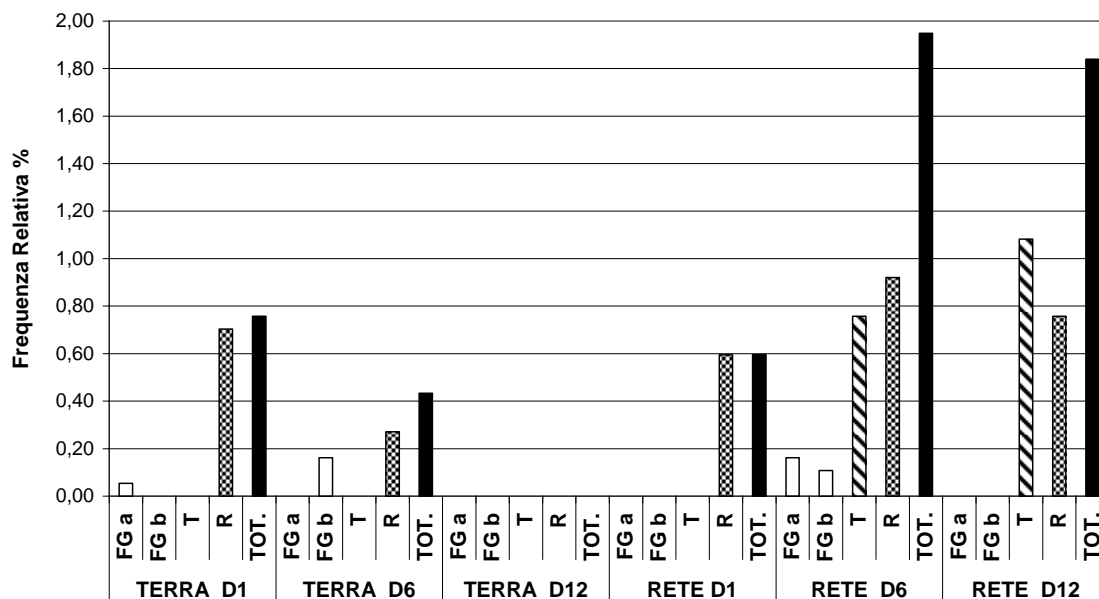


Figura 33 – Frequenze relative di *F. proliferatum* su organi di semenzali di farnia (nero:totale; bianco: foglie; righe: fusto; punti: radici).

Fusarium oxysporum

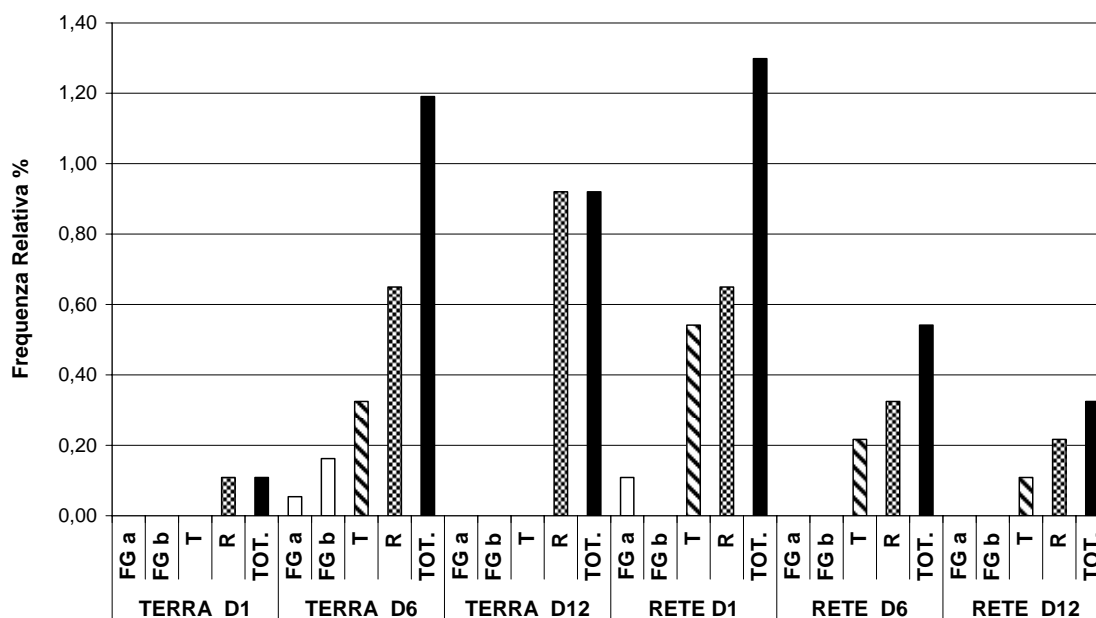


Figura 34 – Frequenze relative di *F. oxysporum* su organi di semenzali di farnia (nero:totale; bianco: foglie; righe: fusto; punti: radici).

Alternaria alternata

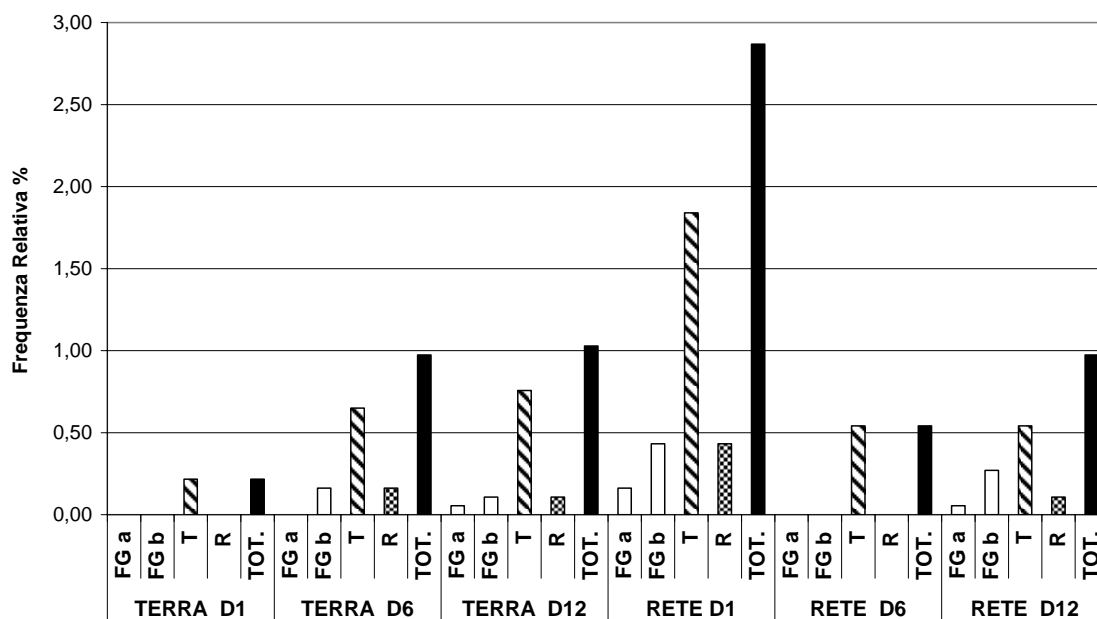


Figura 35 – Frequenze relative di *A. alternata* su organi di semenzali di farnia (nero:totale; bianco: foglie; righe: fusto; punti: radici).

Eurotium sp.

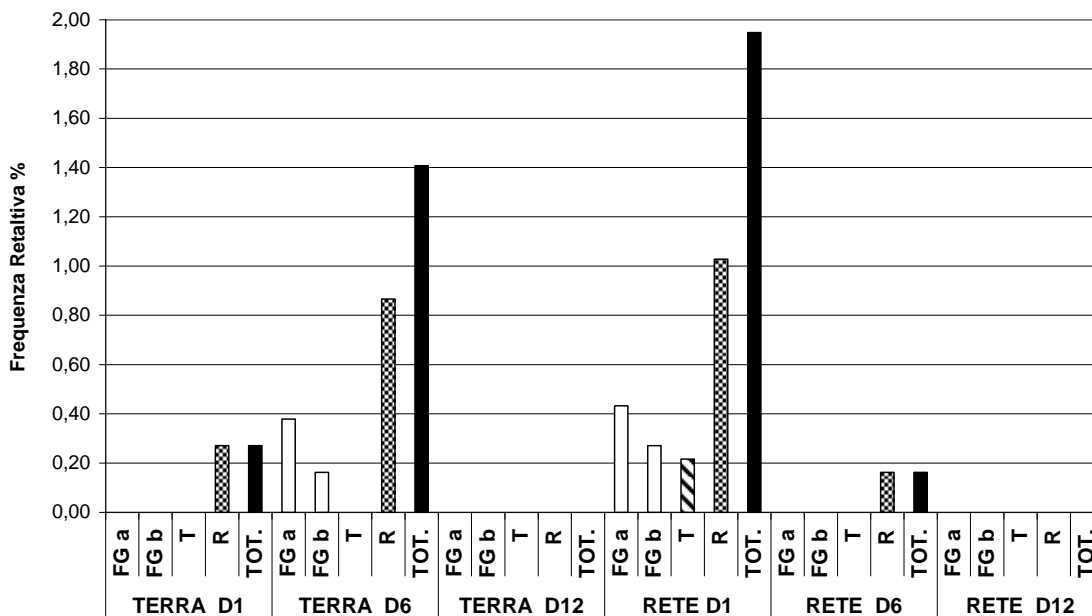


Figura 36 – Frequenze relative di *Eurotium sp.* su organi di semenzali di farnia (nero:totale; bianco: foglie; righe: fusto; punti: radici).

Alternaria alternata è una specie fungina presente con le maggiori frequenze relative sul fusticino dei semenzali in tutti i gruppi considerati, per la quale il valore massimo è di 1,8% in “rete – giorni 1”, che pesa considerevolmente sulla frequenza relativa totale in riferimento agli altri gruppi osservati. Su foglie e radici i valori rilevati non superano mai lo 0,5% ed è una specie assente nei semenzali originati da semi raccolti da terra dopo un giorno e da rete dopo 6 giorni (Fig. 35).

Eurotium sp. mostra frequenze relative elevate solo nei casi “terra – giorni 6” e “rete – giorni 1”, nei quali il peso maggiore è dato dal numero di isolamenti ottenuti dagli apparati radicali. Risulta completamente assente nei semenzali provenienti da ghiande raccolte al dodicesimo giorno, da terra e da rete. Sulle foglie le frequenze sono comprese tra lo 0,2% e lo 0,4%, e su fusto è sporadico (Fig. 36).

Discula quercina, *Fusicoccum quercus* e *Phomopsis quercina* sono state rilevate con frequenze relative non superiori allo 0,5% su tutti gli organi, con presenze sporadiche. La prima specie è assente da tutti i semenzali originati da ghiande raccolte da terra dopo 6 giorni di permanenza e da rete dopo 1 e 6 giorni. È rara sulle radici e più frequente sui fusticini, dai quali è stata isolata dal gruppo “terra – giorni 12” con lo 0,2% circa, e dal gruppo “rete – giorni 12” con lo 0,9% (Fig. 37).

Per quanto riguarda *Fusicoccum quercus* si riscontrano frequenze relative lievemente maggiori ed è presente sia su semenzali da semi raccolti da terra sia da rete. Nei tre gruppi “terra – giorni 1”, “terra – giorni 12” e “rete – giorni 1” è stato isolato da fusto con frequenze tra lo 0,2% e lo 0,4%, e dall’apparato radicale con frequenze simili. Sulle foglie è presente quasi esclusivamente nel gruppo “rete – giorni 1” (Fig. 38).

Tra le tre, *Phomopsis quercina* è la specie meno frequente: presente solo sulle radici e sul fusticino di semenzali originati rispettivamente da ghiande raccolte da terra dopo 12 giorni e da rete dopo un giorno di permanenza (Fig. 39).

Discula quercina

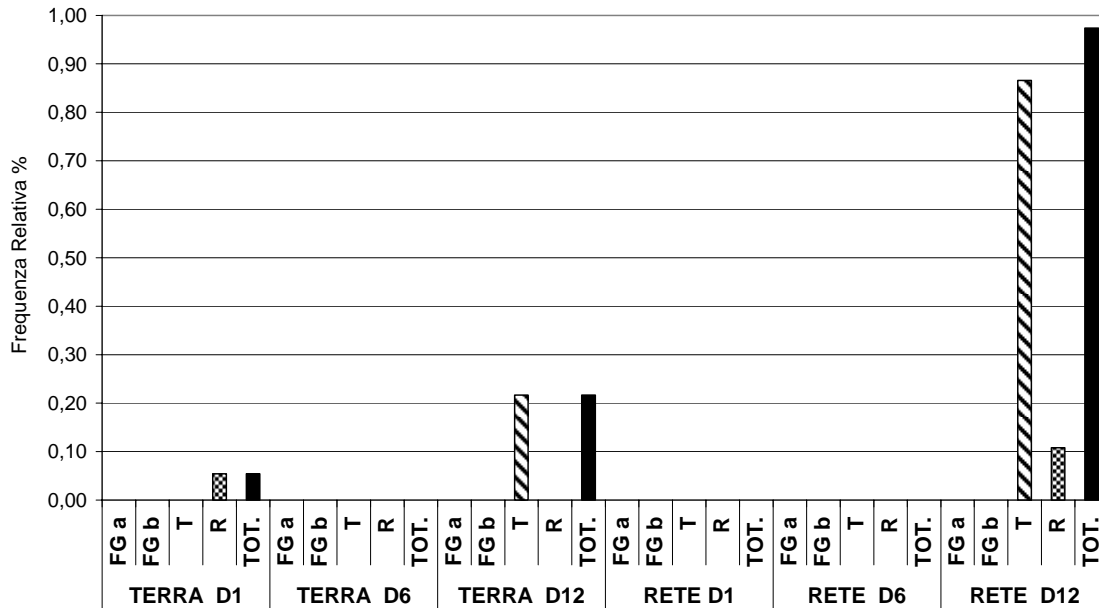


Figura 37 – Frequenze relative di *D. quercina* su organi di semenzali di farnia (nero:totale; bianco: foglie; righe: fusto; punti: radici).

Fusicoccum quercus

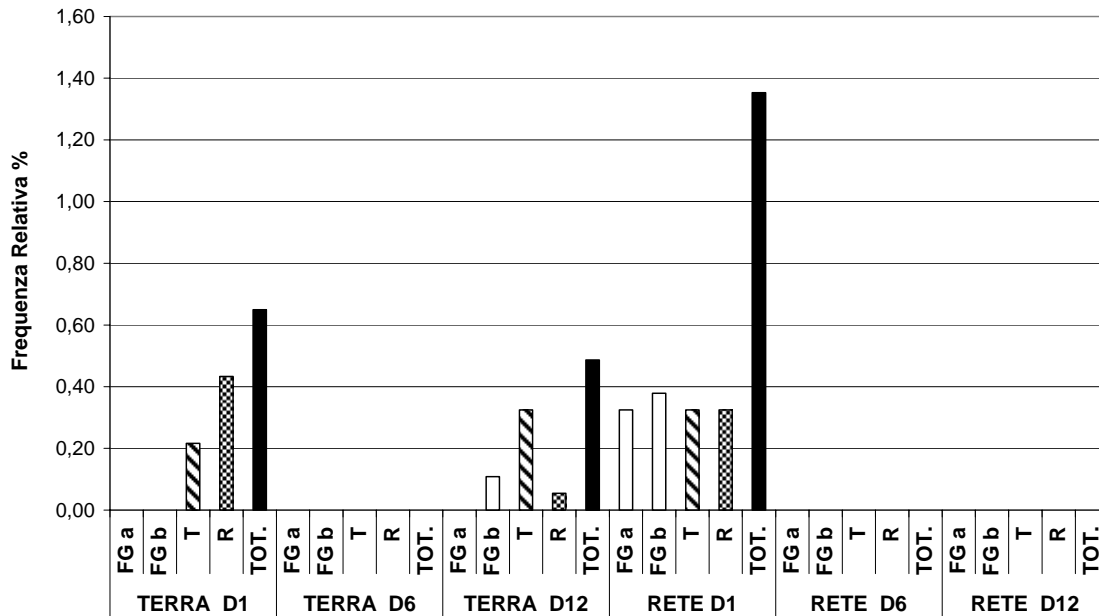


Figura 38 – Frequenze relative di *F. quercus* su organi di semenzali di farnia (nero:totale; bianco: foglie; righe: fusto; punti: radici).

Phomopsis quercina

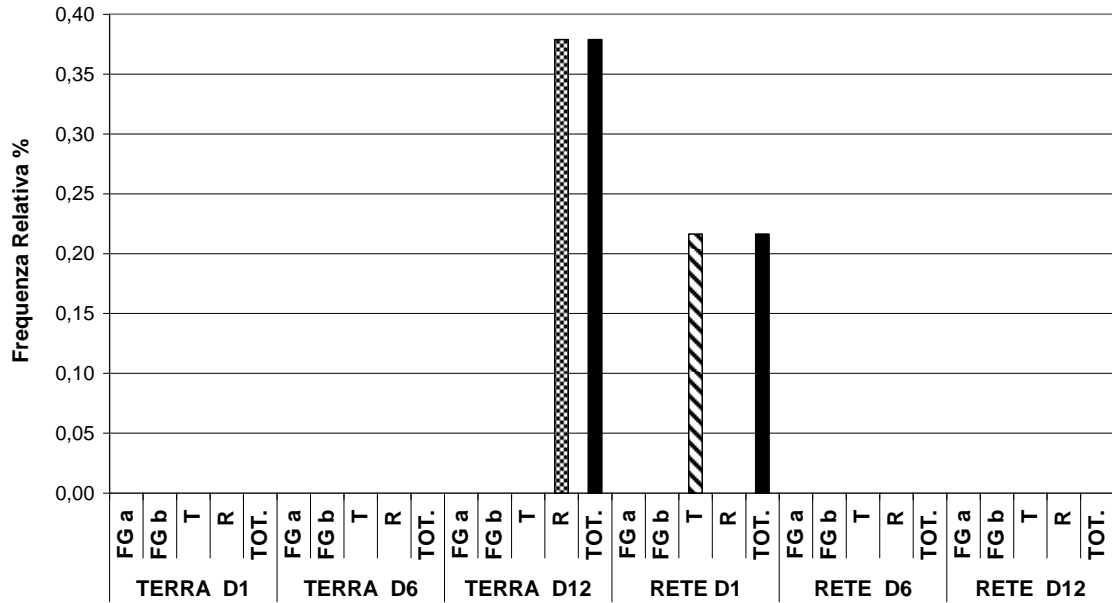


Figura 39 – Frequenze relative di *P. quercina* su organi di semenzali di farnia (nero:totale; bianco: foglie; righe: fusto; punti: radici).

Sporothrix sp.

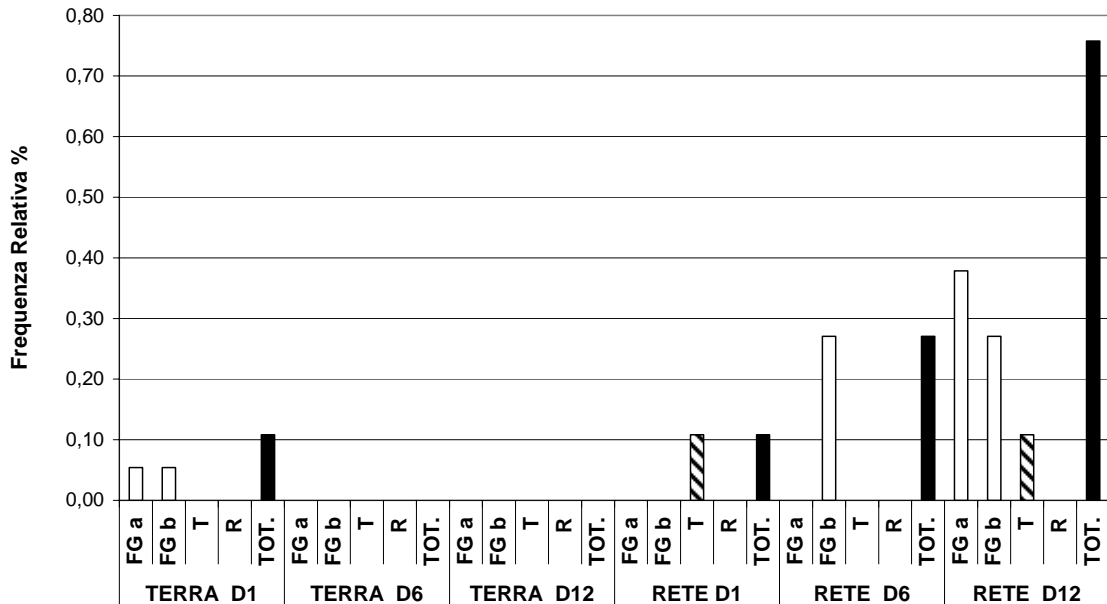


Figura 40 – Frequenze relative di *Sporothrix sp.* su organi di semenzali di farnia (nero:totale; bianco: foglie; righe: fusto; punti: radici).

Ophiostoma sp.

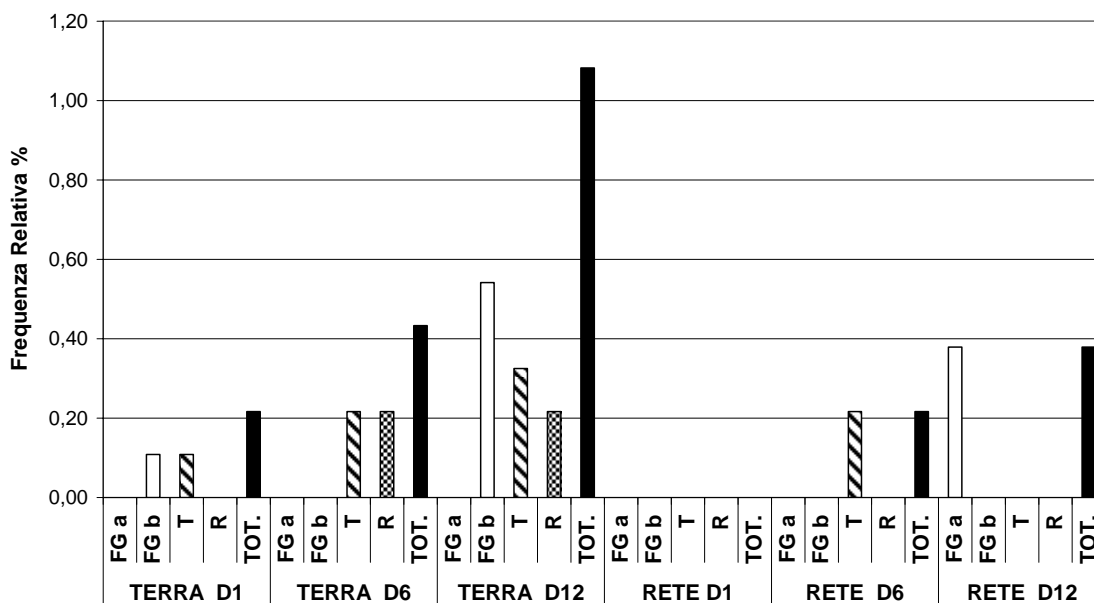


Figura 41 – Frequenze relative di *Ophiostoma sp.* su organi di semenzali di farnia (nero:totale; bianco: foglie; righe: fusto; punti: radici).

Scopulariopsis asperula

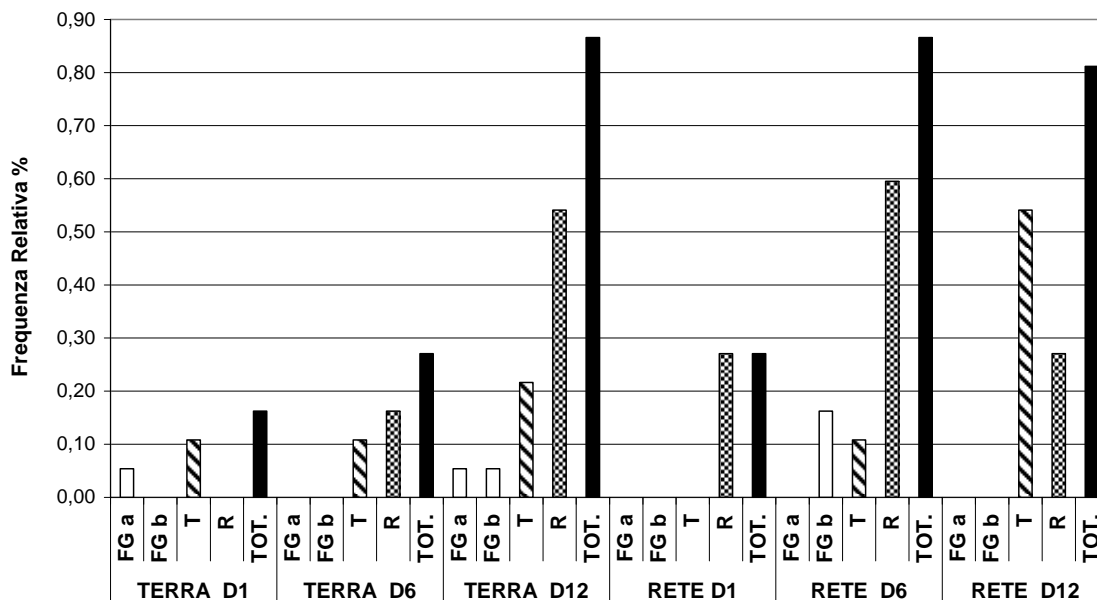


Figura 42 – Frequenze relative di *S. asperula sp.* su organi di semenzali di farnia (nero:totale; bianco: foglie; righe: fusto; punti: radici).

Gli ultimi funghi esaminati sono *Sporothrix* sp., *Ophiostoma* sp. e *Scopulariopsis asperula*.

Il primo organismo fungino non presenta frequenze relative elevate ma è spesso rilevato sui tessuti fogliari, con valori maggiori nei semenzali rientranti nel gruppo della raccolta da rete al dodicesimo giorno (0,4% nelle foglie apicali e 0,3% nelle foglie basali, circa). Assai raramente è stato isolato dal fusto, ed è completamente assente su tutti gli apparati radicali esaminati (Fig. 40).

Anche *Ophiostoma* sp. non è stato isolato con alte frequenze e risulta presente principalmente sui semenzali germinati da ghiande raccolte da terra. È distribuito indistintamente sui tessuti fogliari, radicali e sul tronco, con valori superiori nella raccolta al dodicesimo giorno di permanenza sul terreno (Fig. 41).

In figura 42 è riportata la distribuzione della specie *S. asperula*, isolata sia dai gruppi di terra, sia di rete. La maggiore presenza si riscontra su radici e su fusto, dalle piante appartenenti a “terra e rete – giorni 12” e “rete – giorni 6”, tuttavia con valori sempre inferiori all’1%.

3. Ghiande in sviluppo

Dagli isolamenti complessivi effettuati dalle ghiande raccolte prima della naturale abscissione e ancora in fase di sviluppo si sono ottenuti 42 generi fungini, distribuiti in 12 settimane ciascuno (Tab. 14).

La frequenza di isolamento totale massima rilevata è del 12,7% per il genere *Alternaria*, seguito da *Cladosporium* sp. e *Discula* sp., con frequenze del 6,3% e del 5,7% rispettivamente. Compresi tra il 2% ed il 5% si riscontrano *Epicoccum* sp. (4,2%), *Ascochyta* sp. (3,2%), *Botrytis* sp. (2,8%) e *Pythium* sp. (2,47%).

Tra i generi che mostrano presenze più ridotte si hanno *Fusarium* sp. (1,8%), *Phoma* sp. (1,7%), *Phomopsis* (1,6%), *Fusicoccum* sp. (1,1%), *Ulocladium* sp. (1%) e *Penicillium* sp. (1%), seguiti da *Sporothrix* sp., *Trichoderma* sp. e *Chaetophoma* sp. con frequenze nettamente inferiori all’1% (Fig. 43).

La maggioranza dei funghi identificati risultano rari, caratterizzati da frequenze di isolamento estremamente basse, come nel caso di *Gliocladium* sp., *Chaetomium* sp., *Nigrospora* sp., *Coniothyrium* sp. e altre (Fig. 43).

In Fig. 44 vengono riportati i dati relativi ai livelli di contaminazione fungina dei semi non ancora completamente maturi. Nel corso della stagione vegetativa il grado di contaminazione delle ghiande in sviluppo varia da un minimo del 46% riscontrato nel mese di maggio, ad un massimo di circa il 95% in tutto il periodo di giugno ed inizio luglio. Nelle prime settimane primaverili e nelle ultime settimane dei mesi estivi, il grado di contaminazione varia tra il 66% e l'85%.

Tabella 14 – Frequenze di isolamento dei generi presenti su ghiande in fase di sviluppo.

Genere fungino	Settimana											
	16	17	19	21	23	25	27	29	31	34	36	38
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
<i>Alternaria spp.</i>	7,08	7,50	11,67	7,92	19,17	21,67	23,75	11,67	9,58	9,17	9,17	13,75
<i>Arthrimum spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,42	-	0,83	0,83	0,42
<i>Ascochyta spp.</i>	4,17	3,33	2,92	1,25	1,25	3,33	5,42	2,50	5,83	1,67	4,17	2,50
<i>Aspergillus spp.</i>	-	-	-	0,42	-	-	-	-	-	0,42	-	1,67
<i>Botryodiplodia spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,42	-	0,42
<i>Botrytis spp.</i>	-	-	-	-	6,67	8,33	16,67	-	-	0,42	0,42	0,83
<i>Chaetomium spp.</i>	-	-	0,42	0,42	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chaetophoma spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,83	0,42	3,75	0,83	-
<i>Chloridium spp.</i>	-	-	0,42	1,25	-	-	1,67	-	-	-	0,42	-
<i>Cladosporium spp.</i>	7,08	8,33	8,75	-	2,92	1,25	1,67	6,67	9,58	10,42	11,25	8,33
<i>Coniothyrium spp.</i>	-	-	-	0,42	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coryneum spp.</i>	-	-	-	-	0,42	1,67	0,42	-	-	-	-	-
<i>Cryphonectria spp.</i>	0,42	-	-	-	0,42	-	-	0,42	-	-	-	-
<i>Curvularia spp.</i>	-	-	-	-	-	1,25	1,25	-	-	-	-	-
<i>Cylindrosporium spp.</i>	-	-	0,42	-	-	0,42	-	-	-	-	-	0,42
<i>Cytospora spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,92	-	-
<i>Didymella spp.</i>	-	-	-	0,42	-	-	2,08	-	-	0,42	0,42	0,42
<i>Discula spp.</i>	3,33	2,92	1,25	2,92	6,25	17,50	10,42	5,42	5,83	2,50	6,25	4,17
<i>Epicoccum spp.</i>	1,25	2,08	1,67	1,67	2,92	7,08	6,67	6,67	0,42	8,75	4,17	7,50
<i>Eupenicillium spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,42	-	-	-	-
<i>Eurotium spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,25	-
<i>Fusarium spp.</i>	0,42	0,42	0,42	0,83	0,83	3,33	2,50	3,33	0,42	3,75	2,50	3,75
<i>Fusicoccum spp.</i>	-	-	-	-	-	10,00	2,50	0,83	-	-	-	-
<i>Gliocladium roseum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,42	-
<i>Libertella spp.</i>	-	-	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Macrophomina spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,83	1,25	-	-	-
<i>Mucor spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,42	-	-	-	0,42
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,83	-	-	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,42	-
<i>Penicillium spp.</i>	0,42	0,42	0,42	-	-	-	-	0,83	0,83	0,42	2,50	6,67
<i>Phoma spp.</i>	5,00	1,25	0,42	-	-	2,08	5,83	2,08	0,83	0,42	1,67	0,83
<i>Phomopsis spp.</i>	3,33	5,83	0,83	0,83	-	1,67	2,08	0,83	0,42	1,25	0,83	1,25
<i>Pithomyces spp.</i>	0,83	1,67	-	-	-	0,42	0,42	0,83	-	-	-	-
<i>Pyrenochaeta spp.</i>	0,83	-	0,42	0,42	-	0,42	-	1,25	-	-	-	-
<i>Pythium spp.</i>	-	-	-	-	22,92	3,75	2,08	-	-	0,42	0,42	-
<i>Rhinochadiella spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,42
<i>Scopulariopsis spp.</i>	-	-	-	-	-	0,42	-	-	-	0,42	3,33	0,42
<i>Scytalidium spp.</i>	-	-	-	0,83	-	-	0,42	-	-	-	-	-
<i>Sordaria spp.</i>	-	-	-	-	-	2,92	0,42	-	-	-	-	-
<i>Sporothrix spp.</i>	-	-	-	-	0,83	-	0,42	-	1,25	-	4,17	2,50
<i>Trichoderma spp.</i>	-	0,42	-	-	0,83	1,67	1,25	2,92	-	0,42	0,83	-
<i>Ulocladium spp.</i>	2,08	0,83	-	0,83	4,58	1,67	1,25	0,42	-	0,83	-	0,42
Totale per settimana	36,25	35,00	30,83	20,42	70,00	90,83	89,17	50,42	36,67	49,58	56,25	57,08

Ghiande in sviluppo

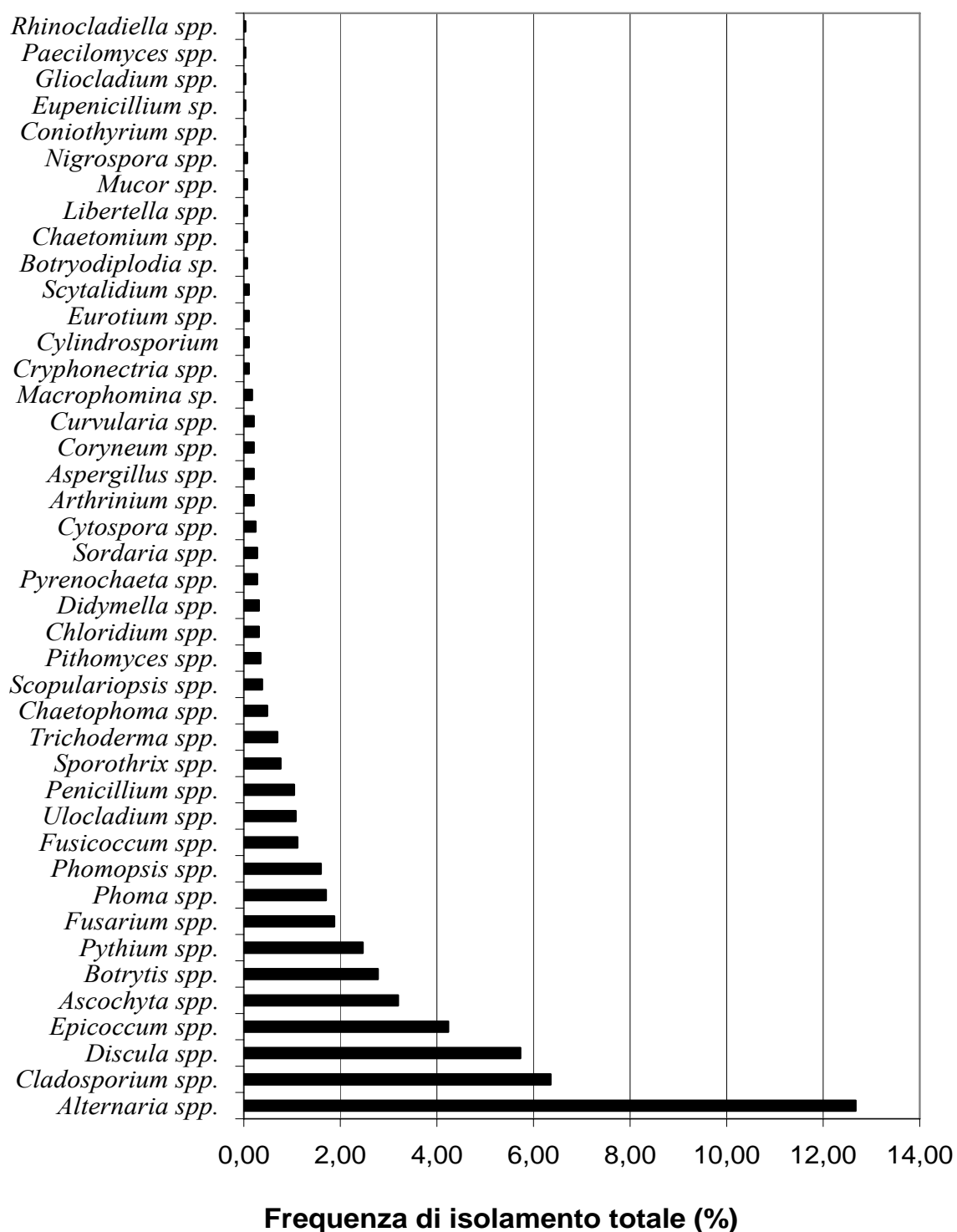


Figura 43 – Distribuzione delle F.I. % relative ai generi fungini di ghiande in sviluppo.

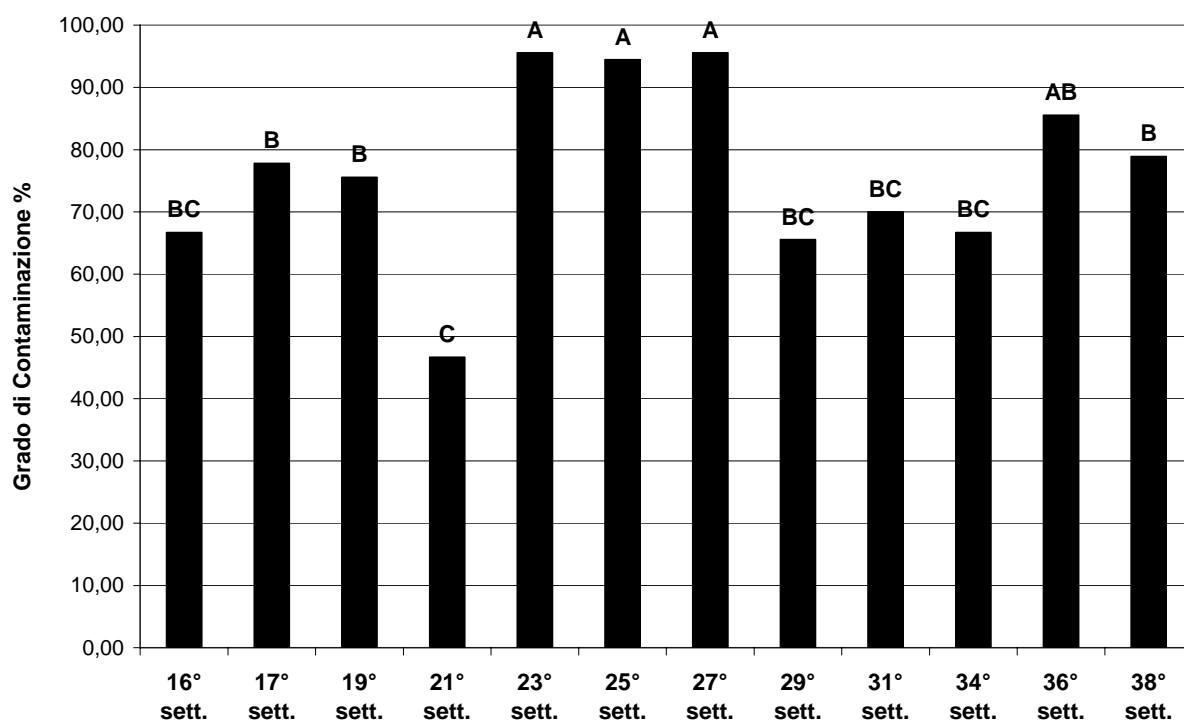


Figura 44. – Grado di contaminazione di ghiande in maturazione da aprile a settembre.

Tabella 15 – Test Kruskal-Wallis: grado di contaminazione/settimana.

Test di Kruskal-Wallis: Dalla 16° alla 38° settimana	
K (Valore osservato)	22,997
K (Valore critico)	19,675
GDL	11
p-value (bilaterale)	0,018
alfa	0,05

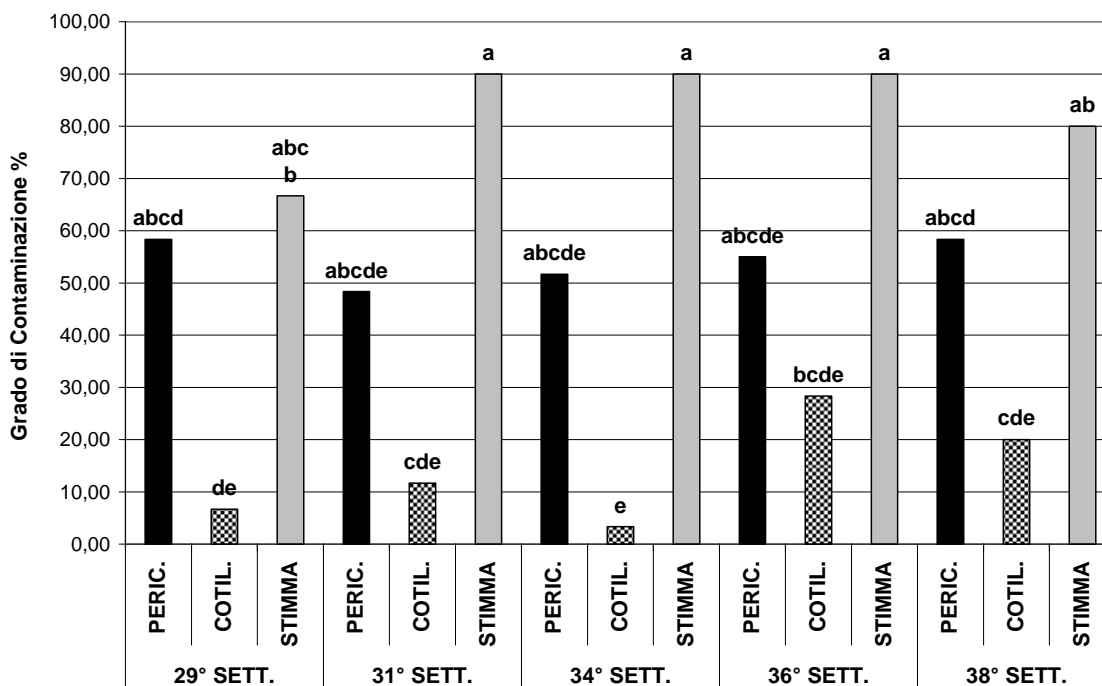


Fig. 45. – Grado di contaminazione dei tessuti di ghiande in fase di sviluppo (nero: pericarpo; punti: cotiledoni; grigio: stimma)

Tab. 16 – Test Kruskal-Wallis: grado di contaminazione/tessuto.

Test di Kruskal-Wallis:	
Tessuti/Settimana	
K (Valore osservato)	35,141
K (Valore critico)	23,685
GDL	14
p-value (bilaterale)	0,001
alfa	0,05

In *Fig. 45* sono rappresentati i livelli di contaminazione relativi al tessuto delle ghiande in sviluppo campionate, pericarpo, cotiledone e stimma, nel decorso della stagione estiva. I tessuti cotiledonali presentano gradi di contaminazione molto bassi, che variano dal 3% nella 34° settimana al 28% nella 36°, e 20% nell'ultima settimana prima dell'abscissione, con andamento discontinuo. Valori superiori e relativamente costanti si evidenziano per il tessuto esterno, che variano dal 50% al 60% durante tutto il periodo considerato. Il dato più rilevante è dato dagli isolamenti effettuati sul residuo del carpello fiorale: su quasi il 60% degli stimmi residui si riscontra almeno un isolato fungino alla 29° settimana, e si riscontra poi un aumento all'80-90% nelle ultimo mese e mezzo indagato. In *Tab. 16* è riportato il risultato del test statistico Kruskal-Wallis applicato ai dati appena descritti.

In *tab. 17* vengono riportati tutti i valori di χ^2 calcolati per ciascuna specie fungina isolata, in relazione ai confronti osservati tra le diverse settimane di raccolta dei semi fecondati. In **grossetto** vengono riportati i valori che rappresentano una differenza statisticamente significativa tra le frequenze di isolamento.

Vengono, inoltre, riportati i valori di χ^2 calcolati per i confronti tra le parti anatomiche delle ghiande da cui sono state isolate le relative specie fungine, in riferimento alle ultime 5 settimane di raccolta. Sono risultate statisticamente significative 26 specie fungine, come evidenziato in tabella con valori in **grossetto** (*Tab. 17*).

Tabella 17 – Valori di χ^2 calcolati nei confronti tra epoche di raccolta.

Specie fungina	16°/17°	17°/19°	19°/21°	21°/23°	23°/25°
<i>Alternaria alternata</i>	0,035	2,920	2,332	17,555***	0,806
<i>Arthrimum phaeospermum</i>	-	-	-	-	-
<i>Ascochyta sp.</i>	0,247	0,073	1,694	-	2,421
<i>Aspergillus Sez. Flavi</i>	-	-	1,006	1,006	-
<i>Aspergillus Sez. Niger</i>	-	-	-	-	-
<i>Botryodiplodia sp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	-	17,561***	0,556
<i>Chaetomium sp. 1</i>	-	-	1,006	1,006	-
<i>Chaetomium sp. 2</i>	-	1,006	1,006	-	-
<i>Chaetophoma sp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Chloridium sp.</i>	-	1,006	1,023	3,051	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,306	-	22,500***	7,283**	1,694
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	-	1,006	1,006	-	-
<i>Coniothyrium sp.</i>	-	-	1,006	1,006	-
<i>Coryneum sp.</i>	-	-	-	1,006	1,851
<i>Cryphonectria sp.</i>	1,006	-	-	1,006	1,006
<i>Curvularia sp.</i>	-	-	-	-	3,051
<i>Cylindrosporium sp.</i>	-	1,006	1,006	-	1,006
<i>Cytospora sp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Didymella sp.</i>	-	-	1,006	1,006	-
<i>Discula quercina</i>	0,073	1,694	1,694	3,314	18,716***
<i>Epicoccum nigrum</i>	-	-	1,006	0,339	8,800**
<i>Epicoccum sp.</i>	0,523	0,117	0,149	0,523	0,117
<i>Eupenicillium sp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Eurotium sp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Fusarium graminearum</i>	-	-	-	-	4,091*
<i>Fusarium lateritium</i>	-	-	-	-	-
<i>Fusarium proliferatum</i>	-	-	-	1,006	1,006
<i>Fusarium solani</i>	-	1,006	-	1,006	2,022
<i>Fusarium sp. 2 anello</i>	-	1,006	1,006	1,006	2,022
<i>Fusarium verticillioides</i>	-	-	-	1,006	1,006
<i>Fusicoccum quercus</i>	-	-	-	-	27,692***
<i>Gliocladium roseum</i>	-	-	-	-	-
<i>Libertella sp.</i>	-	2,022	2,022	-	-
<i>Macrophomina sp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Mucor sp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	-	-	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	-	-	1,006	-	-
<i>Phoma cavae</i>	3,812	2,022	-	-	1,006
<i>Phoma glomerata</i>	1,851	-	1,006	-	4,091*
<i>Phomopsis oblonga</i>	1,338	2,759	0,339	2,022	1,006
<i>Phomopsis quercina</i>	0,655	6,776**	1,006	-	3,051
<i>Pithomyces cartarum</i>	0,690	4,091*	-	-	1,006
<i>Pyrenochaeta sp.</i>	2,022	1,006	-	1,006	1,006
<i>Pythium intermedium</i>	-	-	-	79,200***	51,304***
<i>Scopulariopsis asperula</i>	-	-	-	-	1,006
<i>Scytalidium sp.</i>	-	-	2,022	2,022	-
<i>Sordaria fimicola</i>	-	-	-	-	7,283**
<i>Sporothrix sp.</i>	-	-	-	2,022	2,022
<i>Trichoderma hamatum</i>	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,006	1,006	-	2,022	0,690
<i>Ulocladium botrytis</i>	1,338	2,022	2,022	6,716**	3,564

Specie fungina	25°/27°	27°/29°	29°/31°	31°/34°	34°/36°	36°/38°
<i>Alternaria alternata</i>	0,581	49,064***	0,591	0,026	-	2,694
<i>Arthrimum phaeospermum</i>	-	0,603	1,003	2,013	-	0,337
<i>Ascochyta sp.</i>	1,348	8,417**	3,429	5,910*	2,697	1,754
<i>Aspergillus Sez. Flavi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus Sez. Niger</i>	-	-	-	1,003	1,003	4,054*
<i>Botryodiplodia sp.</i>	-	-	-	1,003	1,003	1,003
<i>Botrytis cinerea</i>	10,000**	80,00***	-	1,003	-	0,337
<i>Chaetomium sp. 1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Chaetomium sp. 2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Chaetophoma sp.</i>	-	1,210	0,337	6,621*	4,624*	2,013
<i>Chloridium sp.</i>	4,091*	6,780**	-	-	1,003	1,003
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,149	2,851	1,444	0,099	0,093	1,236
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Coniothyrium sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Coryneum sp.</i>	1,851	1,674	-	-	-	-
<i>Cryphonectria sp.</i>	-	0,603	1,003	-	-	-
<i>Curvularia sp.</i>	-	5,063*	-	-	-	-
<i>Cylindrosporium sp.</i>	1,006	-	-	-	-	1,003
<i>Cytospora sp.</i>	-	-	-	7,167**	7,167**	-
<i>Didymella sp.</i>	5,143*	8,511**	-	1,003	-	-
<i>Discula quercina</i>	6,871**	15,416***	0,041	3,429	4,147*	1,091
<i>Epicoccum nigrum</i>	-	0,756	14,030***	19,621***	4,353*	2,521
<i>Epicoccum sp.</i>	0,149	5,063*	-	-	-	-
<i>Eupenicillium sp.</i>	-	0,603	1,003	-	-	-
<i>Eurotium sp.</i>	-	-	-	-	3,030	3,030
<i>Fusarium graminearum</i>	1,851	2,207	7,167**	4,054*	1,831	-
<i>Fusarium lateritium</i>	-	-	-	5,085*	2,721	-
<i>Fusarium proliferatum</i>	1,006	1,674	-	-	3,030	0,146
<i>Fusarium solani</i>	0,206	5,063*	1,003	1,003	-	1,003
<i>Fusarium sp. 2 anello</i>	2,022	-	-	-	-	-
<i>Fusarium verticillioides</i>	1,006	0,134	1,003	-	1,003	1,003
<i>Fusicoccum quercus</i>	12,960***	4,966*	2,013	-	-	2,013
<i>Gliocladium roseum</i>	-	-	-	-	1,003	1,003
<i>Libertella sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Macrophomina sp.</i>	-	1,210	0,203	3,030	-	-
<i>Mucor sp.</i>	-	0,603	1,003	-	-	1,003
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	1,210	2,013	-	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	-	-	-	-	1,003	1,003
<i>Penicillium sp.</i>	-	1,210	-	0,337	3,657	4,905
<i>Phoma cavae</i>	1,851	0,192	1,316	2,013	1,003	1,003
<i>Phoma glomerata</i>	2,788	17,391***	-	1,003	1,014	0,203
<i>Phomopsis oblonga</i>	2,759	5,516*	-	1,003	1,003	1,003
<i>Phomopsis quercina</i>	3,051	0,603	1,003	3,030	1,014	1,014
<i>Pithomyces cartarum</i>	-	0,023	2,013	-	-	-
<i>Pyrenochaeta sp.</i>	1,006	1,823	3,030	-	-	-
<i>Pythium intermedium</i>	1,239	8,511**	-	1,003	-	1,003
<i>Rhinochadiella sp.</i>	-	-	-	-	-	1,003
<i>Scopulariopsis asperula</i>	1,006	-	-	1,003	5,613*	5,613*
<i>Scytalidium sp.</i>	1,006	1,674	-	-	-	-
<i>Sordaria fimicola</i>	4,709*	1,674	-	-	-	-
<i>Sporothrix sp.</i>	1,006	1,674	3,030	3,030	10,345**	1,056
<i>Trichoderma hamatum</i>	-	3,064	5,085*	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,149	1,103	2,013	1,003	0,337	2,013
<i>Ulocladium botrytis</i>	0,149	2,441	1,003	2,013	2,013	1,003

Tabella 18. – Valori di χ^2 calcolati nei confronti tra epoche di raccolta e tessuti delle ghiande in sviluppo

Specie fungine	PERICARPO / COTILEDONI / STIMMA				
	29°	31°	34°	36°	38°
<i>Alternaria alternata</i>	26,610***	15,457***	17,365***	12,438**	18,007***
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	1,510	-	3,041	3,041	1,510
<i>Ascochyta sp.</i>	4,167	11,935**	16,438***	17,946***	5,469
<i>Aspergillus Sez. Niger</i>	-	-	1,510	-	1,027
<i>Botryodiplodia sp.</i>	-	-	4,027	-	4,027
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	4,027	4,027	8,108*
<i>Chaetophoma sp.</i>	1,774	1,510	7,270	1,774	-
<i>Chloridium sp.</i>	-	-	-	4,027	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	13,223**	8,907*	13,800**	18,677***	14,135***
<i>Cryphonectria sp.</i>	1,510	-	-	-	-
<i>Cylindrosporium sp.</i>	-	-	-	-	1,510
<i>Cytospora sp.</i>	-	-	6,89*	-	-
<i>Didymella sp.</i>	-	-	1,510	4,027	4,027
<i>Discula quercina</i>	11,87**	10,360**	9,375**	16,1***	4,821
<i>Epicoccum nigrum</i>	12,873**	4,027	17,940***	11,518**	14,110***
<i>Eupenicillium sp.</i>	1,510	-	-	-	-
<i>Eurotium sp.</i>	-	-	-	1,190	-
<i>Fusarium graminearum</i>	11,014**	-	6,164*	1,510	4,027
<i>Fusarium lateritium</i>	-	-	7,759*	1,510	1,510
<i>Fusarium proliferatum</i>	-	-	-	1,190	1,027
<i>Fusarium solani</i>	-	4,027	-	-	4,027
<i>Fusarium verticillioides</i>	1,510	-	-	1,510	-
<i>Fusicoccum quercus</i>	3,041	-	-	-	3,041
<i>Gliocladium roseum</i>	-	-	-	1,510	-
<i>Macrophomina sp.</i>	1,774	2,041	-	-	-
<i>Mucor sp.</i>	1,510	-	-	-	1,510
<i>Nigrospora sphaerica</i>	3,041	-	-	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	-	-	-	1,510	-
<i>Penicillium sp.</i>	3,041	0,507	1,510	0,260	17,071
<i>Phoma cavae</i>	7,759*	1,774	-	4,027	-
<i>Phoma glomerata</i>	-	-	4,027	4,592	3,041
<i>Phomopsis oblonga</i>	1,510	4,027	-	4,027	-
<i>Phomopsis quercina</i>	1,510	-	4,592	1,510	4,592
<i>Pithomyces cartarum</i>	3,041	-	-	-	-
<i>Pyrenochaeta sp.</i>	4,592	-	-	-	-
<i>Pythium intermedium</i>	-	-	4,027	4,027	-
<i>Rhinochlaeniella sp.</i>	-	-	-	-	1,510
<i>Scopulariopsis asperula</i>	-	-	1,510	8,055*	1,510
<i>Sporothrix sp.</i>	-	1,190	-	0,804	9,375**
<i>T. hamatum</i>	7,759*	-	-	-	-
<i>T. harzianum</i>	0,507	-	1,510	3,041	-
<i>Ulocladium botrytis</i>	4,027	-	8,108*	-	1,510

Ascochyta sp. è presente sulle giovani ghiande in tutte le settimane osservate, con frequenza di isolamento massima tra il 5% ed il 6% fra la 27° e la 31° settimana, con un andamento discontinuo durante tutta la stagione estiva (Fig. 46).

Phoma glomerata presenta frequenze di isolamento minori rispetto alla precedente, caratterizzate dalla totale assenza nella 21° e 23° settimana, da un picco massimo del 4% a ridosso della 27°, seguito dal decremento totale alla 29° e 31° settimana (Fig. 46).

Per quanto riguarda le due specie fungine che presentano le maggiori frequenze di isolamento totali nel contesto dell'intera prova, si osservano andamenti nel tempo discordanti. *A. alternata* è stata isolata quasi sempre con frequenze maggiori, che si aggirano tra il 10% ed il 25%, con un massimo agli inizi della stagione estiva, quando le ghiande hanno ormai superato la 23° settimana di sviluppo, che va diminuendo a fine estate. *C. cladosporioides* non raggiunge il 15% e, a differenza della precedente è quasi assente a fine primavera-inizio estate, per poi aumentare di inoculo dalla 29° settimana (Fig. 47).

Phomopsis quercina si presenta con frequenze di isolamento minime, che si aggirano tra il 2% ed il 4%, ed è assente in molti casi durante tutto il periodo di sviluppo e maturazione delle ghiande, a partire dalla 21° e 23° settimana (Fig. 48).

Anche la specie *Fusicoccum quercus* non è stata isolata da tutte le raccolte. Quest'ultima specie manca completamente dalla 16° alla 23° settimana, ma alla 25° la frequenza di isolamento che si osserva è relativamente elevata (10%), per procedere successivamente nel tempo diminuendo costantemente (Fig. 58).

Tra le tre specie riportate in figura 48 si evidenzia una costante presenza di *Discula quercina*, anche se con andamento discontinuo. Anche *D. quercina* viene isolata con basse frequenze nelle prime settimane di studio e raggiunge un picco massimo di quasi il 18% alla 25° settimana.

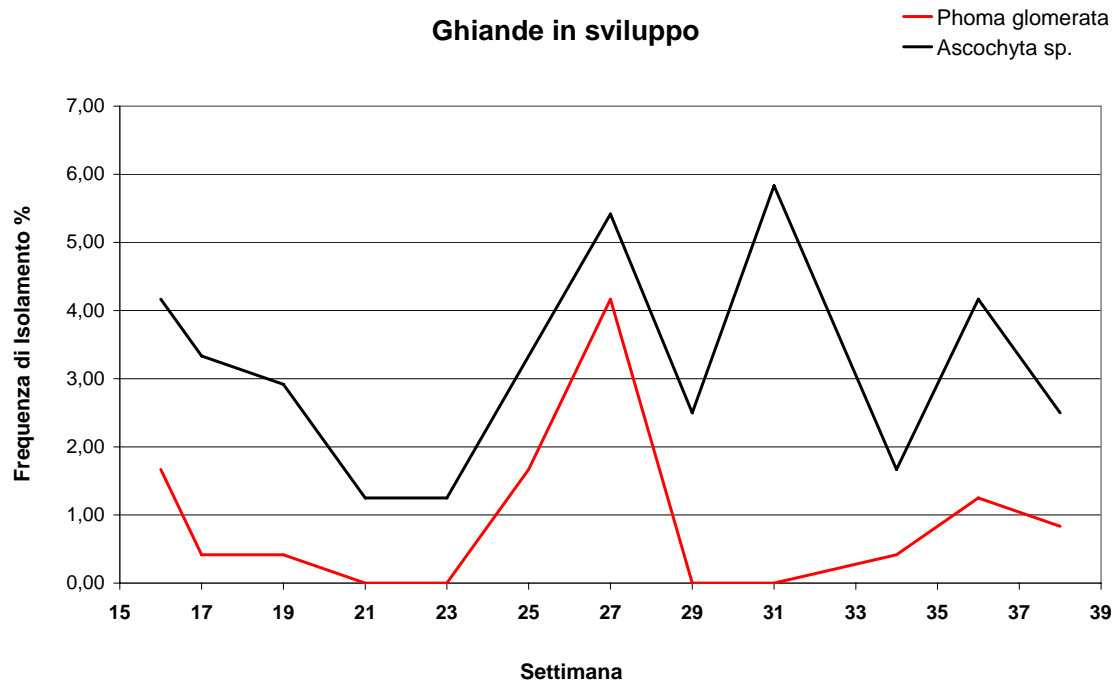


Fig. 46. – Frequenza di isolamento di *P. glomerata* e *Ascochyta* sp.

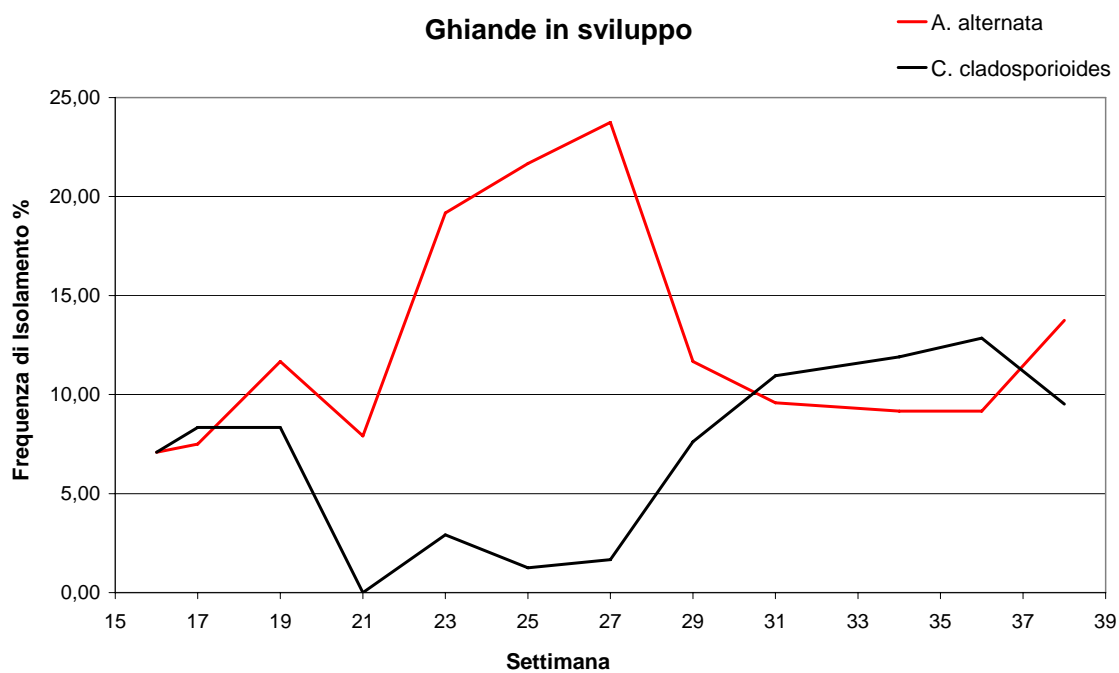


Fig. 47. – Frequenza di isolamento di *A. alternata* e *C. cladosporioides*

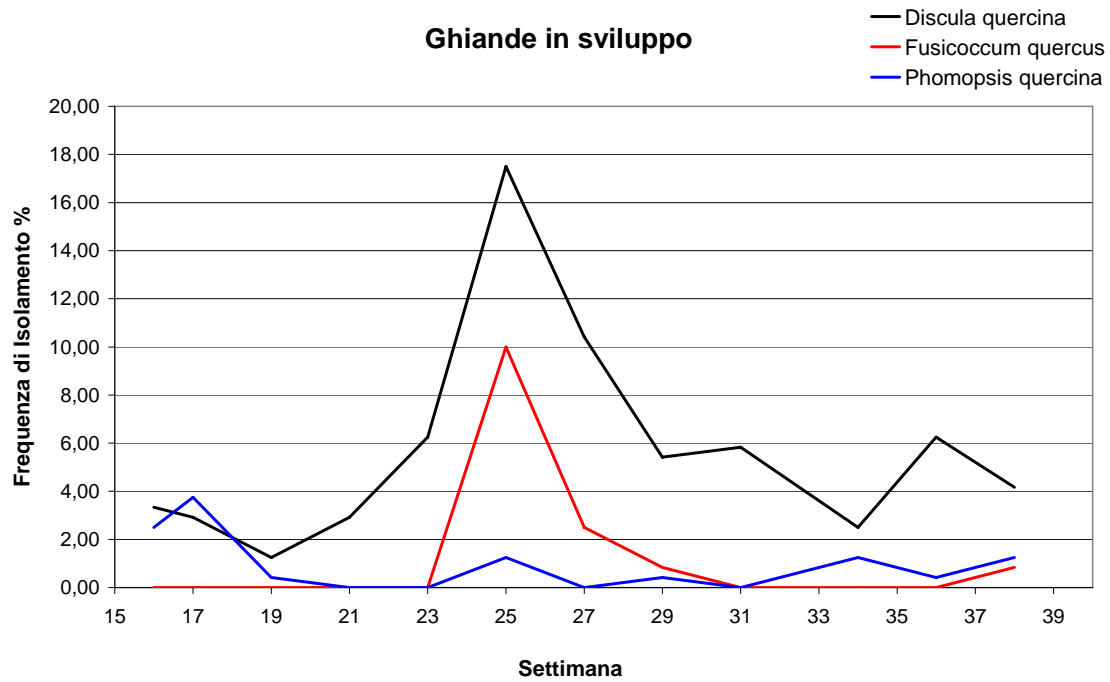


Fig. 48. – Frequenza di isolamento di *D. quercina*, *F. quercus*, *P. quercina*.

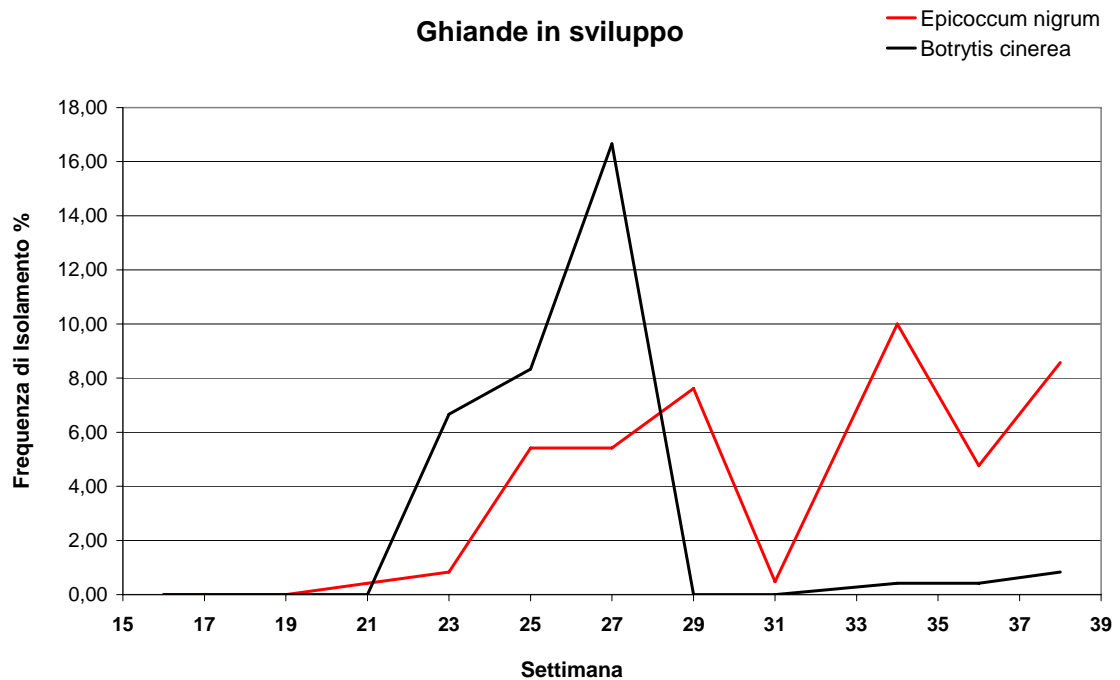


Fig. 49 – Frequenza di isolamento di *E. nigrum* e *B. cinerea*.

Non si hanno isolamenti relativi alla specie *Botrytis cinerea* dalla prima fino alla 23° settimana di raccolta delle ghiande, momento in cui la sua presenza d'inoculo passa dal 7% circa a poco più del 16%, durante i due mesi di giugno e luglio, per poi scomparire nelle successive settimane (Fig. 49).

Epicoccum nigrum, al contrario, segue un andamento crescente tendenzialmente costante. Le frequenze sono ridotte a zero nelle prime due settimane di raccolta, per iniziare ad aumentare a partire dalla 23°. Raggiunge il 10% di frequenza di isolamento solo alla 35° settimana, tra il mese di settembre e di ottobre (Fig. 49).

Relativamente al genere *Fusarium* si riscontrano quattro specie principali: *F. graminearum*, *F. solani*, *F. verticillioides* ed *F. proliferatum*. In figura 53 si evidenzia l'andamento discontinuo delle prime due specie. *F. graminearum* è presente a partire dalla 25° settimana con una frequenza massima alla 29°, di quasi il 3%, e due picchi inferiori all'1,5% circa alla 25° e alla 35° settimana.

F. solani denota un andamento simile al precedente, tuttavia maggiormente distribuito nel tempo e con frequenze di isolamento decisamente inferiori. È presente in 6 delle 12 settimane di raccolta ed è più abbondante in corrispondenza della 27° settimana, nel mese di luglio (Fig. 50).

Per *F. verticillioides* e *F. proliferatum* si riscontra la loro presenza su un numero notevolmente ridotto di ghiande e spesso non sono stati isolati. Gli andamenti nel tempo sono risultano quasi uguali e sovrapponibili tra loro, ad eccezione per un aumento improvviso delle frequenze di isolamento di *F. proliferatum* a fine maturazione delle ghiande (Fig. 51).

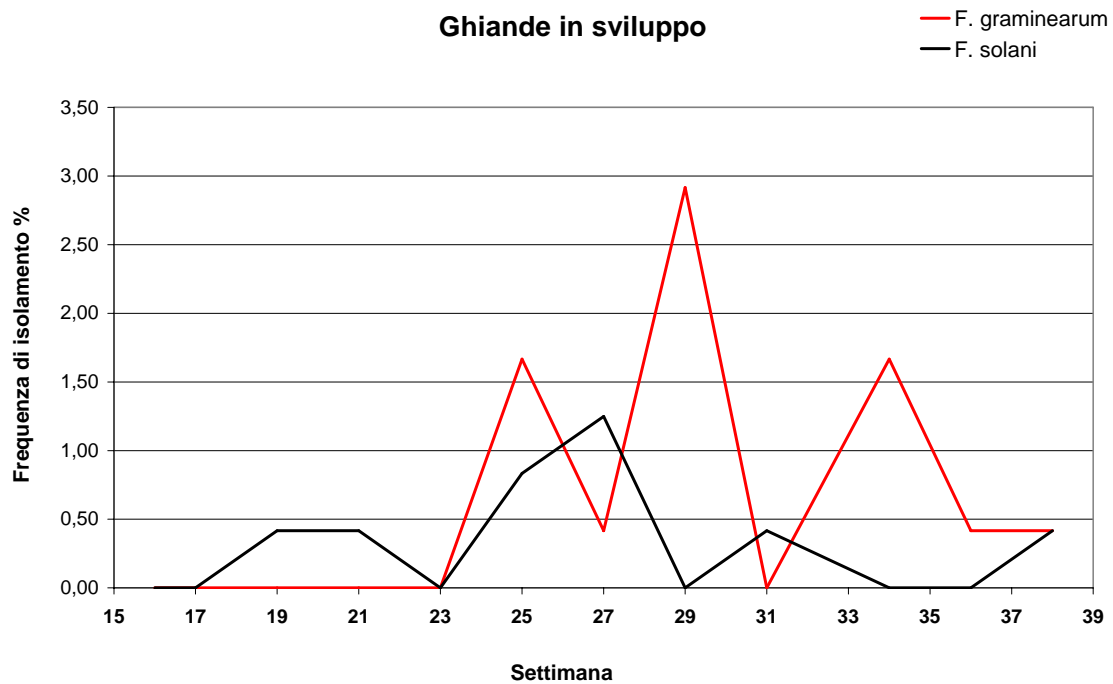


Fig. 50 – Frequenza di isolamento di *F. graminearum* e *F. solani*

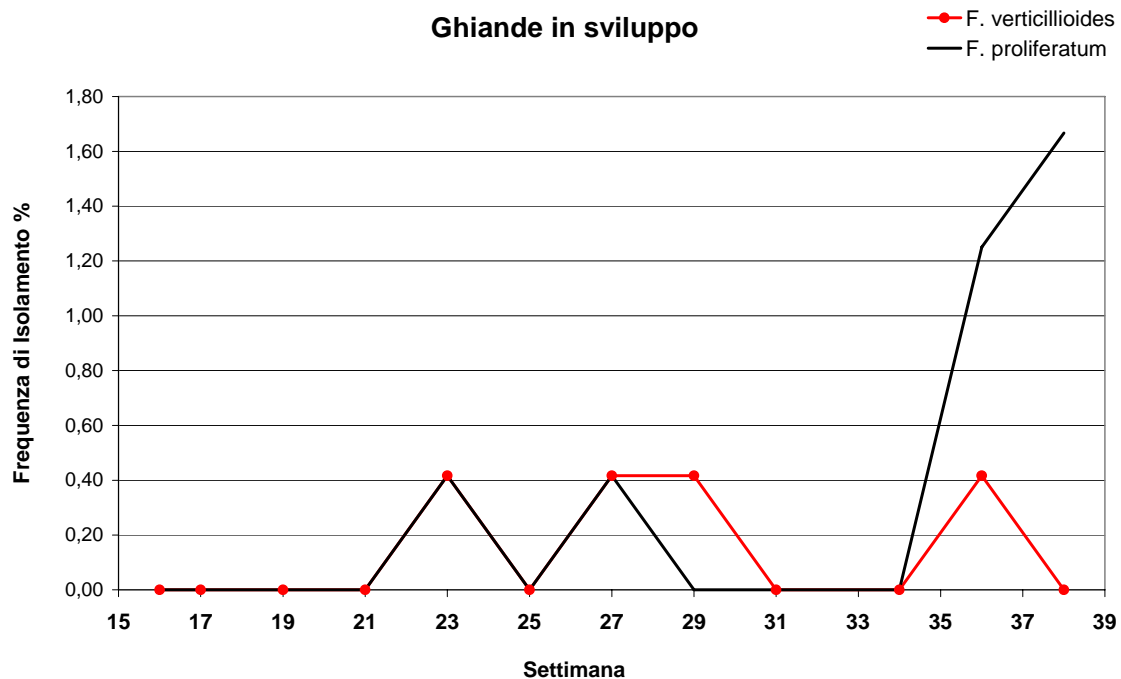


Fig. 51 – Frequenza di isolamento di *F. verticillioides* e *F. proliferatum*.

In relazione agli isolamenti effettuati da ghiande in ultima fase di sviluppo (dalla 29° alla 38° settimana), vengono di seguito distinti, per alcune specie fungine, i valori delle frequenze di isolamento nel contesto di ogni tipo di tessuto indagato, interno, esterno e residuo del carpello florale, settimana per settimana. I valori calcolati di χ^2 per i confronti statistici effettuati sono riportati in *tab. 18*.

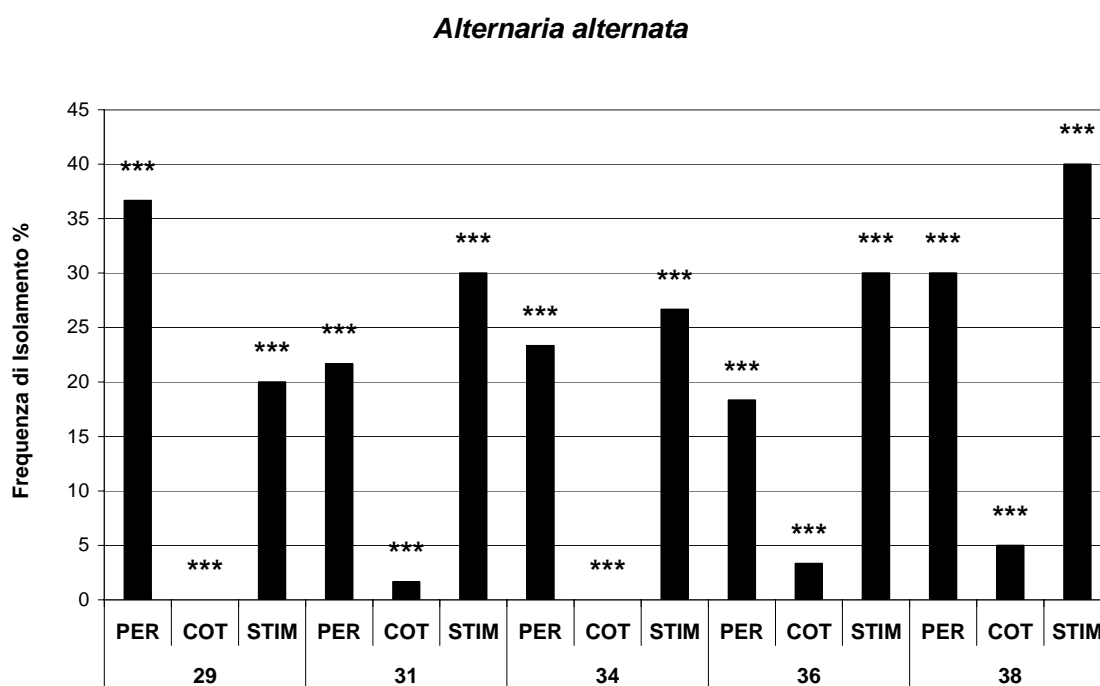


Fig. 52 – Frequenza di isolamento di *A. alternata* in relazione ai tessuti della ghianda (*: significativo; **: molto significativo; ***: altamente significativo).

Per la specie fungina *Alternaria alternata*, la più frequente tra le specie isolate, i dati relativi alle frequenze di isolamento nei tessuti delle ghiande campionate sono riportati in *Fig. 52*. In ciascuna settimana si osservano valori molto bassi, che non superano il 5% di isolamenti ottenuti dai tessuti cotiledonali interni, non paragonabili ai più elevati valori riscontrati per la parte esterna, variabili dal 22% circa al 35% circa. La presenza di *A. alternata* risulta importante anche nel caso degli stimmi, variando tra il 20% ed il 30% mediamente, con un picco del 40% alla 38° settimana.

Ascochyta sp.

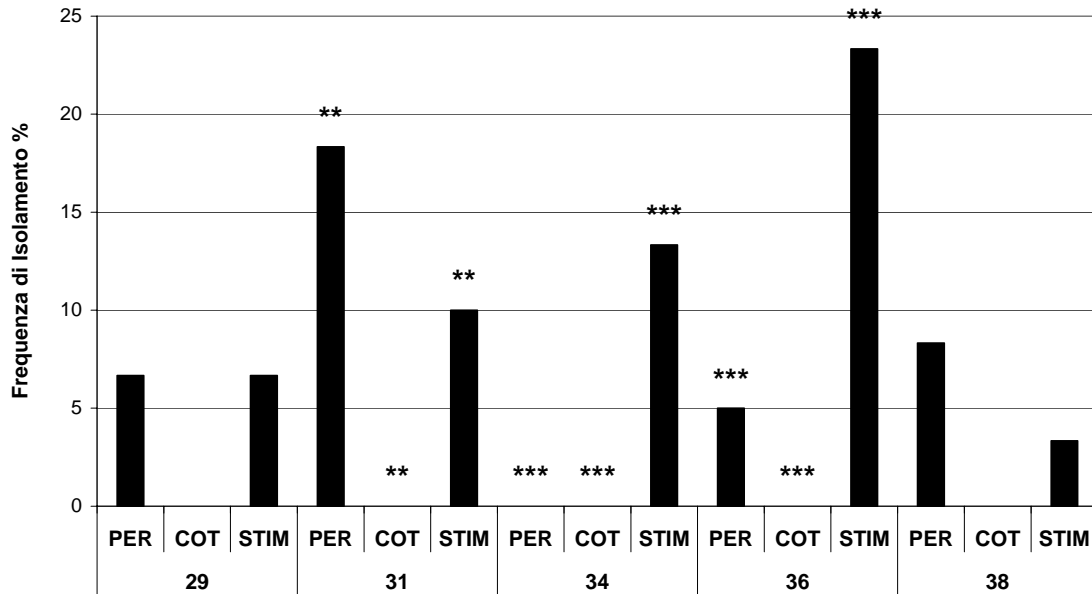


Fig. 53 – Frequenza di isolamento di *Ascochyta sp.* in relazione ai tessuti della ghianda (*: significativo; **: molto significativo; ***: altamente significativo).

Per *Ascochyta sp.* non si riscontrano differenze statisticamente significative il livello di isolamento nei tre tessuti nel caso della 29° e 38° settimana. Tuttavia, nelle tre settimane di luglio ed agosto si può osservare la presenza di questo fungo sia nulla nei tessuti cotiledonali e variamente distribuita tra pericarpo e stimma residuo: nella 31° settimana la quantità di inoculo fungino nel pericarpo supera quello nello stimma di il 18%, nelle successive due settimane l'inoculo risulta maggiormente presente sullo stimma con il 13% alla 34° settimana ed il 23% alla 36° (Figura 53).

In Fig. 54 sono rappresentate le frequenze di isolamento relative alla seconda specie più frequente sulle ghiande non ancora mature, *Cladosporium cladosporioides*, dalle quali si ricavano confronti significativi in tutte le settimane esaminate, con livelli di significatività diversi. Molto significative risultano le differenze date dai più alti valori ottenuti da pericarpo nelle settimane 29 e 34, rispetto a quelli relativi allo stimma seguito dai tessuti cotiledonali. Significative anche le differenze nella 3° settimana, ed altamente significative quelle relative alle ultime due settimane, durante le quali la frequenza di

isolamento dai cotiledoni non varia e rimane confinata all'1,67%, mentre la frequenza di *C. cladosporioides* raggiunge il 25-26% e gli isolamenti dagli stimmi arrivano ad un massimo del 33% nella penultima settimana (Figura 54).

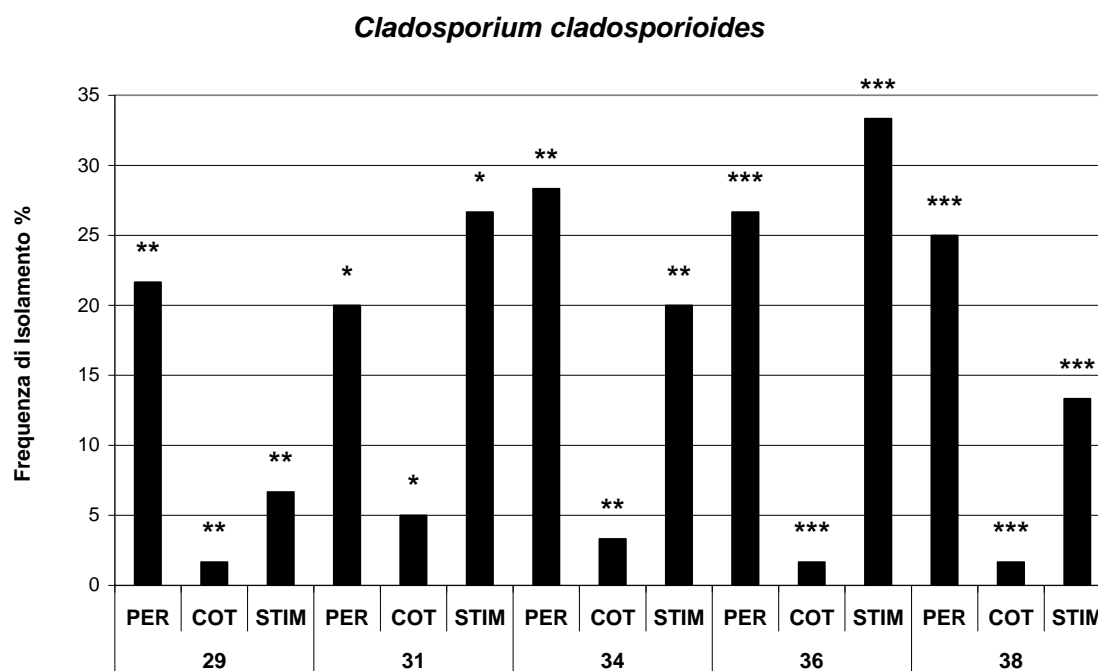


Fig. 54 – Frequenza di isolamento di *C. cladosporioides* in relazione ai tessuti della ghianda (*: significativo; **: molto significativo; ***: altamente significativo).

Discula quercina risulta la terza specie più frequente tra quelle isolate ed è presente durante il corso di tutte le settimane prese in esame. Isolata raramente dai tessuti cotiledonali, si riscontrano presenze maggiori nei pericarpi e nello stimma. Differenze molto significative si riscontrano tra questi tessuti durante la 29° settimana, con frequenze di isolamento dell'8% su pericarpo e del 23% nello stimma; durante la 31° settimana, 15% e 16% rispettivamente; durante la 34° settimana, con frequenza inferiore su pericarpo (3% circa) rispetto allo stimma (13%). La presenza di inoculo di *D. quercina* è maggiormente concentrato sui pericarpi, la cui frequenza di isolamento risulta altamente differente rispetto allo stimma residuo che raggiunge quasi il 7% (Fig. 55).

Discula quercina

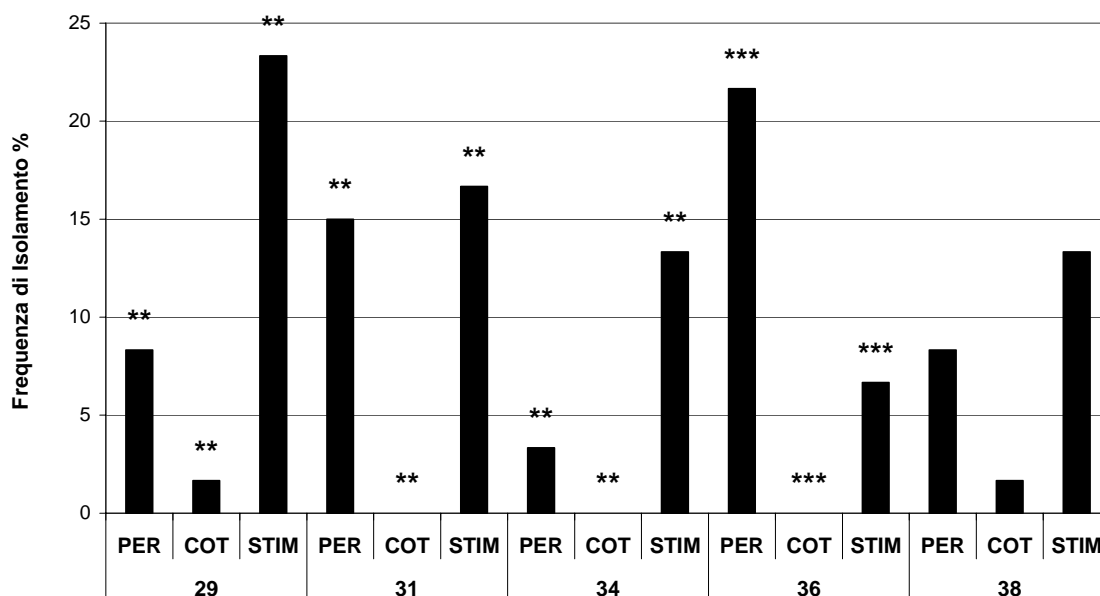


Figura 55 – Frequenza di isolamento di *D. quercina* in relazione ai tessuti della ghianda (*: significativo; **: molto significativo; ***: altamente significativo).

Epicoccum nigrum

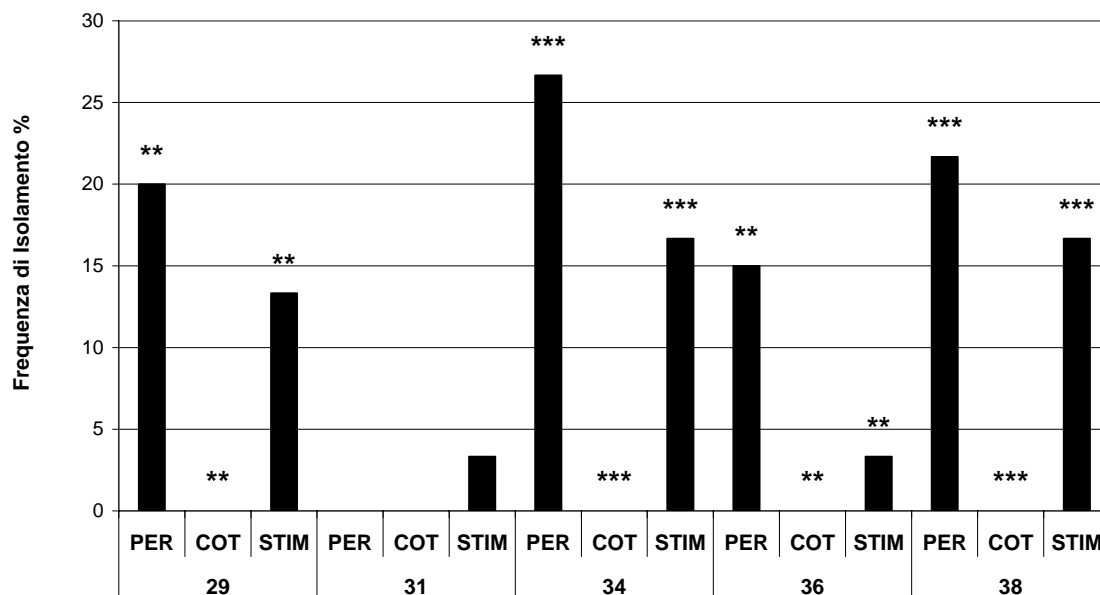


Figura 56 – Frequenza di isolamento di *E. nigrum* in relazione ai tessuti della ghianda (*: significativo; **: molto significativo; ***: altamente significativo).

La presenza di inoculo fungino della specie *Epicoccum nigrum* risulta discontinua nel tempo e completamente assente nei tessuti cotiledonali. Nella settimana tra fine luglio ed inizio agosto è stato isolato raramente rispetto agli altri mesi. Sempre presente sui tessuti esterni, sia pericarpo che stimma residuo, con frequenze di isolamento sempre maggiori nel primo tessuto. Nel pericarpo la frequenza varia dal 20% al 26,6% nella 34° settimana, nello stimma i valori più alti si riscontrano alla 29° settimana (13%), alla 34° e 38° (16%) (Fig. 56).

Frequenze di isolamento più basse si riscontrano per le specie fungine *Scopulariopsis asperula* e *Sporothrix* sp. (Figg. 57 e 58).

Sporothrix sp. è stato isolato principalmente nel corso delle ultime settimane estive, da ciascun tessuto considerato nella 36° settimana, senza differenze significative evidenti, ed esclusivamente dai tessuti cotiledonali nella 38° settimana con una frequenza massima del 10%. *Scopulariopsis asperula* è stato isolato sporadicamente durante tutta la stagione vegetativa osservata, con eccezione per la 36° settimana in cui la frequenza di isolamento raggiunge il 12% circa sui tessuti esterni delle ghiande in maturazione.

Phomopsis quercina e *Fusicoccum quercus* risultano assai rari nelle ghiande in fase di maturazione, come evidenziato nelle figg. 59 e 60. Entrambe le specie fungine sono state isolate quasi esclusivamente dai tessuti esterni dei semi, con frequenze massime tra il 4% ed il 5%. A causa dei dati poco numerosi non sono state riscontrate differenze significative tra la presenza del fungo sui tessuti interni o esterni alla ghianda.

Sporothrix sp.

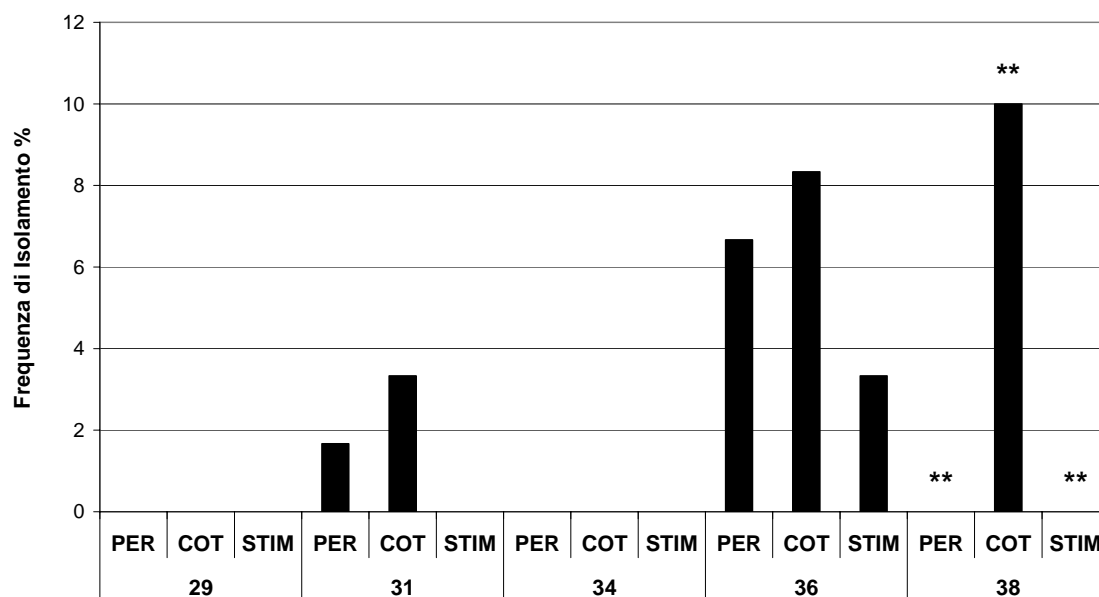


Figura 57 – Frequenza di isolamento di *Sporothrix sp.* in relazione ai tessuti della ghianda (*: significativo; **: molto significativo; ***: altamente significativo).

Scopulariopsis asperula

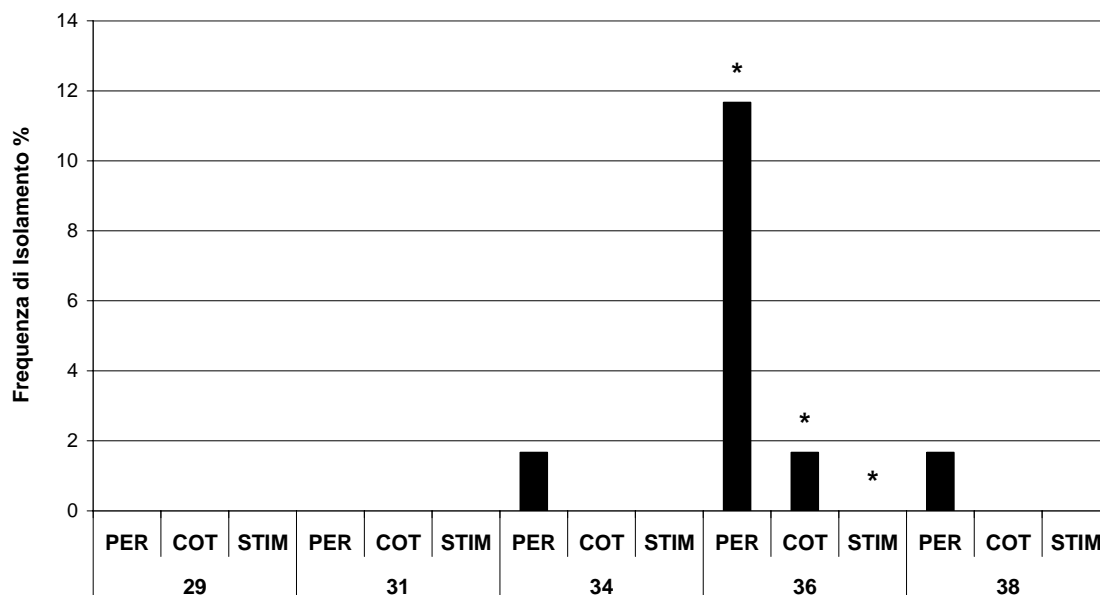


Figura 58 – Frequenza di isolamento di *S. asperula* in relazione ai tessuti della ghianda (*: significativo; **: molto significativo; ***: altamente significativo).

Phomopsis quercina

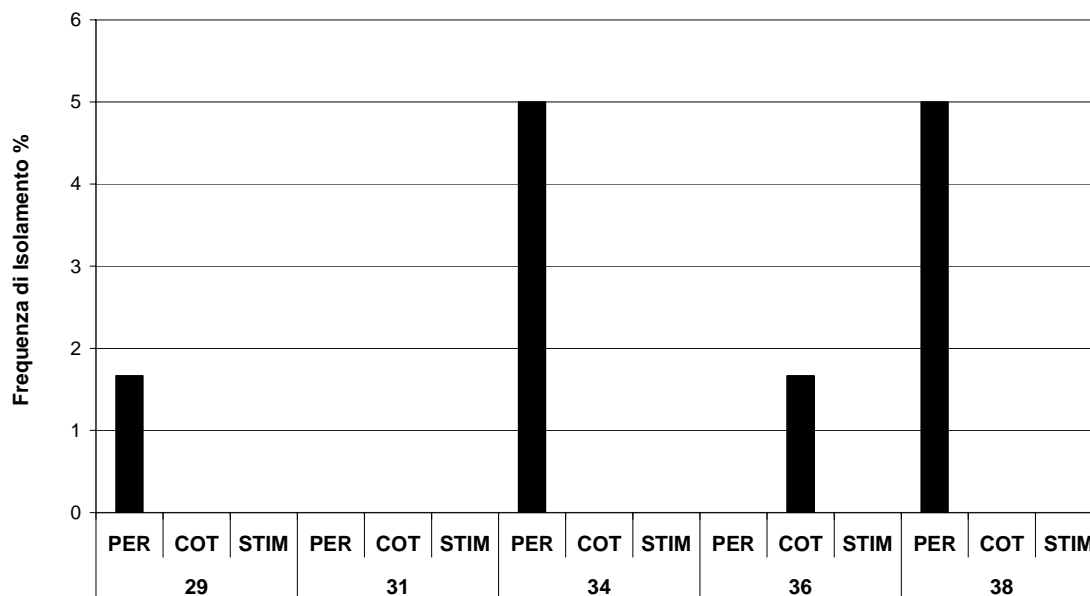


Figura 59 – Frequenza di isolamento di *P. quercina* in relazione ai tessuti della ghianda (*: significativo; **: molto significativo; ***: altamente significativo).

Fusicoccum quercus

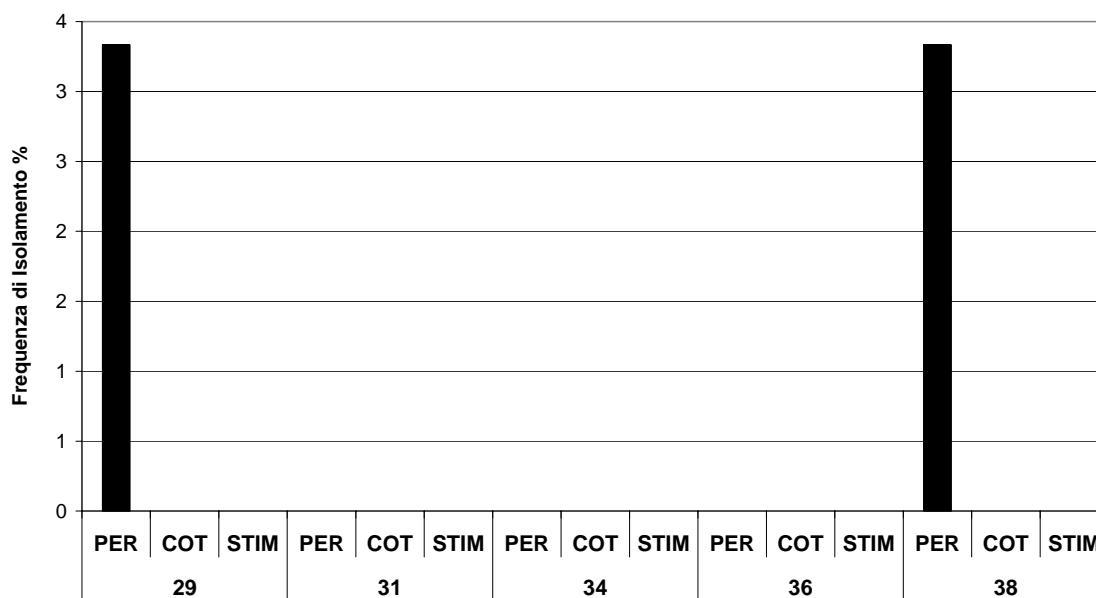


Figura 60 – Frequenza di isolamento di *F. quercus* in relazione ai tessuti della ghianda (*: significativo; **: molto significativo; ***: altamente significativo).

Discussioni

La ricerca condotta è stata suddivisa in tre parti che comprendono:

- a) l'analisi della popolazione fungina caratterizzante i tessuti interni ed esterni di semi di *Q. robur* maturi, disseminati naturalmente dalla pianta madre;
- b) l'analisi della micoflora interna ed esterna di ghiande in fase di sviluppo, a partire dalla fecondazione dell'ovulo fino alla fase di pre – disseminazione;
- c) uno studio sui microrganismi fungini colonizzanti i tessuti di semenzali originati da semina artificiale di ghiande in condizioni controllate.

Il campionamento dei semi nella prima parte della ricerca è stato diviso in sezioni e sottosezioni, che prevedevano raccolte di ghiande mature, lasciate cadere a terra o su una rete sospesa, in tre intervalli di tempo rispetto al momento dell'abscissione naturale. Nel complesso di tutte le ghiande campionate sono stati isolati 39 generi fungini diversi, tra i quali i maggiormente frequenti sono risultati *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. ed *Epicoccum* spp.

I semenzali allevati artificialmente sono stati suddivisi nelle stesse sezioni di campionamento relative alle ghiande di origine; nello specifico in semenzali provenienti dalla raccolta da terra o da rete, dopo 1, 6 o 12 giorni. Ciascuna giovane pianta è stata analizzata in più organi vegetali: gli apici radicali, il fittone, il fusto e le foglie basali ed apicali. Nel complesso sono stati isolati 43 generi fungini, tra cui *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Trichoderma* spp., hanno mostrato le maggiori frequenze.

Le giovani ghiande raccolte direttamente dalla pianta madre e ancora in fase di sviluppo, sono state indagate nel corso dell'intera stagione vegetativa e da queste si sono ottenuti complessivamente 42 generi fungini con maggiori presenze riscontrate per *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. e *Discula* spp.

Nel contesto dello studio delle ghiande mature non si sono riscontrate differenze tra il grado di contaminazione di semi provenienti da terra rispetto a quelli provenienti da rete, tuttavia, considerando il periodo in cui le ghiande sono rimaste su terra o su rete si è potuto notare come la quantità di ghiande colonizzate da almeno un organismo fungino aumentasse passando dal primo al sesto giorno di permanenza, per poi stabilizzarsi fino al

dodicesimo. Inoltre, inferiore è risultato in livello di contaminazione di ghiande che avevano avuto un contatto con il terreno durato uno e sei giorni rispetto ai semi caduti su rete, caratteristica questa riscontrata esclusivamente per il primo anno di prova e quindi da ritenersi causale o da confermare. Ciò che è risultato costante è il fatto che nel 100% circa delle ghiande campionate il pericarpo risulta colonizzato da almeno un specie fungina, sia per semi che hanno avuto contatto con il terreno sia per altri che non lo hanno avuto. Diverso è risultato, invece, il comportamento dei tessuti interni, i cotiledoni, per i quali è stato possibile isolare un organismo fungino solo per il 60-80% delle ghiande raccolte, con differenze tra il grado di contaminazione di terra ed il grado di contaminazione di rete non avvalorati nella prova del secondo anno. Sono stati osservati, quindi, i dati relativi alla numerosità dei generi fungini presenti nei diversi campioni esaminati in riferimento alle due parti della ghianda, interna ed esterna, e alle modalità di raccolta. I risultati hanno mostrato come il numero di generi fungini isolati non sia influenzato dalla modalità di raccolta e neppure dal tessuto considerato.

Successivamente, è stata posta attenzione anche alla suddivisione dei campioni secondo i tre diversi intervalli di tempo entro cui le ghiande sono rimaste a terra o su rete. Queste osservazioni hanno sottolineato ancora una volta come il grado di contaminazione della parte esterna dei semi sia sempre del 100% circa, indipendentemente da quanto tempo le ghiande permangono in contatto con l'ambiente esterno ed in che modo. Per quanto riguarda i tessuti cotiledonali, invece, le numerosità dei tessuti colonizzati da almeno un organismo fungino è risultata mediamente inferiore rispetto al pericarpo, ma non hanno mostrato di seguire un andamento temporale specifico in entrambe le annate di osservazione.

Le ghiande ancora in fase di sviluppo, considerate nella loro completezza, raggiungono alti gradi di contaminazione solo nel pieno della stagione estiva, quando l'inoculo fungino presente nell'ambiente è positivamente influenzato dalle condizioni climatiche. I tessuti meno colonizzati risultano sempre i cotiledoni interni, seguiti poi dal pericarpo in formazione. Ciò che risulta evidente è, invece, come la maggior quota di contaminazione sia da imputare al carpello florale residuo che permane sulla ghianda per tutto il ciclo vitale. Questa caratteristica è stata osservata nel corso di tutta la seconda parte

della prova, quando cioè le ghiande avevano raggiunto approssimativamente un incremento dimensionale pari a zero.

Si è ritenuto opportuno, in seguito, analizzare il comportamento di alcune specie fungine nell'ambito delle ricerche effettuate, per cercare di capire quale fosse la loro effettiva presenza nei semi e successivamente nei semenzali, considerando gli organismi fungini che presentavano le maggiori frequenze di isolamento, quelli coinvolti nel deperimento delle querce in qualità di endofiti o i funghi che fossero considerati seedborne da fonti bibliografiche.

Alternaria alternata ha un comportamento tipicamente saprofita ed è una specie comune nel suolo e su organi vegetali senescenti o in via di degradazione, inoltre è segnalata in infezioni latenti di frutti durante la fase di maturazione ed in materiale di propagazione (4). In certe situazione può essere un patogeno che segue la via del polline, per il quale le spore permangono sullo stimma e germinano accrescendosi all'interno dello stilo, infettando l'ovario e stabilendosi all'interno dei semi (73). Sulle ghiande campionate è risultato tra le specie più frequentemente isolate e sempre presente sul pericarpo esterno delle ghiande, maggiormente su quelle che hanno avuto un contatto con il terreno. E' stata isolata anche nei tessuti interni dei semi maturi, sebbene non si siano potute evidenziare differenze significative tra interno ed esterno. Nel corso della stagione vegetative, la frequenza di isolamento è risultata molto elevata anche nelle ghiande in via di sviluppo, con una maggior frequenza di inoculo tra il mese di giugno e luglio. Anche in queste strutture vegetali è stata sempre osservata nel pericarpo esterno, tuttavia è da considerarsi praticamente assente nei cotiledoni interni. Ciò che è stato riscontrato è stata la sua alta frequenza nello stimma florale residuo nel corso di tutta la stagione primaverile ed estiva. Dai semenzali è stata isolata prevalentemente dal giovane fusto, e secondariamente dagli apparati radicali e dalle foglie anche se in maniera assolutamente discontinua e non riconducibile ad alcuna relazione con le frequenze di isolamento di questa specie relative alla quota di ghiande mature campionate.

Epicoccum nigrum è un microrganismo terricolo ed è anche un tipico contaminante del pericarpo di ghiande. Nel contesto delle ghiande mature è stato isolato più frequentemente dai campioni raccolti da terra ed è stata verificata la sua maggior presenza

sul pericarpo esterno, piuttosto che nei cotiledoni, anche se in molti casi non è stata riscontrata alcuna differenza tra la quota di inoculo presente internamente e la quota presente esternamente. Ciò porta a pensare che esso sia una specie contaminante ubiquitaria. Inoltre, è una specie che risulta presente già dal primo giorno di raccolta. L'inoculo fungino di questa specie ha evidenziato un aumento durante gli ultimi mesi estivi sulle ghiande in fase di maturazione, e quote abbastanza ridotte a primavera inoltrata. Nonostante sia, come detto, un fungo tipicamente terricolo, la sua presenza è stata verificata anche sul pericarpo di ghiande mai cadute al suolo, con valori elevati. non è un fungo in grado di colonizzarne i cotiledoni interni ma è sempre presente sullo stemma residuo. E' ipotizzabile, quindi, che non sia da ritenersi un fungo che segue la via del polline, in quanto non è in grado di raggiungere le parti più interne della ghiande, nonostante sia frequentemente presente sul tessuto carpellare residuo. Non si può escludere, tuttavia, che il suo micelio necessiti di un maggior intervallo di tempo per diffondersi internamente, in quanto assai spesso è stato isolato dai cotiledoni di ghiande mature. Oppure si può pensare che penetri all'interno attraverso le microfratture che subiscono normalmente i pericarpi delle ghiande. Sui diversi organi dei semenzali allevati in condizioni artificiali, questa specie è stata sporadicamente isolata dalle radici e dalle foglie, ed è risultata assente dal fusto.

Il genere *Fusarium* spp. è risultato tra i più frequenti nelle ghiande mature e nei semenzali allevati. Le specie maggiormente rappresentative risultano essere *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides* e *F. graminearum*, quest'ultimo soprattutto nelle ghiande in maturazione. In particolare *Fusarium solani* è una specie seedborne frequente nell'embrione e contaminante del pericarpo delle ghiande. Ciò è dimostrato dagli isolamenti effettuati da semi maturi, sul pericarpo dei quali è risultato presente con frequenze variabili nel pericarpo di ghiande raccolte sia da terra che da rete, che non sembrano essere influenzate da un avvenuto contatto con il terreno. E' una specie presente spesso anche nei tessuti cotiledonali, indipendentemente dall'intervallo di tempo in cui la ghianda è rimasta a contatto con il suolo o sulla rete di raccolta. Sulle giovani ghiande non mature, questa specie fungina è stata osservata con frequenze assai limitate, che tuttavia si concentrano nel mese di luglio. Gli organi vegetali maggiormente interessati sono risultati il fusto e l'apparato radicale, con sporadiche presenze sulle foglie esaminate. E' possibile

pensare, quindi, che questa specie entri in contatto con il seme attraverso spore presenti nel terreno e nell'aria e che accompagni la ghianda nella germinazione e nell'accrescimento.

Fusicoccum quercus, *Discula quercina* e *Phomopsis quercina* sono tipicamente considerati endofiti delle querce.

Fusicoccum quercus è stato isolato frequentemente sulle ghiande mature, ma anche per questa specie non è possibile descrivere particolari relazioni in riferimento al tempo di permanenza e all'influenza che può esistere tra il contatto con il terreno o l'assenza di tale contatto. E' una specie che è stata riscontrata indistintamente nei tessuti interni ed esterni delle ghiande. Sulle giovani ghiande è assai raro trovarne l'inoculo ed, in questo lavoro, è risultato assente sia nei cotiledoni che nello stimma residuo. Anche sui semenzali è risultato presente, sebbene in maniera discontinua, sul fusto e sulle radici e, secondariamente sulle foglie. In un solo caso la sua frequenza è risultata rilevante nei semenzali: per quelli originati da ghiande provenienti dalla raccolta su rete effettuata dopo un solo giorno dalla caduta dalla pianta madre. Successivamente, non è stata rilevata la presenza di inoculo fungino. Essendo i dati rilevati tanto discontinui e puntiformi, risulta complesso poter effettuare qualsiasi ipotesi sulle relazioni tra questa specie fungina e le ghiande di farnia.

Phomopsis quercina è tra le specie fungine dominanti nelle piante di farnia, colonizza generalmente i giovani rametti ed è considerato un parassita di debolezza. Sulle ghiande disseminate è stata riscontrata frequentemente sia su semi caduti a terra, sia su rete. Tuttavia, per questa specie non è possibile definire una relazione tra il tempo in cui una ghianda rimane sul letto di caduta. Al contrario è possibile affermare che è possibile rilevarne la presenza sia nei cotiledoni, sia, e soprattutto, nei tessuti esterni della ghianda, senza osservare particolari preferenze. Sui semenzali, invece, è una specie poco presente ed esclusivamente su radici e fusto e questa condizione si riflette anche sulle frequenze di isolamento ottenute da ghiande in sviluppo, estremamente basse per tutta la stagione vegetativa, riscontrabile soprattutto sul pericarpo esterno. E' possibile pensare, quindi, che *Phomopsis quercina* non sia un tipico organismo fungino di ghiande, nonostante sia considerato un endofita tipico delle querce.

Discula quercina sembra essere completamente assente da ghiande mature, dato che non è mai stata isolata, al contrario è risultata la terza specie più frequente su semi in fase di maturazione. L'inoculo fungino presente sulle giovani ghiande raggiunge elevate quantità

nel periodo giugno-luglio e decresce con l'avvicinarsi della stagione autunnale. Ciò che ha destato maggiormente l'interesse è stata l'osservazione di dati che hanno rivelato la presenza di questo fungo principalmente sullo stimma florale residuo, e secondariamente sui pericarpi. Mai, o quasi, è risultata presente sui cotiledoni interni. Sui semenzali, *D. quercina* è risultata ancora una volta piuttosto rara, concentrata soprattutto sul fusticino delle giovani piante.

Conclusioni

Tra le problematiche fitopatologiche forestali, una delle più complesse ed articolate è rappresentata dal deperimento del bosco, a causa delle ampie aree geografiche interessate, delle numerose specie vegetali forestali implicate e delle relative conseguenze negli ecosistemi forestali (87). Il deperimento riguarda in particolar modo il genere *Quercus* e risulta particolarmente allarmante in Europa centrale e nelle regioni mediterranee, tra cui anche l'Italia.

Il fenomeno, predisposto da vari fattori, sia intrinseci della pianta (corredo genetico, età), sia estrinseci e connessi alla stazione (condizioni edafiche e climatiche), viene innescato da condizioni di stress di varia natura ed intensità, tra cui l'azione di parassiti primari, gli inquinanti e lo stress idrico. Il deperimento si manifesta attraverso una articolata sintomatologia ad eziologia complessa, con l'intervento di parassiti di debolezza che incrementano progressivamente lo stato patologico delle piante.

Tra i fattori principalmente coinvolti nel fenomeno, intervengono nella fase avanzata del declino alcuni microrganismi fungini ad attitudine endofitica, in grado di colonizzare i tessuti vegetali senza provocare danni apparenti fino a quando non si realizza uno spostamento dell'equilibrio instaurato a favore del microrganismo (3, 7, 10, 12, 14, 15, 26, 34, 44, 45, 50, 52, 65, 66).

Petrini (1991) applica il termine "endofita" ad un *continuum* di organismi, un *continuum* di stati fisiologici, di strategie di sopravvivenza, di stadi di sviluppo ed evolutivi (14, 52). Anche la modalità di colonizzazione dell'ospite da parte degli endofiti attraversa un *continuum*, ed include funghi specializzati nell'occupare ogni nicchia all'interno di una pianta, altri che crescono intercellularmente e altri ancora intracellularmente, oltre a quelli che presentano specificità per organo (14, 50, 52). Ancora, alcuni crescono esclusivamente endofiticamente e altri anche epifiticamente (14, 50).

La trasmissione verticale del fungo endofita avviene attraverso i semi dell'ospite, soprattutto nel caso di piante erbacee, dal quale entra nel giovane semenzale e si diffonde poi nei tessuti della nuova pianta (45, 50). Nel caso di piante arboree questo tipo di trasmissione è stata poco studiata e, generalmente, il fungo viene disperso da pianta a pianta piuttosto che da tessuto a tessuto (45, 52). Tuttavia, Saikkonen *et al.* (1998) affermano che

“poiché sono stati rivelati funghi endofiti in semi di piante legnose e in ghiande essi possono essere trasmessi anche verticalmente e maternamente via seme” (52).

Il presente lavoro ha avuto quale obiettivo fondamentale una possibile descrizione preliminare dello stato della popolazione fungina presente su semi di *Q. robur* L, considerando tutti gli stadi di sviluppo delle ghiande nel tempo. l'eventuale influenza che possono subire dalla microflora terricola, e le possibili differenze tra funghi seedborne interni ed esterni. Successivamente, è stata posta l'attenzione anche su giovani semenzali allevati con lo scopo di verificare se alcuni dei microrganismi fungini presente sulle ghiande venissero osservati anche sui tessuti vegetali, a partire dagli apici radicali fino alle foglie.

I risultati mostrano che la quota principale della popolazione fungina presente sulle ghiande è costituita da microrganismi ubiquitari, terricoli, saprofiti ed antagonisti, come nel caso dei generi *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria* ed *Epicoccum*. E' stato possibile verificare inoltre la presenza di alcune specie fungine endofitiche tipiche delle querce, come *Phomopsis quercina* rilevato quasi esclusivamente su ghiande che hanno completato lo sviluppo, *Fusicoccum quercus*, isolato dai tessuti interni ed esterni di ghiande mature e da fusto e radici dei giovani semenzali, e *Discula quercina* presente assai frequentemente sui semi in piena fase di sviluppo.

Ciò che non è stato possibile verificare è stata la presenza di ogni singola specie fungina in relazione al tempo e allo spazio relativo alle ghiande in esame. Le situazioni riscontrate si sono rivelate altamente eterogenee da specie a specie e spesso mancanti di dati fondamentali distribuiti su tutta la prova.

Il dato che ci si aspettava di confermare era una maggior presenza fungina su ghiande che avessero avuto un contatto con il terreno per un periodo di tempo più o meno lungo, e sui rispettivi semenzali allevati. Al contrario, sembra non ci sia alcun stretto legame tra il terreno e la presenza di funghi interni ed esterni alla ghianda e non sono state confermate differenze a livello di contaminazione per semi maturi di età diverse. Il solo dato che è apparso costante è la differenza quantitativa di inoculo fungino presente sul pericarpo esterno e nei cotiledoni interni.

A questo proposito, importante è risultato il lavoro svolto nel contesto dei semi che ancora non avevano raggiunto la maturità. Da esso, infatti, il dato fondamentale riscontrato è che

tutta la popolazione fungina isolata è distribuita esclusivamente sul pericarpo esterno e, maggiormente, su una parte estremamente piccola della ghianda, costituita dal residuo del carpello florale, che potrebbe rappresentare una via di collegamento tra l'interno e l'esterno del seme. Nei cotiledoni, in realtà, risulta relativamente bassa la probabilità di isolare organismi fungini.

Questo aspetto non è da ritenersi discordante con gli esiti ottenuti dalle ghiande mature, poiché per queste ultime lo stimma residuo è stato erroneamente tralasciato, e durante i processi di laboratorio esso poteva permanere indistintamente sul pericarpo oppure sulla parte apicale di un cotiledone alterando i risultati finali.

Per il lavoro svolto sui semenzali, i risultati ottenuti, sebbene provenienti da numerosi dati raccolti, sono apparsi discontinui ed eterogenei, non utilizzabili per definire se uno o più organismi fungini presenti sulla ghianda in un certo momento risultassero presenti anche sul semenzale. In questo ambito, potrebbe essere fondamentale modificare il protocollo di lavoro, spostando l'attenzione su ricerche mirate ai singoli tessuti, alla localizzazione del fungo sul parenchima fogliare piuttosto che sul floema del fusto ad esempio, con strumenti di tecniche molecolari e di microscopia più specifici.

Infine, è possibile affermare che molti dei microrganismi fungini isolabili dalle ghiande sono presenti sullo stimma florale residuo e, secondariamente, sul pericarpo esterno. Tuttavia, i dati qui riportati sono frutto di solo due stagioni di ricerca. E' auspicabile, quindi, prolungare le osservazioni iniziate, soprattutto per quanto riguarda la fase florale, quella di post- fecondazione e di sviluppo dell'ovario, indagando microscopicamente la localizzazione reale degli organismi fungini nei diversi tessuti che costituiscono il fiore e la ghianda, e porre attenzione ad eventuali accrescimenti da tessuto a tessuto dei funghi colonizzanti. In questo modo, si potrebbe verificare se, per certe specie fungine magari endofitiche, avvenga o meno una trasmissione verticale dell'inoculo da pianta madre al seme, e dal seme al nuovo semenzale.

BIBLIOGRAFIA

1. PAMMENTER N. W., BERJAK P., (2000) – *Some thoughts on the evolution and ecology of recalcitrant seeds*. *Plant Species Biology*, 15:153-156
2. GRANITI A., (2002) – *L'endofitismo nei funghi: un adattamento ecologico o un modo di vita?* In: “L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive”, Sassari, 19-21 Maggio 2002, pp. 11-22
3. ANSELMINI N., CAPRETTI P., CELLERINO G.P., FRANCESCHINI A., GRANATA G., LUISI N., MARRAS F., MAZZAGLIA A., MUTTO ACCORDI S., RAGAZZI A., VANNINI A., (2002) -. *Studi sull'endofitismo di patogeni fungini di debolezza implicati nel deperimento delle querce in Italia*. In: “L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive”, Sassari, 19-21 Maggio 2002, pp. 43-59
4. SARACCHI M., QUARONI S., (2002) – *Ricerche su alcuni aspetti della variabilità di ceppi endofiti di Alternaria alternata*. In: “L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive”, Sassari, 19-21 Maggio 2002, pp. 169-182
5. RAGAZZI A., MORICCA S., CAPRETTI P., DELLAVALLE I., MANCINI F., TURCO E., (2002) – *Endofiti fungini di Quercus cerris: frequenza temporale di isolamento in piante asintomatiche*. In: “L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive”, Sassari, 19-21 Maggio 2002, pp. 269-282
6. GENNARO M., GONTHIER P., CELLERINO G. P., (2002) – *Funghi endofiti isolati in nord Italia da farnia e cerro sani e deperienti*. In: “L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive”, Sassari, 19-21 Maggio 2002, pp. 283-292

7. RAGAZZI A., (2004) – *Endophytism: knowns and unknowns of an age-old phenomenon*. In: “Endophytism in forest trees”, A. Ragazzi, S. Moricca, I. Dellavalle, Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze 2004. Pp. 15-32
8. ANSELMINI N., CELLERINO G. P., FRANCESCHINI A., GRANATA G., LUISI N., MARRAS F., MAZZAGLIA A., MUTTO ACCORDI S., RAGAZZI A., (2004) – *Geographic distribution of fungal endophytes of Quercus sp. In Italy*. In: “Endophytism in forest trees”, A. Ragazzi, S. Moricca, I. Dellavalle, Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze 2004. Pp. 73-89
9. MADDAU L., FRANCESCHINI A., MARRAS F., (2004) – *Endophytic fungi of forest trees as a source of bioactive metabolites*. In: “Endophytism in forest trees”, A. Ragazzi, S. Moricca, I. Dellavalle, Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze 2004. Pp. 119-138
10. SIEBER T. N., (2007) – *Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?* Fungal Biology Reviews, 21:75-89
11. GENNARO M., GONTHIER P., NICOLOTTI G., (2003) – *Fungal endophytic communities in healthy and declining Quercus robur L. and Q. cerris L. trees in northern Italy*. Journal of Phytopathology, 151:529-534
12. SAIKKONEN K., (2007) – *Forest structure and fungal endophytes*. Fungal Biology Reviews, 21:67-74
13. CONNOR K., DONAHOO J., SCHAFER G., (2006) – *How does prolonged exposure to natural conditions affect acorn misture and viability*. General technical report southern research station. USDA Forest Service, (SRS-92): 251-254
14. SCHULZ B., BOYLE C., (2005) – *The endophytic continuum*. Mycological Research, 109 (6): 661-686

15. SCHULZ B., RÖMMERT A. K., DAMMANN U., AUST H. J., STRACK D.,(1999) – *The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?* Mycological Research, 103 (10): 1275-1283
16. BARBEDO C. J., BILIA D. A. C., (1998) – *Evolution of research on recalcitrant seeds.* Sci. Agric., 55: 121-125
17. CONNOR K. F., (2004) - *Update on oak seed quality research: hardwood recalcitrant seeds.* USDA Forest Service Proceedings RMRS-P-33. In: L.E. RILEY, R. K. DUMROESE, T. D. LANDIS, National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations – 2003.
18. FINCH-SAVAGE W. E., BLAKE P. S., CLAY H. A., (1996) – *Dessication stress in recalcitrant Quercus robur L. seeds results in lipid peroxidation and increased synthesis of jasmonates and abscisic acid.* Journal of Experimental Botany, 47 (298): 661-667
19. GELLINI R., GROSSONI P., (1997) – *Botanica Forestale II – Angiosperme.* Casa editrice CEDAM
20. RAGAZZI A., MORICCA S., DELLAVALLE I.,(2002) – *Current situation of oak decline in Italy and in other European countries.* Integrated Protection in Oak Forests. IOBS/wprs Bull. 25(5): 13-16
21. LUISI N., FRISULLO S., RAGAZZI A., (1988) – *Il deperimento della Quercia in Italia.* In: Prospettive di Valorizzazione delle Cerrete dell'Italia centro-meridionale. Ed. Regione Basilicata. Pp. 205-214
22. RAGAZZI A., DELLAVALLE I., MESTURINO L., (1989) – *The oak decline: a new problem in Italy.* Eur. J. For. Path. 19: 105-110

23. PAOLETTI E., (2000) – *Physiological aspects of oak decline*. In: RAGAZZI A., DELLAVALLE I., Decline of oak species in Italy – problems and perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali, FIRENZE 2000. Pp. 23-37

24. RAGAZZI A., MORICCA S., DELLAVALLE I., TURCO E.,(2000) – *Italian expansion of oak decline*. Decline of oak species in Italy – problems and perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali, FIRENZE 2000. Pp. 39-75

25. FRANCESCHINI A., CORDA P., MARRAS F., (2000) – *Fungi involved in oak decline*. In: RAGAZZI A., DELLAVALLE I., Decline of oak species in Italy – problems and perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali, FIRENZE 2000. Pp. 99-113

26. ANSELMINI N., MAZZAGLIA A., VANNINI A., (2000) – *The role of endophytes in oak decline*. In: RAGAZZI A., DELLAVALLE I., Decline of oak species in Italy – problems and perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali, FIRENZE 2000. Pp. 129-144

27. VANNINI A., (1990) – *Correlazioni tra alcuni parametri meteorologici e dendrocronologici e il deperimento delle querce*. Informatore Fitopatologico, 11: 59-61

28. SICOLI G., DE GIOIA T., LUISI N., LERARIO P.,(1998) – *Multiple factors associated with oak decline in southern Italy*. Phytopath. Mediter., 37: 1-8

29. LUISI N., MANICONE R. P., TROMBETTA N. M., CUSANO G.,(1995) – *Predisposizione di Querce mediterranee al deperimento in relazione alla loro resistenza alla siccità*. L'Italia Forestale e Montana, 1: 44-59

30. OSZAKO T., (2000) – *Oak declines in Europe's forest – history, causes and hypothesis*. In: OSZAKO T., DELATOUR C., Recent advances on oak health in Europe. Forest Research Institute, Warsaw. Pp. 11-40

31. LUISI N., MANICONE R., (1991) – *Il deperimento delle querce in Italia meridionale: tentativi di contenimento*. Italia Forestale e Montana, 5: 341-356
32. CAUSIN R., MONTECCHIO L., PAOLETTI E., FANCHIN G., MUTTO ACCORDI S., (2004) – *Colonization and modification of oak tissues invaded by *Biscogniauxia mediterranea* and *Diplodia mutila**. In: “Endophytism in forest trees”, Ragazzi A., Moricca S., Dellavalle I., Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze 2004. Pp. 91-104
33. RAGAZZI A., MORICCA S., CAPRETTI P., DELLAVALLE I., MANCINI F., TURCO E., (2001) – *Endophytic fungi in *Quercus cerris*: isolation frequency in relation to phenological phase, tree health and the organ affected*. Phytopathol. Mediterr., 40: 165-171
34. RAGAZZI A., MORICCA S., CAPRETTI P., DELLAVALLE I., TURCO E., (2003) – *Differences in composition of endophytic mycobiota in twigs and leaves of healthy and declining *Quercus* species in Italy*. Forest. Path., 33: 31-38
35. CAMPANILE G., CAMPANILE D., NIGRO M., MANNERUCCI F., RUSCELLI A., LUISI N., (2006) – *Prove preliminari di antagonismo di funghi endofiti contro *Diplodia corticola* e indicazioni gestionali per il contenimento del deperimento delle querce*. ForestA, 3(1): 78-85 Sezione Speciale Atti 5° Congresso SISEF: Foreste e Società – Cambiamenti, Conflitti, Sinergie.
36. LUISI N., FRISULLO S., MANNERUCCI F., (1990) – *Patogenicità di specie fungine associate al deperimento della quercia nell'Italia meridionale*. Atti del Convegno: Problematiche fitopatologiche del genere *Quercus* in Italia. Firenze. Pp. 99-103

37. BELISARIO A., MOTTA E., BIOCCA M., (1992) – *Occurrence and role of exudations in turkey oak decline in central Italy*. In: LUISI N., LERARIO P., VANNINI A., Recent advances in studies on oak decline, Selva di Fasano (Brindisi). Pp. 149-154
38. LUISI N., MANICONE R. P., SICOLI G., LERARIO P., (1990) – *Pathogenicity tests of fungi associated with oak decline on Quercus spp. seedlings grown at different water regimes*. In: LUISI N., LERARIO P., VANNINI A., Recent advances in studies on oak decline, Selva di Fasano (Brindisi). Pp. 85-93
39. SICOLI G., MANICONE R. P., LUISI N., GENTILE T. M., LERARIO P., (1992) – *A survey on declining oak woods in southern Italy*. In: LUISI N., LERARIO P., VANNINI A., Recent advances in studies on oak decline, Selva di Fasano (Brindisi). Pp. 509-518
40. RAGAZZI A., MORICCA S., CAPRETTI P., DELLAVALLE I., (1999) – *Endophytic presence of Discula quercina on declining Quercus cerris*. Journal of Phytopathology, 147, 437-440
41. ANSELMINI N., VANNINI A., MAZZAGLIA A., LIBRANDI I., (2001) – *L'endofitismo nei funghi patogeni forestali: l'esempio Biscogniauxia mediterranea*. Atti del XIV Convegno Nazionale di Micologia, Selva di Fasano, Brindisi.
42. CELLERINO G. P., GENNARO M., GONTHIER P., (2001) – *Caratterizzazione di comunità endofitiche fungine in farnia e cerro in differenti condizioni fitosanitarie*. Atti del XIV Convegno Nazionale di Micologia, Selva di Fasano, Brindisi.
43. RAGAZZI A., CAPRETTI P., MORICCA S., DELLAVALLE I., TURCO E., (2001) – *Endofiti di Quercus cerris: studio comparativo in piante sane e deperienti*. Atti del XIV Convegno Nazionale di Micologia, Selva di Fasano, Brindisi.

44. SCHULZ B., BOYLE C., DRAEGER S., RÖMMERT A. K., (2002) – *Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites*. Mycological Research, 106 (9): 996-1004
45. CARROLL G., (1988) – *Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont*. Ecology, 69 (1): 2-9
46. MAZZAGLIA A., LIBRANDI I., ANSELMINI N., (2004) – *Endofiti fungini su querce caducifoglie nel centro Italia*. XV Convegno Nazionale di Micologia – Sassuolo, Fiorano (MO), Marzo 2004
47. UBALDO R., MANNERUCCI F., MAVELLI M., BELLIZZI A., LUISI N., (2004) – *Discula quercina: diffuso endofita delle querce in Italia meridionale*. XV Convegno Nazionale di Micologia – Sassuolo, Fiorano (MO), Marzo 2004
48. NASINI M., MAZZAGLIA A., (2004) – *Endofiti fungini su leccio*. XV Convegno Nazionale di Micologia – Sassuolo, Fiorano (MO), Marzo 2004
49. FAETH S. H., FAGAN W. F., (2002) – *Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualism*. Integ. And Comp. Biol. 42: 360-368
50. OWEN N. L., HUNDLEY N., (2004) – *Endophytes – the chemical synthesizers inside plants*. Scienze Progress, 87(2): 79-99
51. FLORES E. M., (2003) – *Seed biology*. In: J.A. VOZZO, Tropical Tree - seed manual. United State Department of Agriculture, Forest Service.
<http://www.rngr.net/Publications>
52. SAIKKONEN K., FAETH S. H., HELANDER M., SULLIVAN T. J., (1998) – *Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants*. Ann. Rev. Ecol. Syst. 29: 319-343

53. HONG T. D., ELLIS R. H., (2003) – *Storage*. In: VOZZO J. A., Tropical Tree - seed manual. United State Department of Agriculture, Forest Service.
<http://www.rngr.net/Publications>
54. BERJAK P., PAMMENTER N. W., (2003) – *Orthodox and recalcitrant seeds*. In: J.A. VOZZO, Tropical Tree - seed manual. United State Department of Agriculture, Forest Service. <http://www.rngr.net/Publications>
55. MITTAL R. K., MATHUR S. B., (2003) – *Pathology*. In: J.A. VOZZO, Tropical Tree - seed manual. United State Department of Agriculture, Forest Service.
<http://www.rngr.net/Publications>
56. <http://www.funghiitaliani.it/Alberi/Farnia/Farnia.htm>
57. BONNER F. T., (1996) – *Responses to drying of recalcitrant seeds of Quercus nigra L.* Annali of Botany, 78: 181-187
58. WILSON D., CARROLL G.C., (1994) – *Infection studies of Discula quercina, an endophyte of Quercus garryana.* Mycologia, 86(5), 635-647
59. PREWEIN C., ENDEMANN M., REINÖHL V., SALAJ J., SUNDERLIKOVA V., WILHELM E., (2006) – *Physiological and morphological characteristics durino development of peduncolate oak (Quercus robur L.) zygotic embryos.* Trees, 20: 53-60
60. MARTIN P., PAJARES J. A., PANDO V., DIEZ J. J., (2006) – *Fungi isolated from diseased nursery seedlings in Spain.* New Forests, 31: 41-56
61. BONNER F. T., VOZZO J. A., (1987) – *Seed biology and technology of Quercus.* United States Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, New Orleans, Louisiana. General Technical Report SO-66

62. RAVEN P. H., EVERT R. F., EICHHORN S. E., (1997) – *Biologia delle piante*. Quinta Edizione Zanichelli.
63. BERJAK P, PAMMENTER N. W., (2000) – *What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds*. R. Bras. Fisiol. Veg., 12: 22-55
64. BERJAK P., PAMMENTER N. W., (1997) – *Progress in the understanding and manipulation of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds*. In: R. H. ELLIS, M. BLACK, A. J. MURDOCH, T. D. HONG (eds.), *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*, pp. 689-703
65. SINCLAIR J. B., CERKAUSKAS R. F. (1996) – *Latent infection vs. endophytic colonization by fungi*. In: S. C. Redlin, L. M. Carris (eds.), *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants*, pp. 3-25
66. PETRINI O., (1996) – *Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi*. In: S. C. Redlin, L. M. Carris (eds.), *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants*, pp. 87-99
67. MAUDE R. B., (1973) – *Seed-borne disease and their control*. In: W. Heydecker (ed.), *Seed Ecology – Proceedings of the IX Easter School in Agricultural Science*, pp. 325-335
68. PUGH G. J. F., (1973) – *Saprophytic fungi and seeds*. In: W. Heydecker (ed.), *Seed Ecology – Proceedings of the IX Easter School in Agricultural Science*, pp. 337-345
69. FARNSWORTH E., (2000) – *The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds*. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 31: 107-138

70. AGARWAL V. K., SINCLAIR J. B., (1997) – *Principles of Seed Pathology*. II Edition, Lewis Publishers, CRC Press
71. PAMMENTER N. W., BERJAK P., (2000) – *Aspects of recalcitrant seed physiology*. R. Bras. Fisiol. Veg., 12: 56-69
72. TWEDDLE J. C., DICKIE J. B., BASKIN C. C., BASKIN J. M., (2003) – *Ecological aspects of seed desiccation sensitivity*. Journal of Ecology, 91: 294-304
73. SUTHERLAND J. R., DIEKMANN M., BERJAK P., (2002) – *Forest tree seed health, for germplasm conservation*. IPGRI, Technical Bulletin n° 6, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
74. HONG T. D., ELLIS R. H., (1996) – *A protocol to determine seed storage behaviour*. IPGRI, Technical Bulletin n° 1, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy
75. LESLIE J. F., SUMMERELL B. A., (2006) – *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing
76. SAMSON R. A., HOEKSTRA E. S., FRISVAD J. C., FILTENBORG O. – *Introduction to food- and airborne fungi*. Published by Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
77. KLICH M. A., (2002) – *Identification of common Aspergillus species*. Published by Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
78. BARNETT H. L., HUNTER B. B., (2003) – *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. APS Press, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

79. WATANABE T., (2002) – *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi – morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC Press LLC
80. GOIDÀNICH G., (1978) – *Manuale di Patologia Vegetale*. Edizioni Agricole, Bologna
81. HANLIN R. T., (2000 e 2001) – *Illustrated Genera of Ascomycetes*. Vol. I e Vol. II, APS Press, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
82. HANLIN R. T., (2001) – *Combined Keys to Illustrated Genera of Ascomycetes*. Vol. I & II, APS Press, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
83. RAGAZZI A., MORICCA S., CAPRETTI P., DELLAVALLE I., FRANCESCA M., TURCO E., (2001) – *Endophytic fungi in Quercus cerris: isolation frequency in relation to phenological phase, tree health and the organ affected*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 165-171
84. PITT J. I., HOCKING A. D., (1997) – *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic & Professional, an Imprint of Chapman & Hall
85. SOMOGYI Z., (2000) – *Oak decline in Hungary: case study*. In: Oszako T, Delatour C. (eds), *Recent Advances on Oak Health in Europe*. Forest Research Institute, Warsaw, 91-103
86. MONTECCHIO L., CAUSIN R., ROSSI S., MUTTO ACCORDI S., (2004) – *Changes in ectomycorrhizal diversità in a declining Quercus ilex coastal forest*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(1): 26-34
87. MANION P. D., LACHANCE D., (1992) – *Forest decline concepts*. APS Press, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

88. THOMAS F. M., BLANK R., HARTMANN G., (2002) – *Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in central Europe*. Forest Pathology, 32: 277-307
89. SIEGEL S., CASTELLAN N. J., (1992) – *Statistica non parametrica*. Ed. E. Caracciolo, McGraw-Hill, Libri Italia s.r.l.
90. SOLIANI L. – *Statistica applicata alla ricerca biologica e ambientale*. Ed. UniNova
91. FOWLER/COHEN (1993) – *Statistica per ornitologi e naturalisti*. Franco Muzzio Editore, Padova.
92. NORMAN/STREINER – *Biostatistica – Quello che avreste voluto sapere* Casa Editrice Ambrosiana
93. MEAD R., CURNOW R. N., HASTED A. M., (2003) – *Statistical methods in agriculture and experimental biology*. Chapman & Hall, CRC Press Company.

ALLEGATO A

Quercus robur L.

Q. robur L., o *Q. pedunculata* Ehrh. o più comunemente Farnia, appartiene al genere *Quercus* L., subfamiglia *Quercoidae*, famiglia *Fagaceae* (Dumortier), ordine *Fagales* (19, 56, 61). Alla famiglia delle *Fagaceae* appartengono altri sette generi, tra cui *Castanea* e *Fagus*, con più di 1000 specie diffuse dalle regioni temperate settentrionali fino alle zone dell'emisfero meridionale (19, 24, 35).

Il genere *Quercus* annovera circa 300-400 specie arboree ed arbustive, decidue, sempreverdi e semipersistenti, presenti nell'emisfero settentrionale (19). Piante di quercia sono presenti in tutto il continente americano, dal Canada alle regioni equatoriali, in tutta l'Asia e l'Europa (fatta eccezione per le regioni più settentrionali) e nel nord Africa (19).

La quercia pedunculata, in particolare, presenta l'areale più vasto fra le querce europee: dalla Scandinavia meridionale e dalla Russia si estende a sud fino al Mediterraneo europeo ed asiatico. Occupa la regione inglese, la Francia, l'Europa centrale o orientale arrivando agli Urali e al Caucaso. A sud, oltre l'Italia, si diffonde in tutta la regione balcanica e nell'Anatolia. E' assente in Corsica e nelle isole Balearia (19, 56). In Italia è presente in tutte le regioni (ad eccezione della Sardegna), soprattutto nelle pianure alluvionali o lungo le valli umide (19, 56).

L'ecologia della specie la caratterizza come componente di grandi foreste planiziali, spesso associata a carpino bianco, olmo campestre, pioppi, ontano nero e frassino ossifillo. Attualmente, la maggior parte di questi ambienti è stata modificata dalle forti pressioni antropiche; *Q. robur* è stata sostituita quasi totalmente da colture agrarie, provocandone una forte contrazione nella distribuzione. In molte aree la si ritrova in maniera puntiforme lungo la penisola, distribuita a gruppi, in filari o individui isolati (19, 56).

Predilige terreni profondi, freschi, fertili con humus di tipo mull o idromull, ma rifugge quelli troppo compatti, a reazione da subacida a subalcalina. E' piuttosto esigente in luce e anche da semenzale tollera per pochi anni l'ombreggiamento. Condizione necessaria, è una buona disponibilità idrica per tutto l'anno, anche con falda freatica superficiale (56).

Q. pedunculata può raggiungere notevoli dimensioni e ragguardevoli età. Ha chioma molto ampia, leggera e mai densa. Le foglie sono caduche, ovate o ovato-oblunghe, strette alla base ma asimmetriche a causa del diverso sviluppo dei due piccoli lobi basali, sono più larghe nella parte superiore, e presentano 5-7 paia di ampi lobi (19).

La fioritura avviene dalla fine di aprile fino a maggio, contemporaneamente alla fogliazione (19, 56). I fiori di farnia sono monoici, unisessuati, con androceo – detti staminati – o gineceo – detti pistillati –, presenti sulla stessa pianta madre (19, 56, 61, 62).

I fiori staminati sono organizzati in amenti di circa 2-5 cm di lunghezza, pauciflori e penduli, portati alla base del ramo dell'anno, costituiti da circa una dozzina di fiori con perianzio giallo-verdastro e 6-8 stami con antere glabre (19, 56). Gli stami, il cui insieme forma l'androceo, sono microsporofilli costituiti da un esile peduncolo, il filamento, alla cui sommità è portata un'antera, formata da due teche contenenti quattro microsporangî, o sacche polliniche (62). (*Foto 1.*)

I fiori pistillati, isolati o più spesso in brevi gruppi di 2-5 elementi, sono localizzati sulla parte apicale del ramo dell'anno all'ascella delle foglie e portati da un lungo peduncolo (3-5 cm) glabro. Il fiore femminile è formato da 3 stigmi di colore rosso più o meno scuro, avvolti da brattee ovali, lungamente acuminate, più lunghe del fiore stesso (19, 56). Sono presenti tre carpelli, megasporofilli ripiegati nel senso della lunghezza, tra loro saldati e differenziati in una parte inferiore, l'ovario, e una parte superiore, lo stimma, che riceve il polline. L'ovario (infero) risulta, quindi, diviso in tre loculi, tre concamerazioni in cui risiedono due ovuli ciascuno, tra i quali solo uno si svilupperà (51, 62). (*Figura 1.*)

Fra l'impollinazione e la fecondazione intercorre un intervallo di circa 6-8 settimane (19, 56).

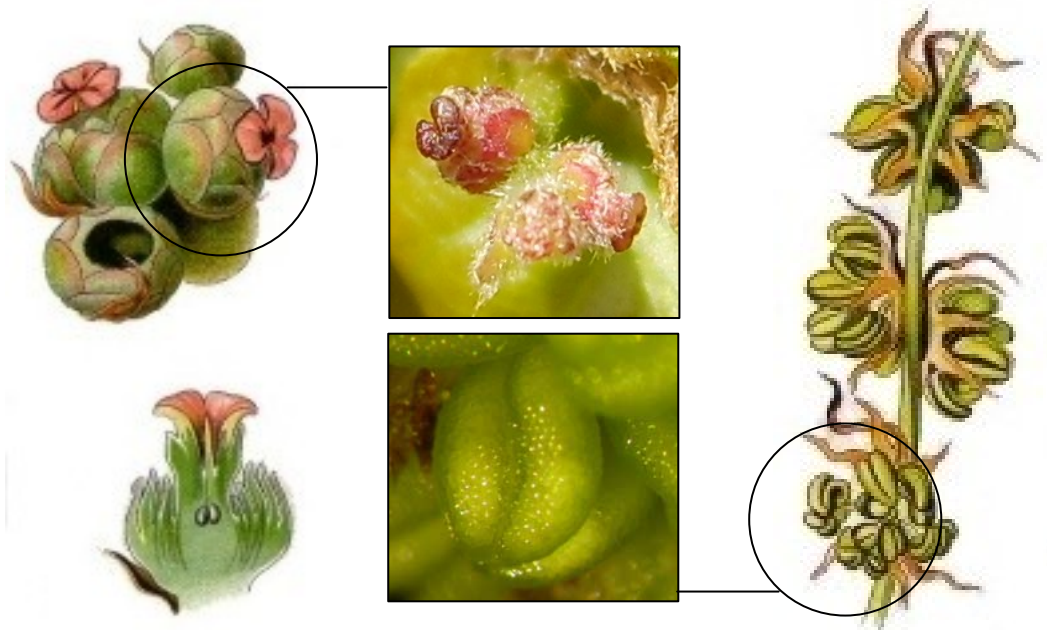


Figura 1. – Fiori pistillati e fiori staminati di *Q. robur*. (Fanchin)

La ghianda

Dopo la fecondazione, si assiste allo sviluppo dell'ovulo in seme e dell'ovario in frutto (62) attraverso un allungamento cellulare ed una trasformazione della parete dell'ovario in pericarpo (51, 61).

Il pericarpo è differenziato in tre strati diversi, dalla parte più esterna alla più interna: un *esocarpo* sclerificato, un *mesocarpo* striato ed *endocarpo* sottile coriaceo e fragile (51, 61, 62). La sua tessitura varia in relazione allo stadio fisiologico della ghianda. A maturità, infatti l'esocarpo presenta una superficie compatta ed indifferenziata, con presenza di rotture occasionali; al momento della germinazione si osserva una progressiva diminuzione nella densità degli strati del pericarpo che ne aumenta la permeabilità (61).

Le ghiande maturano nell'anno, tra settembre ed ottobre (19, 56), sono nocule indeiscenti, dure, con un loculo sviluppato (51, 61) che contiene un embrione liscio (61), non dormiente

(19, 56) circondato da due cotiledoni coincidenti molto voluminosi. L'endosperma non è presente e risulta comunque molto ridotto (51, 61, 62).

A completa maturità la ghianda è di dimensioni variabili da 2 a 3,5 cm, ovato-oblunga, con il diametro massimo verso la metà. Il suo tegumento è liscio, bruno olivastro con striature longitudinali scure; la cicatrice ilare ha un diametro di 4-5 mm. È parzialmente coperta per 1/4 a 1/3 da una cupola che presenta un margine sottile o appena ispessito con squame, di forma rombica o triangolare, ben saldate, delle quali solo l'apice è libero (19, 56).

Nell'embrione maturo, o *sporofito*, il meristema apicale del germoglio costituisce l'estremità dell'*epicotile*, che insieme alle giovani foglioline è chiamato "plumula". La parte dell'asse embrionale al di sotto dei cotiledoni è indicata come *ipocotile*, la cui estremità inferiore rappresenta una radice embrionale o radichetta, con caratteristiche proprie della radice (62).

Dopo la germinazione, nella nuova plantula l'ipocotile è la parte che si estende dal nodo cotiledonale al colletto radicale. Morfologicamente è la zona di transizione tra la radice e l'epicotile. I semenzali con germinazione ipogea, come nel caso di farnia, presentano generalmente un piccolo ipocotile (51). L'epicotile è la parte della plantula lontana dai cotiledoni. Di solito è facilmente distinguibile dopo la germinazione e differisce dall'ipocotile per lo spessore, la tessitura ed il colore (51).

Il seme è di fatto il sito dello sviluppo parziale dello sporofito e rappresenta il legame con la successiva generazione. È uno stato intermedio critico nel ciclo vitale della pianta, che ne garantisce la propagazione e la sopravvivenza (51).

Il seme recalcitrante

La parola *recalcitrante* è definita come "ostinatamente disobbediente" (63) ed inizialmente veniva utilizzata per indicare il fatto che un seme di questo tipo non poteva essere conservato con metodi di stoccaggio standard comuni a tutti gli altri semi (63), definiti come *ortodossi*. Il primo a proporre questo recalcitrante fu Roberts nel 1973, il quale prese in considerazione come fattori discriminanti il grado di tolleranza al disseccamento e la bassa longevità al momento della conservazione (16, 64, 73). In anni successivi, vari ricercatori hanno proposto una nuova classificazione del seme basata

sull'esistenza di diversi livelli di tolleranza al disseccamento (16), poiché nella definizione originaria diverse tipologie di seme potevano, ambigualmente, rientrare sia in una che nell'altra categoria (16).

I semi ortodossi sviluppano tolleranza al disseccamento durante le fasi di maturazione, possono venire disidratati anche dopo la disseminazione, sopravvivere ed essere conservati in questa condizione per periodi considerevoli (54, 64, 71).

I semi recalcitranti, caratterizzanti generi temperati come *Castanea*, *Quercus*, *Aesculus* e alcune specie del genere *Acer* (17, 56, 57, 73), sebbene possano tollerare un certo grado di disidratazione durante la maturazione, non possono superare certe soglie minime di umidità, vengono disseminati ad elevati contenuti idrici interni (1, 63, 64, 71, 73, 74), anche del 96-98% (73) e con persistente attività metabolica (71, 72). Ciò nonostante, presentano una probabilità di sopravvivenza molto limitata (1, 64, 72). Questo accade perché sono semi che presentano una spiccata sensibilità al disseccamento sia prima che dopo la disseminazione (1, 13, 16, 18, 54, 59, 63, 64, 72, 73, 74), e per questo motivo risulta difficile poterli immagazzinare per lunghi periodi senza gravi perdite sulla vitalità (1, 13, 16, 59, 69, 72). Da tutto ciò derivano reali problemi pratici relativi alla loro conservazione, importante sia per garantire costanti forniture, sia per la conservazione genica a lungo termine (18).

Le caratteristiche che distinguono i recalcitranti dai semi ortodossi, sono quindi l'immediata germinazione dopo la caduta al suolo (16, 69), la bassa longevità (16, 69), l'intolleranza al disseccamento (16), seguiti dalla quota di contenuto idrico medio per cui la vitalità del seme è al 50%, la sensibilità al freddo (13, 16), l'assenza di una fase di dormienza, un metabolismo sempre attivo ed, infine, i diversi habitat naturali delle specie recalcitranti (16).

Un seme ortodosso, in linea generale, raggiunge tenori idrici interni anche del 10% o meno, senza tuttavia inficiare la propria vitalità (13, 17, 57, 71, 72). Questo, per il seme recalcitrante non è possibile (13, 17, 18, 53, 57). E' stato provato (57), ad esempio, che un contenuto idrico interno del 10-15% in ghiande sane di *Q. nigra* a 27°C rappresenta il cosiddetto "contenuto idrico minimo critico letale", oltre il quale la vitalità viene ridotta a zero (53, 57, 74).

Non tutti i semi, tuttavia, sono in grado di sopportare la disidratazione ad uguali livelli di contenuto idrico interno (63), poiché esiste una certa variabilità fra specie e nella specie (71). Innanzitutto, variano nei contenuti idrici al momento della disseminazione, le loro risposte al tasso di disseccamento, le probabilità di sopravvivenza allo stato idratato e le reazioni alle basse temperature (71). Molte specie presentano semi recalcitranti che superano solo disseccamenti molto limitati durante la fase di maturazione, mentre in altre non c'è assolutamente perdita d'acqua (63).

Per questi motivi si è giunti alla conclusione che la recalcitranza non è una condizione di “tutto o niente” (63, 64), nell'evidenza che esistono di vari gradi di comportamento non-ortodosso (63). In un insieme di molte specie vegetali recalcitranti, si osserva un *continuum* di comportamenti ed attitudini (63, 71, 73), diminuzioni nel tasso di vitalità lungo un gradiente di tenori idrici (63, 71), (Figura 2), che varia dalla sensibilità ad estreme disidratazioni, fino alla tolleranza di consistenti perdite idriche (64, 71), anche con elevate probabilità di sopravvivenza (71).

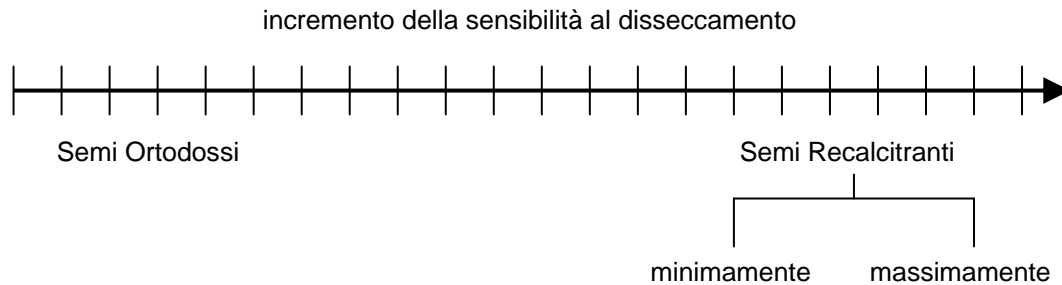


Figura 2. – *Continuum* nel comportamento dei semi in relazione alla sensibilità al disseccamento (63).

Il differente comportamento dei semi recalcitranti ed ortodossi è, quindi, conseguenza diretta del naturale processo di disseccamento, relazionato ed influenzato anche da diverse condizioni climatiche (16). I semi recalcitranti sono assai comuni nelle foreste tropicali mesiche, ed in questi ambienti ci possono essere condizioni favorevoli alla

germinazione e all'affermazione dei semenzali, tanto da non subire pressioni che guidano l'evoluzione della tolleranza al disseccamento (71).

Ciò nonostante, essi non sono confinati in queste foreste (71). Alcuni semi recalcitranti di specie temperate vengono disseminati in primavera e danno semenzali affermati già durante l'estate. Altri, estremamente tolleranti il freddo, vengono disseminati nella stagione autunnale e superano l'inverno in uno stadio di quiescenza (1, 71).

Esistono, poi, casi in cui i semi recalcitranti germinano in autunno, appena dopo la caduta a terra, come nel caso di *Q. robur*, ma che difficilmente sopravvivono all'inverno (1, 16).

La sensibilità al disseccamento rappresenta, probabilmente, uno stato ancestrale, avvalorato dal fatto che la recalcitranza è confinata a specie vegetali non pioniere (72). Inoltre, è possibile ipotizzare che la rapida germinazione dei semi recalcitranti possa ridurre la mortalità minimizzando la durata in cui sono esposti a potenziali predatori, e massimizzare lo sviluppo dei semenzali durante un periodo di condizioni ambientali favorevoli di limitata durata (72).

Fisiologia

La tolleranza e la sopravvivenza al disseccamento nei semi ortodossi è resa possibile da alcuni meccanismi di tipo fisiologico, tra i quali (54):

- caratteristiche fisiche ed intracellulari;
- differenziazione cellulare (54, 64);
- blocco dell'attività metabolica (54, 64);
- presenza ed efficienza di sistemi antiossidanti;
- accumulo di molecole protettive;
- autoriparazione strutturale durante la reidratazione per la germinazione.

Quando i semi ortodossi raggiungono la maturazione hanno subiscono una disidratazione molto spinta. Seccando, si accumulano riserve insolubili, il volume dei vacuoli [il maggior compartimento litico delle cellule vegetali, dove gli organelli vengono lisi nelle loro componenti molecolari di base (63)] si riduce e vengono sintetizzate molecole protettive. Queste modificazioni sono accompagnate da una de-differenziazione delle strutture degli

organelli – particolarmente nel caso dei mitocondri – una modificazione del metabolismo, che innesca funzioni protettive come la vetrificazione e l’attivazione delle proteine LEA, Late Embryogenic Abundant), presenti, d’altro canto, anche nei semi recalcitranti, ma non di tutte le specie (71).

Nel caso della recalcitranza, le basi fisiologiche che caratterizzano il fenomeno possono essere (17):

- le modificazioni della membrana cellulare e l’accumulo di lipidi;
- la disgregazione fisica delle membrane del seme;
- i cambiamenti nelle proteine e nei carboidrati;
- l’alterazione delle proprietà idriche;
- processi metabolici aberranti (13, 17);
- l’attività metabolica sempre persistente (61, 64, 71);
- un alto tasso di respirazione anche dopo la maturazione (71).

Tutto questo può spiegare le cause della recalcitranza ma non sono stati ancora quantificati o definiti i processi fisiologici e biochimici responsabili (17).

Finch-Savage suggerisce, in virtù delle molte similarità nello sviluppo di semi ortodossi e semi recalcitranti, che la spiegazione della recalcitranza possa risiedere in uno sviluppo “troncato” (64, 71), una conseguenza della mancanza di alcuni meccanismi protettivi che insieme conferiscono tolleranza al disseccamento nei semi ortodossi (54). I semi recalcitranti mostrano uno sviluppo indeterminato e vengono disseminati prima che la tolleranza alla disidratazione venga completamente acquisita (71).

Le fessurazioni del pericarpo, spesso causate da un troppo repentino restringimento dimensionale degli ampi cotiledoni, è il principale fattore di disseccamento nelle ghiande (57). A maturazione l’asse embrionale presenta un contenuto idrico più elevato rispetto ai cotiledoni: circa un 59% contro un 47% (18). Nel tempo, tuttavia, l’umidità embrionale diminuisce ed in maniera più rapida rispetto a quanto avviene nei cotiledoni, fino a rappresentare circa il 20% di contenuto idrico dell’intero seme. Ciò nonostante, si considera che l’umidità presente nei cotiledoni si possa considerare come la quota idrica presente nell’intero seme, dato che essi costituiscono più del 98% del peso totale (18).

La capacità di sopportare la disidratazione può originare da meccanismi finalizzati ad evitare la distruzione cellulare durante la perdita di acqua (16). Se una cellula non tollerante disidrata, i suoi soluti si concentrano ed alcuni possono cristallizzare, modificando la resistenza ionica ed il pH della soluzione intracellulare, le proteine iniziano a denaturare e le membrane a disgregarsi (16, 64). In condizioni normali, lo stato cristallino dell'acqua potrebbe ritardare il totale disidratamento e l'inibizione della mobilità delle molecole potrebbe prevenire la denaturazione, garantendo la sopravvivenza dei semi (16).

Il citoscheletro, costituito per la maggior parte da microtubuli e microfilamenti, è un sistema di supporto intracellulare e gioca un ruolo nell'organizzazione del citoplasma e dei nuclei (54). Nel seme di *Q. pedunculata* allo stato idratato, la rete di microfilamenti e l'integrità delle strutture intracellulari vengono meno appena aumenta la disidratazione e, se il seme viene poi reidratato, non esiste la capacità di ristrutturazione (54).

Un importante fattore intimamente associato alla sensibilità idrica dei semi recalcitranti è il persistente stato di attività metabolica, sia durante la maturazione che dopo la disseminazione, che probabilmente subisce delle profonde alterazioni appena si ha un calo di contenuto di acqua (54, 64).

Le ghiande, nonostante la recalcitranza che le distingue, superano una certa quota di perdita idrica interna obbligata durante le fasi dello sviluppo (64, 71).

L'acido abscissico, il fitormone ABA, sembra fondamentale nella preparazione dell'embrione alla maturazione prima della dormienza (69) ed è fortemente relazionato, direttamente o indirettamente, alla tolleranza al disseccamento (16, 59). Inoltre, è coinvolto in catene di traduzione tra gli stimoli di stress esterni e le risposte difensive interne dei tessuti vegetali (18). La sua concentrazione nei semi recalcitranti aumenta verso la fine della embriogenesi e raggiunge il massimo appena prima della caduta a terra. Conseguentemente, questi alti livelli di ABA endogeno inibiscono la germinazione precoce dell'embrione e promuovono la maturazione (59).

L'aumento di ABA è accompagnato da un incremento dei contenuti in amido, necessario per la maturazione e la geminazione, durante la fase mediana dell'espansione del seme (59, 61).

Una eventuale perdita di vitalità in *Q. robur* viene preceduta da una diminuzione dell'attività dei sistemi antiossidanti, che induce un aumento nella perossidazione lipidica spinta, a sua volta principale conseguenza della produzione incontrollata e rapida di radicali liberi che si accumulano nell'embrione (18, 54). In questo contesto, uno dei prodotti primari è un precursore della sintesi di acido jasmonico (JA) e del suo estere metilico (MeJA) (18). L'acido jasmonico ed MeJA sono presenti nei semi recalcitranti di molte specie. Essi inibiscono la germinazione di semi non dormienti e la promuovono nei dormienti (18). Inoltre, inducono una varietà di effetti anche nella pianta, come le risposte difensive, la senescenza e la sintesi di etilene (18) che, in particolare nelle ghiande di farnia, rallenta la germinazione (69).

I livelli di auxine nei semi di *Q. robur* rimangono relativamente stabili in prossimità della maturazione (61), molto abbondanti sia nei cotiledoni che nel pericarpo, entrambi tessuti di accumulo di riserve (69).

L'attività delle citochinine, abbondanti inizialmente durante il periodo della maturazione, diminuisce fino a quando l'incremento in diametro e lunghezza della ghianda diventano minimi (61). Questi fitormoni sono coinvolti nella fase di accumulo di riserve nell'embrione e nel mantenimento della crescita cellulare, promuovendo la divisione cellulare e accelerando così il tasso di sintesi delle proteine e diminuendo la durata dell'interfase cellulare (69)