

**DOTTORATO DI RICERCA IN TECNOLOGIE  
FITOSANITARIE**

(XXIII ciclo: 2007-2010)

---

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Fitosanitarie  
Sezione Patologia vegetale

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

GIUSEPPE PARLAVECCHIO

**Valutazione e messa a punto del metodo  
endoterapico in piante ornamentali**

—————  
*TESI DI DOTTORATO*  
—————

Coordinatore:  
Chiar.ma Prof.ssa Gabriella Cirvillieri

Tutor:  
*Chiar.mo Prof. Giancarlo Polizzi*

---

**INDICE**

## PARTE GENERALE

<b>1 – ENDOTERAPIA</b> .....pag.	7
1.1 – Introduzione.....»	7
1.2 – Evoluzione storica.....»	9
1.3 – Metodi e mezzi utilizzati in endoterapia.....»	12
1.4 - Iniezione per assorbimento naturale .....»	13
1.5 – Iniezione per pressione.....»	14
1.6 – Apparati per trattamenti endoterapici.....»	17
1.7 – Il ruolo dei solventi.....»	21
1.8 –Applicazioni pratiche.....»	21
1.9 –Aspetti positivi e negativi dell’endoterapia.....»	26
1.10 – Risposta dei tessuti e movimento delle soluzioni nelle <i>Cycadales</i> e nelle <i>Palmae</i> .....»	31
<b>2 – LE CYCADALES</b> .....»	36
2.1 – Inquadramento botanico .....»	36
2.2 – Caratteristiche morfologiche.....»	37
2.3 – Coltivazione.....»	38
2.4 – Principali malattie.....»	40
2.5 – Carenza di manganese.....»	42
<b>3 – LE PALMAE</b> .....»	46
3.1 – Inquadramento botanico .....»	46
3.2 – Caratteristiche morfologiche.....»	46
3.3 – Coltivazione.....»	47
3.4 – Principali malattie.....»	48
3.5 – Tracheomicosi causata da <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>canariensis</i> .....»	50
<b>4 – IL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME</b> .....»	53

4.1 – Descrizione morfologica e ciclo.....»	54
4.2 – Danni causati.....»	56
4.3 – Mezzi di lotta.....»	58
<b>5 – SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>62</b>

## PARTE SPERIMENTALE

<b>6 – EFFICACIA DELL’ENDOTERAPIA A PRESSIONE PER IL CONTENIMENTO DEL PUNTERUOLO ROSSO SU <i>PHOENIX CANARIENSIS</i> IN AMBIENTE PUBBLICO E PRIVATO.....»</b>	<b>70</b>
<b>6.1 - Materiali e metodi .....</b>	<b>70</b>
6.1.1 – Valutazione dell’efficacia dell’endoterapia a pressione su piante apparentemente sane in ambiente urbano.....»	70
6.1.2 - Valutazione dell’efficacia dell’endoterapia a pressione su piante apparentemente sane e sintomatiche in ambiente urbano.....»	71
6.1.3 – Valutazione della diffusione delle infestazioni di <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> in diverse aree di catania.....»	72
6.1.4 – Valutazione dell’efficacia dell’endoterapia a pressione in diverse zone di Catania.....»	73
6.1.5 – Efficacia di insetticidi su larve di <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> e valutazione della mobilità delle soluzioni applicate mediante endoterapia.....»	75
6.1.6 – Valutazione dell’efficacia dell’endoterapia a pressione in associazione con irrorazioni alla chioma in giardini privati.....»	75

<b>6.2 - Risultati</b> ..... »	78
6.2.1 – Valutazione dell’efficacia dell’endoterapia a pressione su piante apparentemente sane in ambiente urbano.....»	78
6.2.2 - Valutazione dell’efficacia dell’endoterapia a pressione su piante apparentemente sane e sintomatiche in ambiente urbano.....»	78
6.2.3 – Valutazione della diffusione delle infestazioni di <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> in diverse aree di catania.....»	79
6.2.4 – Valutazione dell’efficacia dell’endoterapia a pressione in diverse zone di Catania.....»	81
6.2.5 – Efficacia di insetticidi su larve di <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> e valutazione della mobilità delle soluzioni applicate mediante endoterapia..... »	86
6.2.6 – Valutazione dell’efficacia dell’endoterapia a pressione in associazione con irrorazioni alla chioma in giardini privati.....»	87
 <b>6.3 - Discussione</b> .....»	 88
 <b>7 – CARATTERIZZAZIONE DI <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP. CANARIENSIS E PROVA DI LOTTA SU <i>PHOENIX CANARIENSIS</i> IN VIVAIO</b> ..... »	 93
<b>7.1 - Materiali e metodi</b> ..... »	93
7.1.1 – Indagine di campo, isolamento in coltura e caratterizzazione molecolare di isolati di <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>canariensis</i> ..... »	93
7.1.2 – Efficacia di fungicidi applicati in endpterapia per il contenimento di <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>canariensis</i>	

su <i>Phoenix canariensis</i> .....»	96
<b>7.2 - Risultati</b> .....»	100
7.2.1 – Indagine di campo, isolamento in coltura e caratterizzazione molecolare di isolati di <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>canariensis</i> ..... »	100
7.2.2 – Efficacia di fungicidi applicati in endoterapia per il contenimento di <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>canariensis</i> su <i>Phoenix canariensis</i> .....»	102
<b>7.3 – Discussione</b> .....»	105
<b>8- PROVE PER IL RISANAMENTO DELLA CARENZA DI MANGANESE IN <i>CYCAS REVOLUTA</i></b> .....»	107
<b>8.1 - Materiali e metodi</b> .....»	107
8.1.1 – Efficacia di applicazioni fogliari e al terreno su piante in vaso e piena terra.....»	107
8.1.2 – Efficacia di trattamenti in endoterapia passiva ed a pressione.....»	108
<b>8.2 - Risultati</b> .....»	114
8.2.1 – Efficacia di applicazioni fogliari e al terreno su piante in vaso e piena terra.....»	114
8.2.2 – Efficacia di trattamenti in endoterapia passiva ed a pressione..... »	116
<b>8.3 - Discussione</b> ..... »	119
<b>9 - CONCLUSIONI</b> ..... »	122

**RINGRAZIAMENTI**

**BIBLIOGRAFIA**

## **1. Endoterapia**

### **1.1 Introduzione**

L'endoterapia è una tecnica che si basa sull'introduzione nel tronco o nelle radici di una sostanza, che caratterizzata da proprietà sistemiche, si ridistribuisce nella

chioma attraverso il sistema vascolare della pianta (Vai, 2000). Dagli autori anglosassoni è spesso indicata come trunk injection (iniezione al tronco). Per comprendere meglio l'uso di questa tecnica è necessario accennare brevemente a come avviene nelle piante superiori il trasporto dell'acqua e delle sostanze in essa disciolte una volta assorbite dalle radici.

Il movimento dell'acqua e delle sostanze nutritive all'interno delle piante superiori avviene per mezzo di tessuti specializzati detti tessuti conduttori. Esistono due tipi di tessuti conduttori che presentano distinte funzioni, i tessuti floematici (cribrosi o liberiani) e i tessuti vascolari (xilematici o legnosi). Nei tessuti cribrosi avviene il trasporto della linfa elaborata dai siti di sintesi ai siti di utilizzo e accumulo. Lo xilema invece trasporta acqua ed elementi minerali in essa disciolti assorbiti dalle radici verso le foglie. Entrambi questi tessuti sono costituiti da cellule specializzate allineate una sull'altra a formare degli elementi tubolari riuniti in fasci che corrono lungo il caule. Nella struttura stelare tipica delle piante superiori ad accrescimento secondario quali gimnosperme ed angiosperme dicotiledoni, un tessuto di tipo meristemico secondario detto cambio cribro – legnoso separa fasci di tessuto vascolare all'interno e di tessuto cribroso all'esterno.

Il tessuto xilematico è costituito da elementi conduttori detti vasi. Ognuno di questi è costituito da più cellule che ne rappresentano altrettanti articoli e che sono più o meno allungate, di forma cilindrica, messe in ordine nella direzione del flusso e che a maturità sono morte. La loro sezione è circolare o poligonale e le loro pareti trasversali, più o meno oblique, presentano delle perforazioni o, addirittura sono riassorbite. Le pareti longitudinali si presentano ispessite poiché devono impedire che il trasporto delle soluzioni attraverso i vasi ne determinano lo schiacciamento. In base alla struttura della parete che separa gli articoli dei vasi, distinguiamo due tipi di elementi nel tessuto xilematico, le tracheidi e le trachee. Le tracheidi dette anche vasi chiusi presentano pareti trasversali di solito più o meno fortemente oblique e riccamente punteggiate, ma integre, mentre le trachee dette anche vasi aperti presentano pareti trasversali più o meno

completamente disciolte e di esse non rimane spesso che una traccia sotto forma di un anello addossato alla parete longitudinale. Nelle angiosperme sono presenti tracheidi di tipo anulato, anulo – spiraleto, spiraleto e trachee reticolate o punteggiate. L'energia che spinge l'acqua attraverso i vasi xilematici fino alle foglie è dovuta in minima parte ad una pressione positiva che si crea a livello radicale e in massima parte ad una tensione negativa che si crea a livello delle foglie. Tale meccanismo è definito teoria della tensione – coesione poiché si basa sulle proprietà coesive dell'acqua e sulla tensione fogliare. Secondo questa teoria, nel momento in cui la pianta apre gli stomi per assorbire l'anidride carbonica necessaria alla fotosintesi si ha perdita d'acqua per evaporazione e si crea una tensione negativa che si trasmette dal parenchima fogliare ai vasi conduttori provocando il richiamo d'altra acqua dal basso. La forza di coesione generata dai legami idrogeno che tengono unite le molecole d'acqua fa in modo che si creino all'interno dei vasi delle sottilissime colonne continue d'acqua spesso lunghe, nel caso delle grandi specie arboree, anche centinaia di metri, dalle radici sino alle foglie. Il movimento dell'acqua nei vasi supera le forze che sono vinte in questo movimento quali quelle d'adesione delle molecole d'acqua alle pareti dei vasi e la gravità. Da quanto detto si evince che, in condizioni d'adeguato rifornimento idrico del terreno, la velocità dell'acqua nei vasi è correlata in maniera diretta a tutti i fattori che condizionano positivamente l'evaporazione livello stomatico (velocità del vento, irradiazione solare, ecc.) e in maniera inversa alle citate forze che si oppongono al movimento dell'acqua (adesione, gravità).

Nelle gimnosperme le trachee sono del tutto mancanti e vi troviamo solo tracheidi di tipo punteggiato (Tonzig e Marrè, 1983). Nelle *Cycadales*, il legno è differente da quello delle altre gimnosperme, poiché più ricco di tessuto parenchimatico e meno lignificato.

## **1.2 Evoluzione storica**

Le prime notizie dell'iniezione di sostanze nelle piante risalgono al dodicesimo secolo e sono attribuite agli arabi che hanno usato questo metodo per introdurre sostanze in fori o tagli in piante al fine di impartire profumi o proprietà medicinali ai frutti o colori particolari ai fiori. Successivamente, è stato riportato un metodo d'iniezione utilizzato per valutare gli effetti della pressione radicale artificialmente indotta. Il metodo è risultato di difficile applicazione a causa del tempo necessario a trovare radici adatte all'iniezione e per la difficoltà di iniettare le soluzioni al loro interno (Goff, 1897).

Le prime prove applicative in endoterapia sono state effettuate nel XX secolo per il contenimento del mal dell'inchiostro del castagno (Rumbold, 1915). In questo lavoro sono stati posti a confronto due metodi. Nel primo sono state utilizzate delle semplici lattine, come quelle utilizzate per inscatolare le verdure, sulle quali era praticato un foro in prossimità del margine superiore. Un po' di cera da innesto ammorbidita si poneva sulla corteccia lasciando libero il punto in cui praticare il foro, quindi la latta si posizionava sul tronco in modo da farla combaciare con il foro. Infine, la soluzione era iniettata all'interno della latta. Gli svantaggi del metodo consistevano nella presenza di residui metallici che rendevano difficoltoso l'assorbimento e nella scarsa resistenza della cera quando l'apparato doveva essere mantenuto in sito per più giorni. Il secondo metodo presentava alcuni vantaggi rispetto al primo. Un contenitore aperto sulla parte superiore e a contatto con il tronco dall'altro lato era sigillato con la cera. Il contenitore era riempito d'acqua e quindi si praticava il foro evitando l'ingresso d'aria. La soluzione da iniettare era contenuta in un recipiente di vetro appeso in alto e portata tramite un tubo di gomma in un iniettore di vetro che penetrava nel foro praticato. Il tubo era tenuto in posizione sul foro da un apparato d'aggancio al tronco regolabile in base al diametro del fusto. Grazie a questo lavoro sono state individuate le prime due regole fondamentali per la riuscita degli interventi endoterapici:

1. Il foro nella pianta deve essere praticato in maniera tale da impedire l'ingresso d'aria nei vasi, il che porterebbe alla cavitazione dei vasi xilematici con successiva incapacità all'assorbimento.
2. Il foro deve essere praticato rispettando le norme igieniche con strumenti disinfettati o possibilmente monouso al fine di impedire la trasmissione e di ridurre le probabilità d'ingresso di patogeni.

L'arrivo della grafiosi dell'olmo intorno al 1940 negli Stati Uniti portò alla rinascita dell'interesse nei confronti delle tecniche endoterapiche. Gli apparecchi usati a quell'epoca variavano da semplici combinazioni di contenitori, tubi ed aghi per iniezione ad apparecchi comprendenti pompe capaci di forzare l'ingresso dei liquidi nelle piante, realizzati con materiale utilizzato nel campo della medicina. Le tecniche d'iniezione sono state modificate nel tempo per facilitare l'ingresso forzato delle soluzioni nei tronchi tramite fori praticati con trapani con punte di diverso diametro.

Nel 1969 è stato saggiato un semplice metodo per l'iniezione di sostanze chimiche all'interno degli alberi nell'ambito di uno studio nei confronti della grafiosi dell'olmo e altre malattie delle specie forestali (Schreiber, 1969). L'apparato descritto è stato ottenuto con materiali facilmente reperibili, costituiti da un contagocce in vetro normalmente usato in medicina umana, collegato tramite un tubo di gomma flessibile ad una spruzzetta da laboratorio di plastica. Il tubo era riscaldato e piegato o lasciato dritto nel caso di applicazioni alle radici. Tramite un trapano era rimossa una porzione circolare di corteccia di diametro poco più grande del diametro dell'estremità del tubo contagocce. In seguito, i vasi xilematici sottostanti si recidevano con uno scalpello per il legno e il tubo era posto all'interno del foro. Il rigonfiamento della corteccia intorno al foro rendeva ermetica l'applicazione. La tecnica prevedeva l'immissione forzata di una parte del prodotto chimico nel tubo di gomma per mezzo di una siringa al fine di escludere l'eventuale formazione di sacche d'aria. La rimanente parte del prodotto chimico era posto nel contenitore sovrastante e lasciato assorbire dalla pianta. L'assorbimento della soluzione somministrata in interventi di questo tipo dipende

dalla forza d'assorbimento xilematico della pianta. Spesso, però, si opera su piante affette da malattie vascolari, che causano una riduzione del flusso xilematico, e risultano pertanto incapaci di assorbire tutta la soluzione necessaria.

Le prime descrizioni di apparati che iniettano la soluzione in pressione, sono stati riportati in campo forestale. Nel 1971 Jones e Gregory pubblicarono un lavoro svolto per conto del servizio forestale degli Stati Uniti in cui è stato descritto un primo rudimentale apparato per l'iniezione in pressione di sostanze negli alberi (Jones e Gregory, 1971).

Un altro metodo è stato proposto da altri due studiosi i quali hanno modificato il metodo descritto da Schreiber (Schwarz e Van Vuuren, 1971). Un contenitore per il gas è stato modificato tagliando il tubo di sfogo e attaccando a questo un tubo di plastica per mezzo di un tappo; l'altra estremità del tubo si collegava ad un iniettore come nel metodo di Schreiber. Il contenitore era pressurizzato mediante l'impiego di una pompa d'aria. L'impiego di metodi per pressione consentiva di risparmiare tempo, di applicare un volume standard e riduceva la possibilità di deterioramento del composto chimico.

Oggi l'interesse per l'endoterapia è motivato dall'accresciuta sensibilità per le problematiche ambientali e dalle recentissime normative Europee "Pesticide package (PP)" ed è resa più efficiente dai recenti sviluppi sui mezzi tecnici e dalle accresciute conoscenze nel campo dell'anatomia e fisiologia vegetale.

### **1.3 Metodi e mezzi utilizzati in endoterapia**

Gli interventi endoterapici possono essere eseguiti mediante due metodi: l'iniezione per assorbimento naturale e l'iniezione a pressione. Il primo sfrutta la pressione negativa xilematica per far assorbire alla pianta la soluzione iniettata. Nelle tecniche d'iniezione che fanno uso di pressione, le soluzioni sono spinte per mezzo di una pressione positiva esercitata all'interno dello xilema. In base

all'entità della pressione le tecniche d'iniezione per pressione si distinguono in tecniche a micro – pressione se si usano pressioni intorno a 50 KPa (0,5 Atm) e tecniche a macro – pressione con pressioni che vanno da 200 – 300 KPa (2 – 3 Atm) fino a 700 – 800 KPa (7 – 8 Atm).

Le tecniche usate possono essere distinte anche in base alla quantità di soluzione iniettata: macro – iniezione se si introducono grosse quantità di soluzioni contenenti principi attivi a bassa concentrazione (500 ml per punto d'iniezione) e micro – iniezione se si impiegano piccole quantità di soluzioni contenenti principi attivi molto concentrati. La diversa quantità di soluzione da iniettare è legata al diametro dei fori che sono praticati nel tronco. Nella macro – iniezione il foro ha un diametro di circa 4 – 6 mm ed è profondo 5 – 6 cm, mentre nella micro - iniezione i fori hanno un diametro di 3 – 4 mm e sono profondi al massimo 1 cm.

Le soluzioni, una volta immesse nello xilema, si possono muovere non solo verso l'alto, ma anche verso il basso (Tattar e Tattar, 1999). Il movimento verso il basso all'interno dei vasi xilematici può essere considerato un fenomeno normale in elementi xilematici funzionanti in accordo con la teoria della coesione – tensione. Tuttavia, una rottura negli elementi dello xilema dovuta ad un foro d'iniezione può determinare il movimento della soluzione iniettata verso l'alto o verso il basso o in entrambe le direzioni secondo le forze che agiscono all'interno dell'elemento in quel momento.

Alcuni autori riportano il movimento verso il basso di coloranti o funghi iniettati all'interno dello xilema di diverse specie arboree. Questo spiega come, sostanze iniettate al tronco al livello del suolo, possono essere efficaci su patogeni che interessano l'apparato radicale (Darvas *et al.*, 1984).

#### **1.4 Iniezione per assorbimento naturale**

L'iniezione per assorbimento naturale sfrutta la pressione negativa presente all'interno dei vasi xilematici. L'energia per la formazione di tale pressione è fornita dal processo di traspirazione fogliare. La possibilità di iniettare sostanze all'interno dell'albero con questo metodo è fortemente dipendente da tutti i fattori endogeni ed esogeni che condizionano il processo di traspirazione. Risulta facilmente applicabile nei periodi di forte assorbimento quali la tarda primavera e l'inizio dell'estate e all'inizio dell'autunno quando si ha la maggiore attività traspiratoria. I tempi necessari sono piuttosto lunghi e il numero d'alberi iniettabili contemporaneamente è limitato. Inoltre, è necessario porre la massima attenzione a limitare l'ingresso d'aria nei fori che potrebbe portare alla cavitazione dei vasi e all'interruzione dell'assorbimento.

Quando si cerca di applicare una soluzione per assorbimento naturale, le soluzioni chimiche di solito sono iniettate da recipienti posti più in alto del punto d'iniezione attraverso fori nel tronco o mediante coni impermeabili applicati al tronco e contenenti il prodotto e praticando i fori sotto la superficie del liquido all'interno dello xilema. Nel caso del metodo per pressione è necessario prevedere un compartimento stagno sigillato tra l'albero e il recipiente. Questo implica l'uso di tappi di gomma, sughero o prodotti sigillanti quali cera, cemento o asfalto per evitare il versamento di liquido all'esterno.

I primi metodi usati in endoterapia erano molto simili ai metodi passivi su descritti. Essi però erano inefficaci e/o troppo laboriosi per poter essere applicati su larga scala.

### **1.5 Iniezione per pressione**

Attualmente i sistemi più diffusi sfruttano l'iniezione tramite pressione. In questo caso la soluzione è pressurizzata in recipienti adatti collegati tramite valvole al foro nel tronco e spinta all'interno con una pressione positiva. La pressione

permette di ridurre i tempi necessari per l'intervento e ne riduce la dipendenza da fattori esterni quali la velocità del flusso xilematico.

La buona distribuzione del liquido iniettato e il tempo necessario dipendono innanzitutto dalla corretta realizzazione dei fori. Negli alberi il cui tronco si divide in due o più branche, i fori d'iniezione devono essere praticati in corrispondenza delle branche e a 15 – 30 centimetri da terra. Più fori d'iniezione devono essere praticati per gli alberi che hanno numerose branche o con diversi tronchi che si dipartono dal basso. Negli alberi il cui tronco ha un diametro superiore ai 40 cm, i fori d'iniezione devono essere distanziati tra loro almeno 15 cm. Preferibilmente i fori, del diametro di 6 mm, sono praticati sui cordoni del tronco poiché in queste aree si trova il legno in attivo accrescimento. Inoltre, i fori devono avere una profondità variabile tra 1,9 e 4 cm evitando di giungere troppo in profondità. Per fare ciò la punta del trapano deve essere spinta ripetutamente dentro e fuori dal foro per evitare che rimangano trucioli all'interno. L'affilamento della punta consente di ottenere superfici ben definite evitando di danneggiare il legno e di occludere i vasi causando il blocco del movimento della soluzione. I risultati migliori sono stati ottenuti utilizzando trapani elettrici ad alta velocità di rotazione (da 1200 a 1700 RPM). Possono essere utilizzati anche trapani a bassa velocità di rotazione, ma durante la perforazione si deve provvedere a tenere pulito il foro e la punta deve essere ben affilata (Reil, 1979).

Una volta che i fori sono stati praticati in maniera appropriata un altro importante passo è l'applicazione delle valvole d'iniezione. I liquidi si muovono più velocemente nello xilema di recente formazione che si trova sotto la corteccia e la velocità diminuisce in quello più profondo (più vecchio), perciò è necessario che la valvola sia avvitata più superficialmente possibile. Di solito essa deve penetrare oltre la corteccia per non più di 2 o 3 cm al fine di sigillare il foro e aderire bene. La valvola non deve essere rimossa finché tutta la soluzione non è assorbita dall'albero. Il tempo necessario (che si evidenzia con una diminuzione di pressione all'interno del contenitore) dipende dall'albero e dal periodo dell'anno. Nel tempo d'attesa l'operatore può iniettare altri due o tre alberi.

Il tempo richiesto dall'intervento e la quantità di materiale che può essere introdotto dentro l'albero dipende da vari fattori. Le sostanze sono iniettate più rapidamente quando l'albero si trova in attiva crescita; perciò la tarda primavera, l'estate e l'autunno sono i periodi migliori per un buon assorbimento (Reil, 1979). Inoltre, è stato osservato che il tasso d'assorbimento a settembre è superiore rispetto al mese di giugno (Sinclair e Larsen, 1981). Nelle caducifoglie i tassi d'assorbimento decrescono nel tardo autunno, quando le foglie iniziano a cadere e diventano ancora più bassi in inverno quando le foglie non sono più presenti. Un moderato stress idrico a livello fogliare può migliorare l'assorbimento così come avviene in genere tra mezzogiorno e il tardo pomeriggio. Nello stesso modo agisce una moderata ventilazione (Reil, 1979).

Alcune specie decidue sembra possano essere trattate durante il periodo di dormienza anche se il movimento delle soluzioni negli alberi appare più lento rispetto alla fase di attiva crescita. I tassi d'assorbimento in una stagione possono, inoltre, variare secondo la specie arborea trattata. Il noce non può essere iniettato in primavera a causa dell'elevata pressione xilematica che lo caratterizza a differenza di peri, meli e drupacee che però assorbono lentamente. Inoltre, trattamenti in inverno e primavera si sono dimostrati maggiormente capaci di indurre fenomeni di fitotossicità rispetto alle applicazioni estive e autunnali (Reil, 1979).

Piante irrigate regolarmente presentano un tasso d'assorbimento maggiore prima di un'irrigazione, così come esemplari in buona salute assorbono più velocemente rispetto a piante infette.

L'endoterapia tramite pressione è stata applicata con successo in numerose specie arboree da frutto quali pistacchio, pero, melo, pesco, susino, mandorlo e ciliegio. Tra queste l'albicocco deve essere trattato con una pressione inferiore a 690 epa., poiché una pressione più alta può causare fuoriuscita di gomma. Noce, pecan, olivo e avocado richiedono diversi minuti per assorbire un quarto della quantità di soluzione assorbita dalle altre specie. Nella vite e nei limoni la velocità

d'assorbimento è molto bassa con 10 minuti necessari per poco più di mezzo litro (Reil, 1979).

Tra gli alberi ornamentali iniettati con successo vi sono: frassino, palme, sicomoro, canfora, olmo, eucalipto, liriodendro, acacia, pino, quercia, zelkova, acero, pino e altre conifere (Appel e Kurdyla, 1992; Guest *et al.*, 1994; Doccola *et al.*, 2007; Garbelotto *et al.*, 2007).

La migliore pressione per l'iniezione è quella che permette il massimo movimento di soluzione all'interno dell'albero senza danneggiarlo fisicamente; essa può variare da 700 a 1378 KPa in base alla specie. Pressioni superiori a 1300 KPa non riducono apprezzabilmente il tempo dell'iniezione e aumentano le possibilità di danneggiamento ai tessuti o di versamento all'esterno della soluzione.

L'applicazione con basse pressioni è opportuna nel caso di alberi con corteccia danneggiata o con aree necrotiche nel tronco, ma nello stesso tempo possono essere nocive. È stato osservato, infatti, che i prodotti iniettati a pressioni inferiori a 700 KPa risultano più concentrati in alcune branche dell'albero e meno in altre, causando fitotossicità nelle prime e scarsa efficacia nelle seconde. Ad esempio, ossitetraciclina e solfato ferroso causano gravi danni quando iniettati per assorbimento naturale a 100 KPa, mentre a parità di concentrazione non danno problemi a pressioni di 825 e 1378 KPa.

Le sostanze solubili in acqua possono essere iniettate facilmente, sebbene le grosse molecole organiche siano assorbite più lentamente. Tra i fitofarmaci usati con successo in endoterapia si possono menzionare ossitetraciclina, carbendazim, oxydemeton – metile, tiabendazolo e acefate mentre tra i concimi sono stati utilizzati con successo urea, nitrato di potassio, solfato ferroso, solfato di zinco, solfato di magnesio e ferro chelato. La concentrazione ideale per i nutrienti varia con la specie e con i prodotti utilizzati. I chelati di ferro ad alte dosi causano effetti fitotossici in una fase iniziale, ma le piante trattate si risanano da carenza e rispondono con una regolare produzione di foglie. In alcune specie, inoltre, le alte concentrazioni si muovono più lentamente delle soluzioni più diluite.

Infine, non bisogna trascurare gli aspetti relativi alla qualità dell'acqua e alle caratteristiche dei recipienti utilizzati. Le impurità nell'acqua possono far diminuire notevolmente i tassi d'assorbimento. L'ossitettraciclina in soluzione acquosa s'inscurisce a contatto con la luce e l'aria, ma ciò non ne riduce l'efficacia. Tuttavia, dopo 24 ore si potrebbe verificare l'inattivazione della sostanza per fotolisi, rendendo necessario l'utilizzo di recipienti opachi per prolungare la durata dell'efficacia del prodotto. Alcuni prodotti se esposti all'aria possono andare incontro a fenomeni di precipitazione (Reil, 1979).

## **1.6 Apparati per trattamenti endoterapici**

Numerosi strumenti sono stati brevettati per effettuare interventi di endoterapia alle piante arboree (fig. 1), ma si conoscono anche efficienti sistemi realizzati in maniera artigianale e poco costosa. E' il caso, ad esempio, del tubo per iniezione usato da Helson *et al.* (2001) per il trattamento delle conifere. I componenti di questo strumento erano costituiti da una valvola d'iniezione, un pezzo di tubo di plastica da 20 mm (diametro interno 11 mm e 14 mm diametro esterno), un tubo principale per la soluzione (diametro interno 13 mm e diametro esterno 17,5 mm) tagliato alla lunghezza necessaria per contenere il volume richiesto, una valvola di una camera d'aria di un'automobile e due cravatte ferma – tubo. Il bulbo di gomma alla base della valvola era rimosso al fine di poterla applicare all'interno del tubo principale. Il foro largo 9,5 cm e profondo 6 cm, leggermente inclinato, era praticato mediante un trapano vicino alla base del tronco. I residui di legno erano rimossi dal foro e l'iniettore di plastica era introdotto nel foro fino ad arrivare ad un punto di resistenza solida. Il tubo di plastica era riempito con il volume desiderato di soluzione e chiuso con la valvola della camera d'aria sigillata con una cravatta ferma – tubo, alla quale si collegava una pompa d'aria

per biciclette per pressurizzare il tubo fino a 275 KPa. Due fori erano solitamente praticati alla base dell'albero ponendo in ognuno un tubo d'iniezione.

In un altro sistema è stata utilizzata una tanica solitamente utilizzata per contenere il freon, opportunamente modificata (Filer, 1973). I materiali necessari per modificare la tanica comprendevano un adattatore per tubo di plastica, una valvola, due rubinetti, un raccordo a T, una boccola e una valvola. Per mettere in opera il metodo la soluzione doveva essere aggiunta, mediante il tubo, prima di mettere in pressione la tanica (448 KPa). In un foro largo ½ pollice e profondo 3 era inserito l'ago. e l'installazione richiedeva circa 10 minuti. Questo apparato è stato usato per la prima volta nel 1972 contro la necrosi floematica dell'olmo iniettando tetraciclina. La soluzione è stata iniettata in un singolo foro per pianta. Per ogni trattamento successivo il nuovo foro era praticato in un'altra direzione cardinale. Tale metodo è stato utilizzato anche su altre specie: albero della gomma, quercia rossa, pecan, sicomoro e frassino.

Al fine di utilizzare un equipaggiamento limitato e di facilità d'impiego e di consentire un rapido assorbimento dei soluti valutando, al contempo, la quantità di prodotto somministrato Helburg *et al.* (1973) misero a punto un sistema per micro - iniezione che prevedeva l'uso di un trapano carotatore con punta da 4,5 mm modificato e una siringa da 60 ml con ago ipodermico. Dopo aver praticato il foro si estraeva la carota di legno e si reinseriva il trapano nel foro. La soluzione era iniettata tramite la siringa direttamente dentro il trapano e pressurizzata a 275 - 413 KPa. Il tempo necessario ad assorbire 60 ml variava da un minuto ad un minuto e mezzo.

Oggi in commercio esistono numerosi kit già pronti per trattamenti endoterapici sia per macro che per micro - iniezione.

Uno di questi è il sistema denominato Mauget, il quale utilizza delle cartucce pressurizzate contenenti il prodotto da iniettare in soluzione acquosa. Questo metodo richiede fori larghi 4 mm, profondi 1 cm e spazati sul diametro di circa 15 cm. Il numero di cartucce cambia in base alla specie da trattare e allo scopo dell'intervento. Le cartucce sono rimosse dopo che il liquido è stato

completamente assorbito (tempo medio d'assorbimento 30 minuti, variabile da 15 a 40 minuti).

Nel caso di applicazione endoterapiche di formulati commerciali polverulenti si ricorre alla tecnica denominata CSI. Essa consiste nel praticare fori del diametro di 9 mm, profondi 3 cm e spazati 10 cm lungo il diametro, distribuiti a spirale partendo da 15 cm sopra il livello del suolo. Ai fori sono applicate delle cartucce, contenenti una gelatina in cui sono disciolti i prodotti polverulenti, spinte tramite un martello fino a che il margine esterno della cartuccia è allineato con la corteccia. Per i trattamenti endoterapici in pressione si trova in commercio l'apparecchio denominato Arboprof<sup>®</sup>. L'apparato è essenzialmente costituito da un serbatoio per i liquidi e un serbatoio per l'aria della capacità di 15 litri a 8 bar. Il serbatoio per il liquido posto sopra il contenitore per l'aria ha una capacità di 3 litri, peso a vuoto 6,3 kg ed è munito di 8 rubinetti porta – iniettore. Ad essi sono collegati i tubi alla cui estremità è fissato l'iniettore che è inserito all'interno del foro sul fusto.



**Fig. 1 – Differenti apparecchiature per trattamenti endoterapici.**

## **1.7 Il ruolo dei solventi**

Una delle problematiche dell'endoterapia è legata alla scarsa solubilità in acqua d'elevate concentrazioni di alcuni principi attivi. Per garantire l'efficacia del trattamento mediante iniezioni al tronco è necessario somministrare una massiccia dose di prodotto attraverso la ristretta area del punto d'iniezione.

Per ovviare a questo problema i prodotti con scarsa solubilità in acqua possono essere disciolti in mezzi non acquosi purché questi non siano fitotossici. In uno studio su melo sono stati valutati gli effetti della tecnica endoterapica a pressione con l'uso di un solvente acido miscelato ad una soluzione a base di tiabendazolo (Pinkas *et al.*, 1973). Questo principio attivo, infatti, a causa della bassa solubilità (50µg/ml) richiederebbe elevati volumi d'acqua. Nel caso citato, in una prima fase del trattamento è stato evidenziato un accumulo del fungicida in prossimità del sito d'iniezione dovuto probabilmente a fenomeni di precipitazione legati al basso pH della soluzione. In seguito, è stata evidenziata una redistribuzione del prodotto che ha permesso la migrazione del fungicida verso l'alto. Sempre in merito al ruolo e all'importanza del solvente negli interventi endoterapici, alcuni autori hanno evidenziato come l'uso di un solvente alcolico su un principio attivo ad attività fungicida (Helton e Rohrbach, 1966) determina una rapida distribuzione del prodotto, seguita da una scomparsa relativamente veloce dei residui tossici dal sistema analizzato. D'altra parte i trattamenti senza solvente hanno dimostrato un effetto più prolungato nel tempo.

## **1.8 Applicazioni pratiche**

Numerose sono le applicazioni endoterapiche sia in campo sperimentale che nella difesa delle piante in campo.

In alcuni esperimenti l'iniezione di sostanze all'interno degli alberi è stata utilizzata per studiare l'interazione di alcune sostanze in soluzione con i processi fisiologici delle piante. In questo modo esse sono sottratte all'assorbimento radicale con il quale sono filtrate e talvolta modificate. Infatti, somministrando talune sostanze per via radicale non sempre si riesce ad ottenere una concentrazione elevata nei tessuti.

In alcuni casi l'endoterapia è stata impiegata in prove di patogenicità in cui era difficile inoculare il patogeno nelle piante e riprodurre i sintomi dell'infezione. Un esempio è rappresentato della clorosi variegata degli agrumi causata da *Xylella fastidiosa* che vive nello xilema. Una prova ha permesso di riprodurre i sintomi della malattia a livello sperimentale su una gran percentuale d'alberi attraverso l'iniezione dell'inoculo di cellule batteriche per via endoterapica (Lopes *et al.*, 2005).

In campo entomologico sono numerosi i successi riportati in endoterapia. Basti citare ad esempio il contenimento di alcuni insetti defogliatori di conifere forestali mediante trattamenti endoterapici con azadiractina (farina di semi di Neem disciolta in etanolo) utilizzata a basse dosi (Helson *et al.*, 2001). I trattamenti aerei richiederebbero, a parità d'efficacia, alti volumi d'insetticida con notevoli rischi per gli ecosistemi forestali. Inoltre, trattamenti endoterapici con prodotti a base d'azadiractina presentano una lunga persistenza, pertanto nei climi temperati interventi praticati prima dell'inverno possono garantire una protezione fino alla primavera successiva. Nel 2006 tramite l'iniezione d'azadiractina sono stati ottenuti buoni risultati nei confronti di *Tessarotoma papillosa* su Litchi (Schulte *et al.*, 2006). Koehler e Campbell (Koehler e Campbell, 1968) hanno valutato trattamenti in endoterapia nei confronti d'insetti che attaccano le alberature. Le prove effettuate hanno dimostrato una buona attività contro l'afide fogliare (*Myzocallis ulmifolii*) su olmo, *Neoborus* spp. e *Prociphilus* spp. su frassino, gli afidi (*Eucaraphis betulliae* e *Neosymydobius annulatus*) su betulla europea, l'afide del tiglio (*Eucallipterus tiliae*), *Drepanaphis acerifoliae* e *Periphyllus lyropictus* su melo, afidi del genere *Myzocallis* e *Phryganidia californica* su

quercia, *Stomacoccus platani* e *Lithocolletis felinella* su sicomoro. Su abete del Canada ottimi risultati sono stati ottenuti contro l'omottero adelgide *Adelges tsugae* (McClure, 1992) con l'utilizzo di un apparato di tipo Arborjet® a microiniezione di imidacloprid (Doccola *et al.*, 2003), contro cicaline su biancospino (*Crataegus* spp.) (Gill *et al.*, 1999). Su eucalipto rosso (*Eucalyptus camaldulensis*) si è riusciti a contenere la psilla *Glicaspis brimblecombei* (Young, 2002) e su abete canadese, *Bursaphelenchus xylophilus* responsabile del seccume del pino.

Per quanto riguarda i parassiti fungini, molti alberi da frutto sono suscettibili a malattie causate da funghi che attaccano il sistema vascolare. Questi funghi riescono a penetrare in profondità nei tessuti del fusto e i fungicidi applicati esternamente non riescono più a raggiungerli, il contenimento diventa difficoltoso e dipende in buona parte dalla concentrazione del prodotto che si raggiunge nel sito d'infezione. In questi casi, l'immissione nel sistema vascolare di sostanze ad azione fungitossica o fungistatica presenta notevoli vantaggi (Whiley *et al.*, 1992; Darrieutort e Lecomte, 2007; Amiri *et al.*, 2008).

Tra i successi ottenuti nel contenimento di patologie fungine si possono citare: il contenimento di *Cytospora* spp. su susino mediante l'utilizzo di diversi prodotti chimici in differenti formulati (Helton e Rohrbach, 1966) e il contenimento del marciume radicale da *Phytophthora cinnamoni* su avocado con macroiniezioni di Phosethyl – Al ripetute sei volte l'anno (Darvas *et al.*, 1984).

Nel 1974 Jaynes e Van Alfen hanno riportato i buoni risultati ottenuti nel contenimento delle infezioni di *Endothia parasitica*, agente causale dell'avvizzimento di *Castanea dentata*. La prova ha permesso di confrontare l'efficacia di due trattamenti endoterapici a base di Benomyl e di Mehyl – 2 – Benzimidazolo Carbammato. Mentre non è stata rilevata alcuna efficacia da parte del benomyl, a causa probabilmente della scarsa distribuzione del fungicida dovuta a occlusione dei vasi da parte della sospensione, è stata ottenuta una significativa riduzione dell'infezione mediante iniezioni a base di MBH – Cl con effetti osservati fino a nove mesi dopo l'applicazione (Jaynes e Van Alfen, 1974).

Uno studio effettuato in Malesia ha permesso di valutare l'efficacia di fungicidi applicati in endoterapia per il contenimento di *Ganoderma* sp. su piante di palma da olio. I fungicidi benomyl in miscela con thiram, bromoconazolo, esaconazolo, triadimefen, triadimenol e tridemorph sono stati applicati mediante endoterapia attiva su esemplari di 22 anni d'età. I rilievi effettuati ad intervalli di tre mesi hanno mostrato l'efficacia di bromoconazolo ed esaconazolo comparati con gli altri fungicidi ed il controllo non trattato. Un'ulteriore prova ha permesso di determinare gli effetti di differenti metodi d'applicazione delle soluzioni. I risultati hanno permesso di dimostrare una maggiore efficacia dei trattamenti mediante endoterapia attiva rispetto a quelli ad assorbimento naturale e alle applicazioni al terreno (Idris *et al.*, 2002).

Importanti risultati sono stati ottenuti anche nel contenimento di batteri, fitoplasmi e spiroplasmi mediante l'iniezione d'antibiotici. Si possono citare al riguardo le applicazioni endoterapiche nei confronti del "greening" e dello stubborn degli agrumi con l'uso d'idrocloruro di tetraciclina, (Schwarz e Van Vuuren, 1971) e del Pear Decline causato da un fitoplasma con iniezioni di tetraciclina (Nyland e Moller, 1973). Trattamenti sperimentali con l'antibiotico ossitettraciclina (OTC) sono stati compiuti su palma da cocco nei confronti di un fitoplasma agente del giallume letale in Florida (McCoy, 1977). In questo studio è stato osservato un uniforme livello di OTC nelle foglie sia attraverso iniezioni al tronco sia alla base del picciolo fogliare. Considerata la localizzazione del patogeno a livello floematico, l'efficacia delle applicazioni al picciolo hanno permesso di dimostrare come l'antibiotico dopo essersi distribuito per via apoplastica nelle foglie era trasferito, per via attiva o passiva, nel floema ed esportato per via sistemica. La tecnica dell'iniezione in questo punto ha permesso, inoltre, di eliminare il problema connesso con le applicazioni al tronco, che determinavano la fuoriuscita di essudati dal foro con conseguente annerimento della zona circostante.

Nella gestione delle carenze nutrizionali l'endoterapia è stata utilizzata nel tentativo di ovviare ad alcuni inconvenienti tipici degli interventi curativi per via radicale quali il lungo tempo, a volte, necessario per il recupero e l'elevato costo

dei trattamenti legato alla necessità di impiegare grosse quantità di composti (Reil *et al.*, 1978; Yoshikawa *et al.*, 1982).

In alcuni casi vi si ricorre quando l'assorbimento per via fogliare e radicale si dimostra poco efficiente. Le prime notizie di trattamenti endoterapici contro le carenze risalgono al 1928 quando Thomas e Haas tentarono di intervenire contro la clorosi ferrica su agrumi. Questo studio consentì di verificare che l'intervento non era risolutivo e che erano necessari periodici interventi per mantenere lo stato nutrizionale della pianta. Alla stessa conclusione arrivarono Kadman e Cohen (1973) sperimentando l'endoterapia su piante adulte di avocado che presentavano carenze di ferro in California. Essi hanno saggiato iniezioni con e senza pressione applicando ferro sotto forma di sequestrene 138 – Fe ottenendo una rapida risposta a costi limitati. Tuttavia l'effetto del trattamento era breve e molti degli alberi trattati necessitavano di numerosi interventi per ottenere un'uniforme distribuzione del composto nella pianta.

Un'interessante applicazione dell'endoterapia ha riguardato il suo possibile utilizzo per l'iniezione di regolatori di crescita nelle piante. L'applicazione è stata proposta nel 1978 da Brown al fine di controllare la crescita delle alberature in prossimità delle linee elettriche descrivendo nello stesso tempo alcune attrezzature per macro e micro – iniezione facilmente trasportabili e idonee all'intervento (Brown, 1978; Arron, 1986). Studi successivi (Bieller, 1991) hanno però dimostrato che l'iniezione al tronco non rappresenta il miglior sistema di somministrazione dei regolatori di crescita, poiché sono stati osservati emissioni di linfa dai fori per diverse stagioni, spaccature nei tronchi dovute a danni al tessuto cambiale e fenomeni di compartimentazione nel legno sopra e sotto il punto d'iniezione con grave danno estetico e strutturale.

È stata segnalata infine, almeno in un caso, la possibilità di controllare alcune infestanti arboree somministrando erbicidi per via endoterapica, come riportato su *Alianthus altissima* pianta importata come ornamentale e divenuta una pericolosa infestante in Nord America (DiTomaso e Kyser, 2007).

## 1.9 Aspetti positivi e negativi dell'endoterapia

I trattamenti endoterapici presentano diversi vantaggi rispetto ai tradizionali trattamenti alla chioma o alle radici. Infatti, laddove non sia possibile intervenire con trattamenti esterni alla chioma come nel caso delle alberature urbane e di quelle forestali, l'endoterapia rappresenta una valida alternativa. Inoltre, nel caso d'interventi nei delicati ecosistemi forestali, permette di ridurre al minimo i rischi derivati dall'immissione nell'ambiente di prodotti con scarsa selettività o con scarsa degradabilità ambientale e rappresenta l'unica alternativa nei casi di patogeni che per la loro localizzazione nell'ospite sono, altrimenti, difficilmente raggiungibili.

La tecnica presenta comunque diversi svantaggi legati soprattutto alle scarse conoscenze su alcuni aspetti del trattamento. Una delle problematiche di questa tecnica è legata alla mancanza di prodotti commerciali che si adattano alle iniezioni sistemiche. Ad esempio, i primi formulati commerciali a base di azadiractina non erano adatti a causa della scarsa solubilità in acqua di questo principio attivo, mentre l'iniezione di azadiractina sottoforma di estratto di semi di Neem (Nemol) miscelato con un solvente (etanolo) risultava efficace e veloce (Helson *et al.*, 2001). La velocità di traslocazione delle sostanze nello xilema è variabile in base al tipo di formulato, alla quantità somministrata e alla specie iniettata.

Un ulteriore problema legato ai trattamenti endoterapici è rappresentato dai fori praticati nell'albero. Le ferite causate da questi fori sono del tutto simili a quelle che un albero subisce diverse volte nel corso della sua vita. Molte di queste sono dovute a rotture in seguito all'azione di vento, ghiaccio, neve, o animali. Alcune ferite, inoltre, sono causate intenzionalmente dall'uomo per fini produttivi, motivi di sicurezza, motivi paesaggistici. I fori praticati con i trattamenti endoterapici, possono danneggiare l'albero sia direttamente che indirettamente. Il danno diretto si manifesta nel caso di fori eccessivamente larghi o profondi che impediscono la

traslocazione delle soluzioni a livello del legno e della corteccia, mentre il danno indiretto si determina quando i fori fungono da via d'ingresso per insetti e agenti patogeni.

Generalmente, il danno diretto determina un rallentamento della crescita quando ad essere danneggiato è più del 50% della corteccia lungo la circonferenza e si arriva alla morte o deperimento della pianta quando il danno interessa almeno il 75%. Iniezioni a pochi centimetri di distanza alla base di un albero possono bloccare fino al 20% del suo sistema di trasporto. Fori d'iniezione con un angolo compreso tra 30 e 45° sono stati associati a fenomeni quali colonne di legno scolorito, xilema occluso, corteccia morta e parenchima alterato. Tali pratiche possono alterare il trasporto del 40% e oltre (Perry *et al.*, 1991).

La reazione del legno alle ferite comprende processi che avvengono internamente ed esternamente. La reazione interna del legno è descritta dall'ipotesi detta CODIT (Compartimentalization Of Decay In Trees) elaborata da Shigo (Shigo, 1984). Studi a lungo termine hanno mostrato che ferite inferte in seguito a procedure endoterapiche sono associate a colonne di xilema decolorato ed occluso. Spesso a ciò consegue anche un decadimento del legno stesso (Perry *et al.*, 1991). La reazione sulla superficie del foro è, invece, quella che porta alla rimarginazione della ferita e consiste nella formazione di callo, cioè tessuto di riparazione costituito da cellule indifferenziate. Esso di solito si forma a partire dal tessuto cambiale, ma frequentemente si origina anche dalle cellule dei raggi midollari o da altri tessuti parenchimatici simili. Dopo la sua formazione le cellule si differenziano nei vari tessuti. Il processo si conclude con la chiusura del foro. In studi incentrati sui tempi della chiusura delle ferite Neely sostenne che il processo di rimarginazione era quello prevalente nel processo di reazione alle ferite (Neely, 1988). Il tempo necessario per la chiusura di una ferita dipende dalla specie, dalla grandezza della ferita, dalla vigoria dell'albero. Piccoli fori praticati in primavera-estate possono richiudersi in poche settimane. La formazione del callo avviene contemporaneamente alla formazione e alla distensione del tessuto cambiale. Tale formazione avviene di solito in primavera-estate, per cui per ottenere una buona

chiusura dei fori è opportuno che essi siano praticati poco prima dell'inizio dell'attività vegetativa primaverile. Dato che i carboidrati, che sono sintetizzati dalle foglie e trasportati in direzione basipeta verso le radici, sono presenti nel tronco con un gradiente decrescente dall'alto verso il basso, un foro praticato in alto di solito si rimargina prima di uno praticato più in basso. Il processo prima descritto richiede che la pianta sia dotata di un tessuto cambiale, infatti nelle specie monocotiledoni che non hanno capacità di crescita secondaria quali ad esempio le palme, le ferite e i fori rimangono aperti.

Reazione interna ed esterna sono due processi che avvengono indipendentemente l'uno dall'altro. Può così avvenire che ad un'ottima cicatrizzazione esterna corrisponda la formazione di ampie aree decolorate internamente dovute a scarsa compartimentazione, così come ad una scarsa cicatrizzazione esterna può corrispondere un'ottima compartimentazione e l'assenza di decolorazione (Shigo *et al.*, 1977). Le ferite causate dai fori delle applicazioni endoterapiche non sono di per sé particolarmente dannose, nella misura in cui i meccanismi fisiologici e strutturali delle piante siano in grado di ripararle. Le sostanze chimiche applicate attraverso questi fori spesso hanno un effetto fitotossico maggiore di quello creato dal foro in sé (Neely, 1988).

Ai rischi legati all'alterazione del sistema di trasporto si aggiungono quelli dovuti all'apertura di vie d'ingresso per numerosi agenti patogeni parassiti obbligati o occasionali che vivono a spese dei tessuti legnosi. Anche se si parla spesso dei patogeni che comunemente invadono il legno nessuno descrive tentativi di sterilizzare i siti d'iniezione e i trapani in nessuna fase del processo d'iniezione. Perry *et al.* (1991) hanno evidenziato la presenza di popolazioni di microrganismi insediate nella corteccia e nello xilema degli alberi e hanno concluso che l'applicazione di tecniche asettiche per quanto auspicabile è da considerarsi poco realizzabile nella pratica. I trapani e gli apparati usati anche se spesso sono sterilizzati prima dell'impiego, rappresentano comunque un potenziale mezzo di trasferimento degli organismi patogeni da un esemplare all'altro. Nelle applicazioni pratiche, inoltre, le differenze anatomiche e fisiologiche delle specie

sono ignorate e sono usati gli stessi apparati e le stesse tecniche per tutte le specie comprese le palme, trascurando il fatto che esse non hanno uno strato cambiale. Perry *et al.* (1991) hanno notato che a fronte degli innumerevoli rischi collegati alle ferite inferte agli alberi dagli interventi endoterapici esistono numerose altre tecniche tradizionali (irrorazioni alla chioma, trattamenti radicali, irrorazioni alla corteccia) in grado di rappresentare una valida alternativa agli interventi endoterapici, ma questa valutazione non considera i rischi ambientali derivanti dall'uso di queste tecniche.

Le tecniche endoterapiche sono, inoltre, fortemente influenzate dalle caratteristiche del legno delle diverse specie. Le tecnologie d'iniezione sviluppate per risolvere specifici problemi la Grafiosi dell'olmo o il Pear decline non possono essere trasferiti tal quali per la risoluzione delle problematiche su altre specie a causa, innanzitutto delle differenze tra i patogeni e parassiti bersaglio, ma anche perché le specie arboree differiscono per struttura e disposizione degli elementi conduttori, nonché per i modelli stagionali del contenuto e movimento dell'acqua. Reil (1979) ha riportato una considerevole variabilità nei tassi d'assorbimento con iniezione ad alta pressione in varie specie arboree in California.

Ad oggi non esiste un catalogo o una revisione tecnica che i ricercatori o gli specialisti nella cura degli alberi possano consultare per scegliere la procedura d'iniezione più conveniente ed efficace per una data specie arborea (Sinclair e Larsen, 1981). Sinclair e Larsen hanno riportato che una tecnica d'iniezione che funziona bene per una specie arborea può risultare idonea per le specie ad essa correlate, ma essere completamente inappropriata per le specie non correlate. Per una data tecnica, differenze nel tasso d'iniezione tra le specie sono legate alle caratteristiche anatomiche del legno. Nelle conifere (*Gymnospermae*), in particolare, le iniezioni risultano meno efficaci rispetto alle angiosperme, e l'assorbimento delle soluzioni risulta spesso incompleto (Sánchez-Zamora e Fernández-Escobar, 2000). Questa differenza di comportamento è spiegata dalla struttura del loro legno. Lo xilema delle conifere è composto principalmente da

tracheidi che oppongono grande resistenza al movimento dell'acqua rispetto alle angiosperme, nelle quali lo xilema è composto da vasi con diametro maggiore. In più, alcune specie di conifere, producono resine in risposta alla perforazione del tronco e questo può portare ad un notevole decremento della velocità di assorbimento in primavera che è il periodo di maggiore secrezione di resina. Per queste ragioni le iniezioni alle conifere sono meno frequenti che nelle angiosperme. Da alcuni esperimenti, svolti da Sánchez-Zamora e Fernández-Escobar (2000), è stato evidenziato che la quantità di liquido assorbito dipende non solo dalla specie, ma anche dalle dimensioni dell'iniettore. In genere, infatti, il tasso di assorbimento cresce al crescere del diametro dell'iniettore. In specie non resinose l'uso dell'iniettore da 4 mm consente di ottenere risultati accettabili e paragonabili a quelli ottenuti con spilli comunemente usati del diametro di 6 mm. L'uso di un iniettore da 3 mm deve essere limitato a casi isolati perché si è osservato in diversi casi la sua occlusione. Questi autori hanno concluso che per le piante resinose risulta migliore l'uso di un iniettore da 7 mm ad eccezione che per *Pinus canariensis* per il quale è opportuno utilizzare un iniettore da 6 mm.

Di solito la quantità totale iniettabile aumenta all'aumentare della durata del trattamento ma questi studi hanno riportato, che l'assorbimento da parte delle conifere è lento e parziale anche dopo 48 h di trattamento. Indipendentemente dalle dimensioni dell'iniettore, nelle conifere, inoltre, sono stati osservati minori tassi di assorbimento in giugno ad eccezione di *Pinus canariensis* e *P. pinea* che invece nello stesso mese hanno mostrato tassi di assorbimento maggiori. Quando erano iniettate in primavera, nel momento della massima secrezione di resina, l'assorbimento d'acqua decresceva drasticamente in tutte le specie, con l'eccezione di *P. canariensis*, la quale produceva molta meno resina (Sánchez-Zamora e Fernández-Escobar, 2000).

La distribuzione uniforme delle soluzioni iniettate attraverso l'intera pianta è un fattore determinante che può limitare l'uso di questa tecnica in quanto i prodotti chimici potrebbero accumularsi esclusivamente in un sito dell'albero e non in altri. Molti fattori, tra cui la profondità del foro, la posizione dell'iniettore, la

struttura dell'albero, il numero d'iniettori per albero, condizionano la distribuzione della soluzione.

Anche il metodo di iniezione influenza la redistribuzione delle sostanze iniettate (Sánchez-Zamora e Fernández-Escobar, 2004). La tendenza attuale sulle piante resinose è quella di utilizzare sistemi a bassa pressione comprendenti apparati individuali in ogni punto di iniezione in modo da controllare la quantità di materiale applicato in ogni parte. La migliore redistribuzione che si ottiene nelle conifere porta spesso a compensare il non completo assorbimento della soluzione. Nelle conifere la distribuzione monitorata tramite un colorante è risultata molto più omogenea di quella rilevata in piante d'olivo e la concentrazione ottenuta in ogni punto della pianta è risultata quasi il doppio.

Nel 2001 Helson e alcuni studiosi, grazie al sistema d'iniezione a tubo da loro ideato, riuscirono ad iniettare con successo numerose conifere con l'estratto dei semi di Neem (Helson *et al.*, 2001). In uno studio successivo è stata evidenziata l'efficacia del sistema messo a punto da Helson su esemplari di *Pinus silvestris* nei confronti di nematodi (James *et al.*, 2006).

Alla luce dei possibili inconvenienti l'endoterapia deve essere scelta come metodo d'applicazione soprattutto quando: 1) non esiste nessun'altra via per introdurre nutrienti o agrofarmaci, 2) si vogliono evitare i rischi associati all'inquinamento ambientale legato alle tecniche per aspersione, 3) si vogliono ottenere maggiori benefici economici (Stipes, 1988).

### **1.10 Risposta dei tessuti e movimento delle soluzioni nelle piante ornamentali**

L'iniezione al tronco di fitofarmaci è stata valutata per l'uso diffuso su diverse specie quali palme (McCoy, 1977; Muthuraman, 1984; El Ezaby, 1997; Azam e Razvi, 2001; Idris *et al.*, 2002; Hernandez-Marante *et al.*, 2003), angiosperme a

foglia larga (Harrell, 2006), conifere legnose (Doccola *et al.*, 2003) e *Cycadales* (Fisher *et al.*, 2009) per il contenimento di patogeni, insetti e per il risanamento di carenze di elementi nutritivi.

Le prime prove d'endoterapia su palme sono state effettuate per valutare gli effetti di antibiotici per il contenimento di una malattia letale causata da un micoplasma su palma da olio. L'iniezione di soluzioni acquose dell'antibiotico direttamente nello stipite delle piante è risultato il solo metodo efficace nel determinare elevati livelli di antibiotico nelle foglie e un buon contenimento della malattia. Trattamenti fogliari e al terreno sono risultati inefficaci e producendo bassi o nulli contenuti di antibiotico nelle foglie. I migliori risultati sono stati ottenuti praticando fori del diametro di 3-6 mm e di circa 75 mm di profondità. A causa, però, della mancanza nelle palme della crescita secondaria, i fori prodotti sulle piante trattate non cicatrizzavano e da questi era possibile osservare la fuoriuscita di linfa con annerimento della zona circostante la ferita. Di conseguenza, è stata anche valutata l'iniezione delle soluzioni nelle guaine fogliari. Le prove hanno dimostrato un'efficacia equivalente alle iniezioni al tronco. La distribuzione uniforme dell'antibiotico ottenuta anche in questo caso è indicativa di un movimento lungo lo xilema nella fase iniziale della traslocazione. Inoltre, l'efficacia nei confronti di un microorganismo localizzato nel floema indicava che la soluzione doveva necessariamente essere trasportata successivamente nel floema ed esportata dalla foglia in maniera sistemica in altri siti. Questa tecnica ha permesso anche di eliminare i danni permanenti associati all'iniezione ai tronchi (Mc Coy, 1977).

Alcune prove sono state effettuate su palma da olio al fine di valutare la capacità delle soluzioni iniettate di distribuirsi all'interno dei tessuti utilizzando differenti volumi di soluzioni miscelate ad un colorante. Il tempo d'assorbimento della soluzione è stato valutato. Immediatamente dopo l'iniezione le piante sono state tagliate ed è stata misurata la distribuzione della soluzione all'interno dei tessuti. Sezioni longitudinali e trasversali prelevate in corrispondenza del punto

d'iniezione, hanno mostrato la diffusione di 5 Lt di soluzione 40 cm sopra, sotto e lateralmente al punto d'iniezione (Idris *et al.*, 2002).

Recentemente, è stato valutato l'uso dell'iniezione ad alta pressione d'insetticidi su *Cycas revoluta* e di altre 5 specie di *Cycas*. Per il fusto delle *Cycas* sono state descritte caratteristiche radiali (Stevenson, 1980; Terrazas 1991), di sviluppo (Bork, 1990), allometriche (Niklas *et al.*, 2006; Niklas e Marler, 2008) e di reazione (Fisher e Marler, 2006). Tuttavia si sa poco sulla risposta di questo tipo di fusto alla perforazione. Inoltre, non sono mai state studiate le connessioni vascolari trasversali tra i vari tessuti, il che limita la conoscenza della fisiologia delle *Cycadales*. Durante le prove sopra citate Fisher *et al.*, (2009) hanno studiato la struttura interna delle piante sezionate nel corso della valutazione del movimento tridimensionale della safranina e la risposta anatomica alle ferite che risultavano dai fori praticati per l'iniezione. La dinamica delle ferite è stata osservata nel corso di dodici mesi di controlli con particolare interesse ai tempi di reazione e alle differenze nelle diverse specie.

Nel corso dell'esperimento sono stati utilizzati diversi esemplari delle seguenti specie: *Cycas adentata* (nove), *Cycas elongata* (tre), *Cycas hainanensis* (tre), *Cycas macrocarpa* (due), *Cycas pectinata* (diciotto) e *Cycas revoluta* (tre). Le piante erano sane e avevano un fusto ben sviluppato con tre o più cilindri vascolari alla base ed erano coltivate in vasi (altezza 40 cm con diametro 35 cm) in un'area ombreggiata.

Il metodo endoterapico prevedeva due fori per tronco. In entrambi i casi, è stato previsto l'uso di un trapano con una punta da 6 mm per praticare i fori attraverso il periderma e la corteccia, fino a raggiungere il cilindro vascolare. Una pianta per ogni specie è stata iniettata, in corrispondenza di ciascun foro, con circa 7 ml di una soluzione acquosa contenente safranina all'1% con una pressione iniziale di 200 psi applicata per 60 s. Per le restanti piante invece la soluzione è stata iniettata lentamente. L'ago d'iniezione è stato rimosso dal foro come consigliato dal costruttore. Alcune piante sono state tagliate 24 ore dopo la somministrazione del colorante allo scopo di determinare il movimento tridimensionale della soluzione

iniettata, le restanti dopo due mesi dalla guarigione dei fori e dopo 12 mesi. I fusti sono stati sezionati con una sega a mano per praticare il taglio principale vicino al punto d'iniezione. Per tutti e tre i periodi d'osservazione, campioni appropriati di tessuto sono stati mantenuti in formalina – alcool – acetico (FAA) e conservati in etanolo al 70%. Il tessuto non trattato è stato sezionato a vari spessori. Le sezioni sono state colorate con blu di toluidina (per l'istologia generale), floroglucinolo: HCl (per le pareti cellulari lignificate), I2KI (per l'amido) e Sudan IV (per le pareti cellulari cutinizzate e suberificate) (Ruzin, 1999). Le immagini delle sezioni sono state catturate con una macchina fotografica digitale montata su un microscopio composto.

Le sei specie di *Cycas* hanno mostrato un comportamento simile in termini di formazione di periderma da ferita. Le cellule parenchimatiche vive della corteccia, degli anelli vascolari e della corteccia adiacenti al foro e al tessuto necrotico secondario andavano incontro a mitosi e producevano file di cellule perpendicolari alla superficie del foro o delle aree danneggiate.

Da questi studi si evince come la potatura o la rimozione di getti avventizi per la propagazione delle *Cycas* (o qualsiasi forma di danneggiamento) devono essere seguiti da trattamenti profilattici per prevenire l'invasione da parte di patogeni o l'ovideposizione da parte di artropodi durante la fase di differenziazione del fellogeno in corrispondenza della ferita. Uno dei metodi proposti per proteggere la superficie esposta dei fori è il riempimento con sostanze sigillanti e isolanti.

Il ruolo delle mucillagini nelle *Cycadales* non è stato identificato, le mucillagini potrebbero servire a sigillare e proteggere la superficie di tessuto danneggiato (Norstog e Nicholls, 1997). Nello studio di Fisher *et al.* (2009) in tutte e sei le specie di *Cycas* è stata osservata l'emissione di mucillagini dalle superfici di taglio. Tuttavia sono state osservate differenze nel volume prodotto che non sono risultate correlate con la loro capacità di rimarginare i fori praticati. Quest'osservazione risulta, quindi, in antitesi con l'ipotesi che le mucillagini abbiano la funzione di proteggere le superfici danneggiate da necrosi secondaria.

Nonostante i risultati non siano estensibili a tutte le specie del genere, le sei specie di *Cycas* dello studio hanno mostrato lo stesso comportamento in termini di movimento tridimensionale della safranina attraverso le diverse categorie di tessuti. Dopo un accumulo tra 20 a 40 mm sopra e sotto il punto d'iniezione, la safranina si diffondeva lungo la circonferenza del cilindro vascolare che inizialmente riceveva il colorante e poi si muoveva verso i cilindri vascolari adiacenti e i tessuti corticali attraverso le tracce fogliari.

Sebbene studi istologici hanno messo in evidenza la convoluta direzione delle tracce fogliari e la relazione tra i cilindri vascolari, il metodo usato precedentemente fornisce la prima conferma di quest'efficiente modo di traslocazione trasversale di soluti attraverso questi tessuti. Le osservazioni indicano una distribuzione del sistema di anastomosi che connette il cilindro vascolare con la periferia della corteccia tramite la rete di tracce fogliari passanti attraverso tutti gli anelli vascolari. L'attività cambiale avviene simultaneamente attraverso tutti i cilindri vascolari (Terrazas, 1991) e forma nuove tracheidi in ogni cilindro e possibilmente nei fasci xilematici che connettono i cilindri vascolari concentrici.

Sulla base dello studio condotto da Fisher *et al.*, il tessuto vascolare del fusto delle *Cycas* è molto suscettibile a danno diretto da pressione fisica. Inoltre, il tessuto corticale che rimane esposto dopo un qualsiasi tipo di danneggiamento è particolarmente suscettibile ad invasioni secondarie. L'uso di trattamenti di profilassi per ridurre l'accesso di artropodi e patogeni è in grado di minimizzare il rischio di complicazioni secondarie anche quando un intervento colturale errato rimuove lo strato protettivo dal tessuto corticale succulento.

## 2. Le *Cycadales*

### 2.1 Inquadramento botanico

Appartenenti al phylum delle *Spermatophyta*, le *Cycadales* sono incluse nella divisione *Gymnospermae* (Strasburger, 1998) sulla base di alcune caratteristiche quali fiori unisessuati anemofili, ovuli nudi non racchiusi da un ovario, un meccanismo di trasporto diretto del polline sul micropilo, gametofiti poco ridotti e nutrizione dell'embrione da parte di un endosperma primario. Le gimnosperme comprendono le *Spermatophyta* filogeneticamente più antiche le cui forme ancestrali risalgono al Devoniano superiore. La divisione *Gymnospermae* comprende otto ordini di cui tre (*Cordiales*, *Bennettitales* e *Glossopteridales*) oggi estinti e cinque (*Gingkoales*, *Cycadales*, *Pinales*, *Taxales* e *Gnetales*) comprendenti i generi ancora viventi (Strasburger, 1998). La maggior parte delle *Cycadales*, estinte in epoche remote, sono note solo allo stato fossile. Quelle ancora oggi viventi sono poste nell'ordine *Cycadales* e suddivise, secondo l'approccio proposto da Johnson in quattro famiglie. Successive ricerche filogenetiche hanno portato alla classificazione riportata in tabella 1.

Attualmente sono conosciute 185 specie viventi di *Cycadales* riunite in 11 generi distribuiti principalmente nelle regioni temperato calde, tropicali e subtropicali di entrambi gli emisferi sparse in quasi tutti i continenti (Jones, 1993).

**TAB. 1 - Classificazione delle *Cycadales* secondo Stevenson (1992)**

Ordine	Sottordine	Famiglia	Sottofamiglia	Tribù	Sottotribù	Genere		
<i>Cycadales</i>	<i>Cycadinae</i>	<i>Cycadaceae</i>					<i>Cycas</i>	
	<i>Zamiineae</i>	<i>Stangeriaceae</i>	<i>Stangerioideae</i>				<i>Stangeria</i>	
			<i>Bowenioideae</i>				<i>Bowenia</i>	
		<i>Zamiaceae</i>	<i>Encephalartoideae</i>	<i>Diooeae</i>			<i>Dioon</i>	
				<i>Encephalarteae</i>	<i>Encephalartinae</i>		<i>Encephalartos</i>	
					<i>Macrozamiinae</i>		<i>Macrozamia</i>	
							<i>Lepidozamia</i>	
			<i>Zamioideae</i>	<i>Ceratozamiaceae</i>			<i>Ceratozamia</i>	
				<i>Zamieae</i>	<i>Microcycadinae</i>		<i>MicroCycas</i>	
					<i>Zamiinae</i>			<i>Zamia</i>
								<i>Chigua</i>

## 2.2 Caratteristiche morfologiche

Le *Cycadales* presentano un fusto, classificato come pachicaule (Stevenson, 1980), che in alcune specie assume la forma di un bulbo sotterraneo mentre nelle specie arborescenti si presenta colonnare con altezze che possono raggiungere anche i 16 metri.

Un fenomeno generalmente raro consiste nella biforcazione o dicotomizzazione dell'apice caulinare il quale si può osservare in talune piante molto larghe (eccetto che in *Stangeria* spp. e *Zamia* spp. con fusti sotterranei). Nelle *Cycadales* la comparsa di branche avventizie è un evento raro e avviene in conseguenza dello sviluppo di bulbilli e polloni presenti alla base del fusto prevalentemente come conseguenza del danneggiamento dell'unica gemma apicale. Le *Cycadales* hanno il più largo apice caulinare tra tutte le piante vascolari che in particolare nel

genere *Cycas* può raggiungere i 30 millimetri di diametro. Il fusto delle *Cycadales* presenta lo xylema poco lignificato e ricco di tessuto parenchimatico e per questo denominato manoxylico (Sporne, 1965; Greguss, 1968). Un'ulteriore particolarità è data dalla presenza di cerchi concentrici di tessuto vascolare che si differenziano alla base del fusto tra la corteccia ed il cerchio esterno più giovane i quali sono prodotti da cambi cribro-vascolari multipli. (Chamberlain, 1935; Bork, 1990; Terrazas 1991). Una corteccia persistente e parenchimatosa è presente nei fusti vecchi e ammalati e non è sostituita da nuovo floema o da periderma come nelle altre gimnosperme. L'attività cambiale si svolge all'interno di ogni cilindro vascolare a prescindere dalla pianta e dalla sua età e dei raggi midollari collegano la corteccia al cilindro centrale (Terrazas, 1991). Un'altra caratteristica di queste piante è data dalla presenza di canali mucosi concentrati soprattutto nel perianzio e nel rachide delle foglie e degli sporofilli. Quando un organo è danneggiato una mucillagine o gomma fuoriesce da questi canali verso l'esterno. Essa si presenta inizialmente trasparente, ma a contatto con l'aria s'indurisce e assume colorazione bruna. Le mucillagini prodotte hanno la capacità di assorbire acqua per un volume pari a 50 – 100 volte il loro volume.

In molte specie di *Cycas* il fusto e le radici sono contrattili. Questo meccanismo ha la funzione, in alcuni ambienti, di difenderle da fattori ambientali ostili come caldo, freddo, aridità stagionale, fuoco, suoli poveri. Gli individui delle specie o i singoli organi che hanno questa capacità presentano la superficie corrugata. La contrazione è dovuta al collasso di alcune cellule della corteccia e del midollo. La variazione di lunghezza, nelle specie di maggiori dimensioni può arrivare al 30%.

### **2.3 La coltivazione delle *Cycas***

Le *Cycadales* hanno sempre avuto, ed hanno tuttora, una posizione di grande importanza nella progettazione di opere architettoniche a verde, e questo fattore ha determinato la loro coltivazione su larga scala.

Queste piante sono facilmente coltivabili in tutti gli ambienti a clima tropicale, subtropicale e temperato adattandosi ad una grande varietà di suoli, mentre in ambienti con condizioni climatiche sfavorevoli necessitano di serre per l'allevamento. Alcune specie prediligono suoli neutri o sub-alcasini probabilmente a causa dell'azione negativa che le condizioni di acidità esercitano sui cianobatteri azotofissatori da cui le *Cycadales* dipendono per l'azoto.

La propagazione delle *Cycadales* può avvenire per seme o per via vegetativa. Trattandosi di piante dioiche e con impollinazione entomofila, per ottenere semi nelle zone dove non sono presenti gli specifici insetti impollinatori è spesso necessario ricorrere all'impollinazione manuale.

Per favorire la germinazione è necessario il riscaldamento basale (25° - 30° C), elevata umidità ambientale e temperature intorno ai 30°C. In questa fase il seme è posto con l'asse maggiore normale alla superficie del substrato e sporgente per più della metà all'esterno. La posizione del micropilo del seme non è condizione discriminante ai fini di ottenere una buona germinazione.

La propagazione vegetativa può avvenire solo mediante alcune porzioni di pianta che possiedono sufficiente attitudine alla rigenerazione, quali germogli basali, gemme caulinari, porzioni di tronco o di foglia. La *Cycas* è una pianta abbastanza rustica che sopporta bene la siccità. Viceversa risente negativamente delle condizioni di eccessiva umidità soprattutto quando è coltivata in contenitori o in piena terra ed è sottoposta ad abbondanti volumi d'adacquamento.

A tal proposito nei terreni molto pesanti e per quelle piante situate in prossimità degli irrigatori è indispensabile limitare le irrigazioni, e risulta utile predisporre sul fondo dei contenitori uno strato di argilla espansa o pomice granulare al fine di assicurare un adeguato drenaggio.

*Cycas revoluta* è una specie molto resistente alle alte temperature e all'aridità dell'ambiente. Tuttavia piante da poco trapiantate o esemplari femminili nella fase d'ingrossamento degli ovuli possono subire danni da insolazione.

Le isole del Giappone in cui la *C. revoluta* è endemica sono caratterizzate da estati calde ed inverni freddi per cui questa specie, a differenza di altre *Cycadales*, sopporta senza subire danni, anche temperature di -10°C.

#### 2.4 Principali malattie della *Cycas*

Le problematiche fitopatologiche a carico di *C. revoluta* sono poche, ma se si considera il loro elevato valore ornamentale, si comprende come esse assumano una notevole importanza economica nell'ambito della produzione vivaistica.

Le fitopatie finora segnalate interessano l'apparato fogliare, gli ovuli o le radici (Polizzi, 1995a). Tra le alterazioni fogliari, numerose sono quelle ad eziologia fungina. Su foglie di *Cycadales* sono stati riportati attacchi di *Alternaria* spp., *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gleosporioides*, *Pestalotiopsis* spp., *Phoma glomerata*, *Ascochyta cycadina*, *Phyllosticta cycadina*, *Mycosphaerella tulasnei*, *Pleospora indica*, *P. cycadis* (America settentrionale), *Leptosphaeria irrepta* (America settentrionale), *Rhabdospora cycadis* (America settentrionale).

Una delle principali malattie è causata dal fungo *P. glomerata*, il quale causa disseccamenti fogliari che si originano dall'apice dei segmenti e proseguono con andamento basipeto sino alla rachide principale. Un alone rosso marrone marca il tessuto ancora sano da quello disseccato. Sulla pagina superiore dei tessuti è possibile osservare gli organi riproduttivi del patogeno caratterizzati da picnidi di colore nero (Polizzi, 1994a).

Sugli ovuli delle *Cycadales* sono stati segnalati attacchi di due specie fungine: *Fusarium moniliforme* e *F. moniliforme* var. *intermedium*.

Tra le malattie ad eziologia fungina *Fusarium solani* è responsabile di marciume delle radici e del fusto. Sull'apparato epigeo la malattia si manifesta con clorosi delle foglie le quali in seguito disseccano e avvizziscono repentinamente (fig. 2). Esaminando l'apparato radicale è possibile osservare estese necrosi delle radici principali e delle radichette che in qualche caso acquistano una consistenza molle.

Il legno alla base del fusto diviene coriaceo e di colore grigio marrone. Gli imbrunimenti si possono estendere fino ad interessare ampie porzioni di midollo. Sulla superficie esterna dei fusti è possibile osservare fruttificazioni fungine chiare riferibili a sporodochi. Le infezioni risultano favorite da condizioni di stress o dalla presenza di ferite causate durante le operazioni di travaso (Polizzi e Grasso, 1994).

Inoltre, a carico delle *Cycadales* è riportata una malattia ad eziologia virale. L'agente causale è stato identificato come *Cycas Necrotic Stunt Virus* (CNSV). CNSV è l'unico virus conosciuto a carico delle *Gymnospermae*. Il virus è stato segnalato per la prima volta nel 1973 in Giappone (Kusunoki *et al.*, 1986) su alcuni esemplari di *C. revoluta*. I sintomi riscontrati consistono in nanismo, accartocciamento delle giovani foglie e macchie clorotiche o necrotiche nelle foglie adulte. Inoltre, le piante malate rallentano rapidamente la loro crescita mentre quelle gravemente colpite muoiono.

Alcune alterazioni segnalate per questa specie sono causate dalla carenza di elementi minerali. Casi di carenza di ferro sono stati riportati su *C. circinnalis*, mentre sono stati osservati raramente su *C. revoluta*.

Sono stati evidenziati, inoltre, danni da carenza di magnesio i cui sintomi sono stati riscontrati solo occasionalmente. Questi risultano molto simili a quelli riscontrati su altre specie e consistono in clorosi delle foglie seguita da necrosi a partire dall'apice dei segmenti fogliari fino ad interessare un'ampia superficie.

La carenza di azoto si manifesta inizialmente con clorosi e riduzione della superficie fogliare. Nei casi più gravi la crescita si arresta e la pianta manifesta uno stato generale di sofferenza. Gli scarsi apporti di azoto e soprattutto le eccessive lisciviazioni sono le principali cause dell'azoto-carenza.

Nei nostri ambienti la fisiopatia più diffusa e dannosa per le *Cycadales* e per *Cycas revoluta* che tra esse è la specie maggiormente coltivata risulta la carenza di manganese.

## 2.5 Carenza di manganese

Gravi alterazioni delle foglie delle *Cycadales* caratterizzate da clorosi e necrosi di varia intensità erano già note da tempo. Nel 1994 due studi, uno italiano (Polizzi, 1994b) e uno americano (Dehgan *et al.*, 1994) hanno dimostrato che tali sintomatologie erano associabili costantemente a stati di carenza di manganese.

Secondo quanto riportato nei due studi, i sintomi di carenza di manganese (fig. 2) si presentano durante i mesi primaverili-estivi sulle nuove foglie e si manifestano con macchie o aree clorotiche più o meno estese che iniziano prevalentemente in prossimità della parte mediana dei segmenti e al centro della foglia. I tessuti clorotici rapidamente necrotizzano e il fenomeno finisce per interessare ampi settori fogliari. Nei casi più gravi il disseccamento può interessare tutte le foglie. Sia pure con intensità diversa i sintomi possono manifestarsi su tutta la nuova vegetazione compresa quella dei germogli presenti alla base o lungo il fusto di piante adulte. Quando la malattia si manifesta durante la fase di prefogliazione il quadro sintomatologico si aggrava: tutte le foglie presentano una diffusa clorosi seguita repentinamente da disseccamento, distorsione e contorsione del rachide.

Negli ambienti mediterranei e specialmente nei suoli d'origine vulcanica la carenza di manganese è un'alterazione molto diffusa sulle *Cycas*.

Il manganese (Mn) è il decimo elemento minerale per abbondanza sulla superficie terrestre, con una concentrazione media nel suolo di 650 ppm (Gilkes e McKenzie, 1988). La facilità con cui questo elemento va incontro a reazioni di ossido-riduzione rende la chimica del Mn nel suolo complessa e non del tutto chiarita. Il manganese è presente nel suolo in tre stati di ossidazione,  $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$  e  $Mn^{4+}$ . Il Mn bivalente ( $Mn^{2+}$ ) è lo stato ridotto disponibile per l'assorbimento da parte di piante e batteri e per il trasporto interno, ed esiste sotto forma di ione libero nella soluzione circolante del suolo o nei siti di scambio cationico. Il  $Mn^{3+}$  idratato esiste nel suolo per brevi periodi di tempo, però è molto attivo nelle reazioni di ossidoriduzioni e viene trasformato in  $Mn^{2+}$  e  $Mn^{4+}$ .

In conseguenza della loro elevata superficie e della reattività riduttiva, gli ossidi del Mn entrano in numerose e importanti reazioni nel suolo tra cui la mineralizzazione dell'azoto, la polimerizzazione dei composti umici e l'accumulo preferenziale di altri micronutrienti come il rame e lo zinco. Si pensa anche che essi partecipino a reazioni sconosciute nell'autossidazione del  $Mn^{2+}$  (Bartlett, 1988).

La prevalenza dell'una o dell'altra forma di manganese è un fattore fortemente influenzato dal pH, dalla concentrazione di  $O_2$  e dall'attività microbica (Gilkes e McKenzie, 1988; Norvel, 1988). Nel suolo il manganese ridotto ( $Mn^{2+}$ ) è favorito da valori bassi di pH e da bassa concentrazione di  $O_2$ , mentre la formazione delle forme ossidate di manganese è favorita da valori alti di pH. Secondo le leggi della termodinamica il Mn, nelle condizioni che comunemente si hanno nel suolo, dovrebbe essere rapidamente ossidato, ma questo non trova riscontro in ciò che si osserva in campo poiché è l'attività sia ossidativa che riduttiva dei microrganismi ad influenzare l'equilibrio tra forma ridotta e ossidata del manganese nella maggior parte dei suoli. Si è osservato, infatti, che i microbi manganese – ossido/riduttori nel suolo sono capaci di aumentare l'ossidazione del Mn di almeno cinque volte (Tebo *et al.*, 1997; Browsers *et al.*, 2000). Per questa ragione i microrganismi tellurici, specie batteri e funghi, hanno un forte effetto sul ciclo globale del manganese e sulla sua disponibilità per le piante (Tinker, 1986; Ghiorse, 1988; Erlich, 1996; Tebo *et al.*, 1997).

Tra le diverse specie vegetali vi sono delle grandi differenze nelle quantità di manganese necessario a far raggiungere una sufficienza fisiologica (da 0,1 a 50  $mmol\ m^{-3}$ ). Alcune prove in vivaio hanno permesso di dimostrare che piante di *C. circinnalis* e *Dioon edule* coltivate sullo stesso substrato di piante di *C. revoluta* con sintomi di carenza, non manifestavano alcun sintomo. Dall'analisi fogliare risulta che piante che manifestano sintomi di carenza solitamente presentano contenuti fogliari di manganese molto inferiori (tra 3,2 e 12,4 ppm) rispetto a piante asintomatiche (tra 18,3 e 46 ppm). Nessuna correlazione è stata invece

dimostrata tra casi di carenza e contenuto di manganese nel terreno, le cui dinamiche, sono legate a molteplici fattori.

Il manganese svolge un ruolo centrale in importanti processi biochimici e fisiologici delle piante grazie alla sua struttura, al potenziale redox e al ruolo di trasportatore di elettroni nella fotosintesi (Campbell e Nable, 1988).

Il manganese catalizza numerose reazioni, ma pochi enzimi contengono il manganese come componente strutturale, fatta eccezione per la superossido dismutasi, un enzima la cui funzione è quella di detossificare i radicali liberi. Negli enzimi coinvolti anche nei cicli del C e dell'N come deidrogenasi, transferasi, idrossilasi e decarbossilasi il manganese invece agisce principalmente come attivatore (Burnell, 1988; Romheld e Marschner, 1991). Principalmente le vie biosintetiche in cui il manganese serve come attivatore degli enzimi sono quelle che portano alla sintesi d'importanti metaboliti secondari con produzione di fenoli, glicosidi ciano – genetici e composti della lignina per la difesa delle piante (Burnell, 1988).

In seguito alla partecipazione del Mn a numerose reazioni importanti nelle piante (Evans *et al.*, 2001), la sua carenza può avere effetti su molti sistemi vegetali.

Nel caso della *Cycas revoluta*, prescindendo dalle cause, che vanno indagate caso per caso, è stato riportato (Polizzi, 1995b; Dehgan *et al.*, 1994) che è possibile curare la carenza di manganese con la somministrazione di solfato di manganese al terreno. La risposta al trattamento è più pronta nel caso di piante coltivate in vaso, mentre quelle mantenute in piena terra, specie in presenza di gravi sintomi, necessitano di tempi più lunghi e il trattamento non è sempre risolutivo. Considerando la lenta mobilità del Mn nella pianta, in queste circostanze potrebbe risultare utile integrare alla somministrazione di solfato di Mn al terreno alcune applicazioni fogliari con manganese – chelato. Persistendo, comunque, condizioni di pH neutro o alcalino del substrato di coltivazione il manganese apportato al terreno potrebbe venire rapidamente reso insolubile e di conseguenza i suoi benefici effetti risulterebbero temporanei. Per il conseguimento di risultati più duraturi si consigliano, pertanto, tutti quegli interventi atti a favorire

l'acidificazione del substrato. Gli apporti di manganese al suolo sono quindi fortemente condizionati dai processi di ossidazione del microelemento nel terreno e quelli fogliari dalla particolare struttura delle fronde delle *Cycadales* che rende difficile l'assorbimento del manganese attraverso questa via.



**Fig. 2 - Marciumi e disseccamenti causati da *Fusarium solani* (sopra), disseccamenti e necrosi da carenza di manganese su piante di *Cycas revoluta* (sotto).**

### **3. Le palme**

#### **3.1 Inquadramento botanico**

Le palme appartengono alla famiglia *Arecaceae* (*Palmae*). Questa famiglia comprende specie molto diverse per morfologia ed ecologia e largamente diffuse nelle regioni tropicali, sub-tropicali e a clima mediterraneo. Esistono, approssimativamente, 2700 specie di palme comprese in 202 generi, suddivisi in 6 sottofamiglie.

La *P. canariensis* è una palma endemica e originaria delle Isole Canarie. Questa specie rappresenta oggi una delle palme più diffuse in molte parti del mondo, e grazie alla sua notevole capacità di adattamento ed al grande valore ornamentale riveste un ruolo di primo piano per la sistemazione a verde di parchi e giardini, pubblici e privati.

#### **3.2 Caratteristiche morfologiche**

Le palme appartengono alle monocotiledoni e sono caratterizzate da uno stipite duro e fibroso che manca del cambio vascolare, cioè uno strato specializzato di cellule che nelle dicotiledoni separa il tessuto vascolare (xilema e floema) e dal quale nuovo tessuto vascolare è creato. Nelle palme, infatti, il tessuto vascolare è diviso in fasci sparsi attraverso il tessuto interno dello stipite; ciascun fascio vascolare è formato da cellule dello xilema e del floema ma non dal cambio vascolare, perciò lo stipite delle palme è essenzialmente privo di crescita secondaria comportando la mancata produzione di nuovo tessuto vascolare e la produzione di cerchi annuali di crescita. Le palme non sono in grado di riparare ferite a carico dello stipite, le quali non cicatrizzano allargandosi con il passare del tempo. Queste ferite rappresentano una via d'ingresso per l'invasione di insetti o

patogeni nel tronco. Le palme hanno un solo meristema apicale per stipite che spesso è considerato come la gemma o il cuore della palma. Se l'apice meristemico è irrimediabilmente compromesso la pianta muore. Lo stipite della palma cresce in diametro prima che in altezza. Inizialmente è costituito dalle guaine fogliari sovrapposte che proteggono il meristema apicale. Alcuni stipiti si accrescono alla base o più in alto lungo lo stipite, ma questa non è considerata una crescita secondaria. Sulle palme adulte il fusto è caratterizzato da anelli di crescita dati dalle cicatrici di abscissione delle vecchie foglie. La produzione di nuove foglie è molto lenta, circa una nuova foglia al mese. Le foglie sono caratterizzate da una moltitudine di forme e dimensioni ma tutte consistono di lamina, picciolo e una guaina fogliare. Le lamine fogliari sono distinte in tre classi, a ventaglio pennate e intere. Una palma è considerata matura quando produce la sua prima infiorescenza. Le infiorescenze sono prodotte sopra la chioma (*Brahea* spp.), all'interno della chioma (*Phoenix* spp.) o al di sotto della chioma (*Dypsis* spp., *Roystonea* spp.). L'asse principale dell'infiorescenza è chiamato peduncolo e le ramificazioni sono definite rachille, la dimensione dei fiori è relativamente piccola mentre i frutti e i semi sono solitamente grandi ed in alcune palme numerosi (Broschat *et al.* 2000; Uhl e Dransfield, 1987; Elliot *et al.*, 2004).

### **3.3 Coltivazione**

Oggi la coltivazione delle palme, se si esclude la produzione di fronde recise, è stata fortemente orientata verso l'utilizzazione di queste specie come piante da fogliame in vaso o nella realizzazione di opere architettoniche in giardini pubblici e privati. Quest'ultimo impiego, nel nostro paese così come in tutta l'Europa, assume particolare rilievo nelle regioni meridionali dove le palme sono impiegate nei parchi, nei giardini privati, nella realizzazione di piccoli spazi e nelle alberature stradali.

Il carattere di rusticità, evidente nei confronti dei parametri climatici, unito al loro sempre crescente valore estetico, hanno stimolato la produzione di queste piante nella nostra regione. Le palme per la loro coltivazione richiedono una temperatura ottimale di 15-20°C, alcuni individui, meno esigenti, riescono tuttavia a vegetare bene a temperature comprese tra i 10 e i 15°C, tollerando ampie escursioni termiche giornaliere. A tal proposito è stata determinata sperimentalmente la resistenza al freddo di differenti specie, ognuna delle quali, in accordo con il territorio d'origine, ha presentato una risposta diversa. Le più resistenti sono risultate *Chaemerops humilis*, *Sabal minor* e *Trachicarpus fortunei* con comparsa di lievi lesioni sulle foglie sottoposte a temperature vicine ai - 9°C. Anche per quanto concerne le condizioni dell'ambiente pedologico, le palme confermano la loro grande rusticità richiedendo per la loro coltivazione un terriccio con normali caratteristiche purché dotato di buona percolazione, fattore legato all'artificialità dell'ambiente in cui si trovano le radici poiché in natura queste piante sono in grado di crescere su terreni poveri di elementi naturali e con capacità idrica trascurabile.

### **3.4 Le principali malattie delle palme**

Come conseguenza della sempre maggiore incidenza della percentuale di palme coltivate sulla produzione totale delle piante ornamentali si è osservata una crescente attenzione, dei produttori e del mondo scientifico, verso una migliore gestione produttiva. In particolare, la *Phoenix canariensis* rappresenta la specie maggiormente coltivata e per tale motivo la necessità di proteggere i caratteri estetici e il notevole valore economico ha portato negli anni ad una crescente attenzione verso gli aspetti fitopatologici.

Tra le malattie ad eziologia fungina *Pestalotiopsis palmarum* Cooke determina la comparsa di macchie che inizialmente puntiformi, gialle e traslucide, divengono

scure interessando con la loro confluenza il rachide, i margini e le lamine fogliari (Garibaldi e Rapetti, 1987). Nell' 82 è stata segnalata la specie fungina *Stigmina palmivora* (Aloj e Garibaldi, 1984) che, nota in molti paesi africani ed asiatici determina maculature fogliari. Un altro importante agente di malattia a carico dell'apparato epigeo è rappresentato da *Graphiola phoenicis* (Moug.) Poit. I sintomi iniziali si manifestano con piccole macchie di colore variabile dal giallo al marrone o nero che si sviluppano su entrambe le pagine fogliari e sul rachide. Successivamente sulle zone colpite è possibile osservare le strutture riproduttive del patogeno chiamate sori. In presenza di gravi attacchi *G. phoenicis* è capace di ridurre la vita delle foglie dai 7-8 anni del ciclo normale di sostituzione a 3-4 anni (Tuttobene e Pennisi, 1987). Un altro lavoro riporta un agente di "bud rot", *Thielaviopsis paradoxa* (De Seines) Hohnel (Garibaldi e Rapetti, 1987). Questo agente di malattia, conosciuto anche come *Chalara paradoxa* e *Ceratocystis paradoxa*, è stato osservato su un gran numero di piante comprendenti numerose palme tra cui *Phoenix canariensis*. In Sicilia, è stata segnalata la diffusione di un marciume di tipo invasivo riferibile ad infezioni causate da *Gliocladium vermoeseni* Biurge (Polizzi; 2000)(fig. 3). Nei nostri ambienti questo patogeno colpisce esemplari adulti di *P. canariensis* e causa sintomi sulle guaine fogliari, il picciolo e i tessuti dell'apice vegetativo e dello stipite. Il rachide presenta, sulla sua superficie, delle striature necrotiche alla base mentre internamente è possibile osservare gli imbrunimenti vascolari indotti dalla presenza del patogeno. In condizioni d'elevata umidità ambientale i tessuti sintomatici si ricoprono di abbondanti e caratteristiche fruttificazioni fungine di aspetto farinoso e di colore rosa. La presenza della malattia è stata correlata con la presenza di fattori di stress subiti dalle piante (ferite dell'apparato radicale dopo estirpazione, potature in periodi favorevoli alle infezioni, crisi di trapianto, eccessive irrigazioni, ecc.). *G. vermoeseni* è inserito nell'elenco degli organismi nocivi che pregiudicano la qualità di piante appartenenti al genere *Phoenix* (D. M. 14 aprile 1997, allegato II), per i quali sono previsti il trattamento immediato delle piante sintomatiche o l'eliminazione delle stesse. *G. vermoeseni* è stato rinvenuto in associazione con

*Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*, agente di una grave tracheomicosi ampiamente diffusa nella nostra regione.

### **3.5 Tracheomicosi causata da *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis***

L'utilizzazione della *P. canariensis* in molti paesi del mondo è minacciata dall'introduzione e diffusione di una tracheomicosi causata da *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* (Foc). Osservata per la prima volta in Francia nel 1970 (Mercier e Louvet, 1973), la malattia è stata segnalata in Italia nel '74 (Corte, 1974) e successivamente in Marche, Liguria e Sardegna nel 2004 (Migheli *et al.*, 2005).

Generalmente la malattia si manifesta a partire dalle fronde più vecchie site negli anelli basali di un settore della corona apicale progredendo successivamente verso l'interno. In alcune occasioni i sintomi compaiono a partire dalla parte centrale della chioma per progredire sia sulle foglie superiori che su quelle inferiori. Sulle singole fronde i segmenti laterali appassiscono progressivamente dalla base sino all'apice molto spesso sul lato della fronda. È tipico vedere foglie con una sola metà del rachide colpita, mentre la metà opposta ripresenta sana. Sul rachide appare, a partire dalla base, un imbrunimento di colore scuro che procede progressivamente verso l'apice della foglia (fig. 3). I sintomi sopra riportati non sono sempre così tipici, verificandosi la possibilità di confondere un attacco dell'agente patogeno con uno stato di sofferenza indotto da uno stress idrico, solo un esame approfondito può, in questi casi, consentire di identificare il patogeno. Spesso sono osservabili linee necrotiche e lesioni sul rachide sotto le foglioline, non è noto se quest'ultimo sintomo è ascrivibile al Foc o a patogeni secondari o saprofiti.

Il patogeno è stato, diverse volte, rinvenuto in associazione con *F. semitectum* e, in particolar modo, con *G. vermoeseni* agente del marciume rosa su diverse palme, il quale si è dimostrato favorito dalla presenza del *F. oxysporum*.

Sezioni longitudinali e trasversali del rachide, o delle piantine colpite, mostrano gli imbrunimenti provocati dalla presenza del patogeno all'interno dei fasci vascolari. Nelle sezioni trasversali è stata osservata, in qualche caso, la presenza di macchie di colore variabile dal rosa-salmone al rosa chiaro (Simone e Cashion, 1996). In tutti i casi la malattia porta a morte la pianta; la rapidità con cui questo accade è di difficile valutazione potendo variare da due mesi sino a due anni. Il patogeno si è dimostrato capace di sopravvivere nel terreno e nei detriti vegetali delle piante infette per più anni, penetrando nelle piante sane attraverso le ferite riportate artificialmente o naturalmente dall'apparato radicale. La diffusione del patogeno avviene principalmente per mezzo dell'uomo mediante la movimentazione di materiale contaminato quale terreno e piantine infette o adulti malati. Questo ultimo punto ha assunto grande importanza di pari passo alle nuove tecniche di trapianto sviluppate. La diffusione di tale tecnica consente, inoltre, a causa dei residui radicali che rimangono nel suolo la sopravvivenza del patogeno ed il mantenimento di un focolaio di diffusione nel terreno coltivato. Il trasporto del fungo su materiali di potatura contaminati è comunque il più probabile mezzo di diffusione, infatti sulle palme è comune la potatura delle fronde non appena iniziano ad invecchiare con l'ausilio di seghe, sulle quali sono ritrovati pezzetti di tessuto nella lama o catena. La potatura delle piante, in tal senso, diviene quindi un facile mezzo di diffusione del patogeno, specialmente quando gli strumenti non sono disinfettati in modo corretto. Sino ad oggi non è stato trovato nessun mezzo in grado di curare un esemplare malato. Il contenimento del patogeno dipende, innanzitutto, da un accurato controllo e da una rapida diagnosi sia nei vivai che sul territorio. Solamente una buona gestione delle corrette pratiche agricole consente un contenimento di questa malattia in associazione con la movimentazione di materiale sano e di provenienza certa.

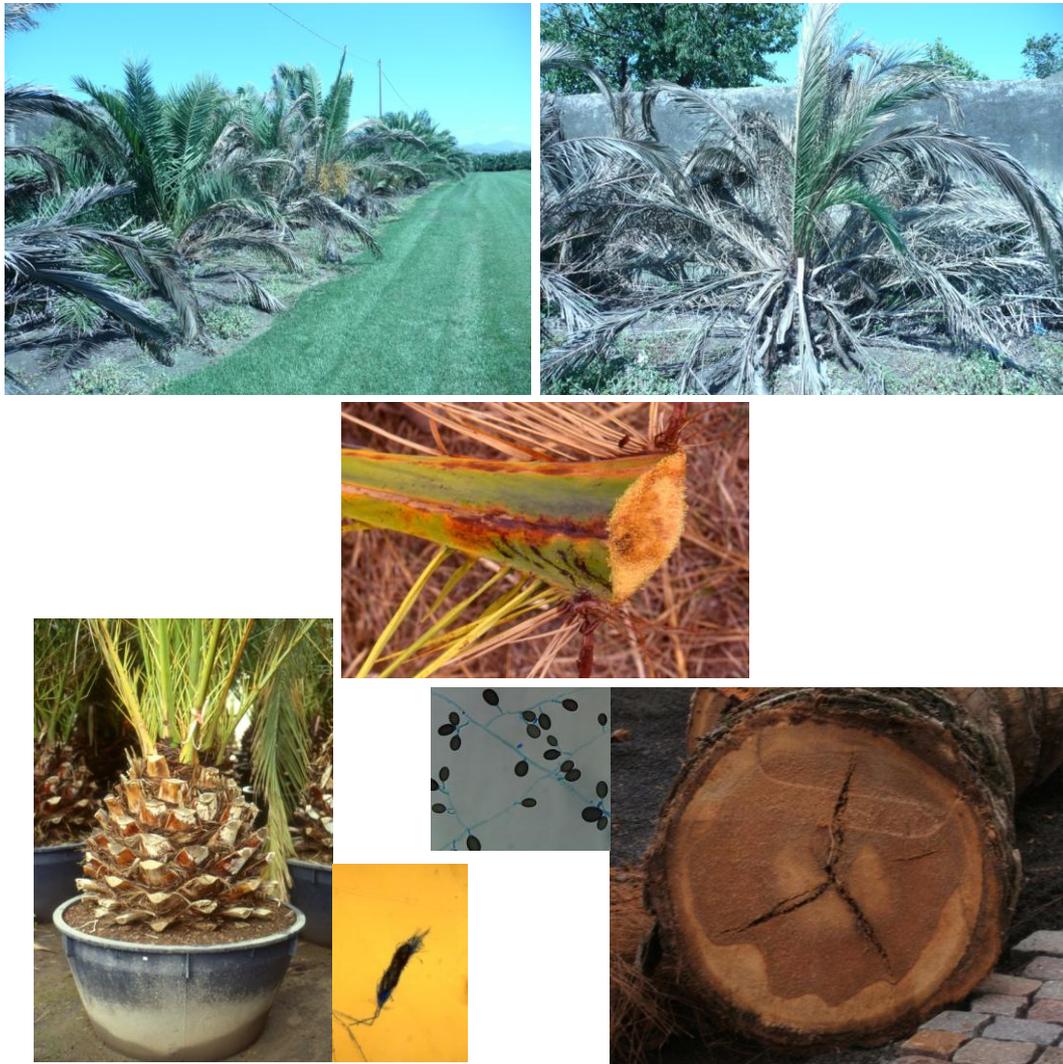


Fig. 3 – Avvizzimenti (sopra) e imbrunimenti vascolari (al centro) causati da *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*, disseccamento e ramo conidioforo di *Gliocladium vermoeseni* (in basso a sinistra), marciume interno e conidi di *Thielaviopsis paradoxa* (in basso a destra) su *Phoenix* sp.

#### 4. Il punteruolo rosso delle palme

Il commercio di materiale di propagazione e in particolare di piante ornamentali, può costituire un mezzo di diffusione di organismi associati alle piante i quali, in questo modo, possono essere trasportati da un paese all'altro, anche al di fuori del loro areale di distribuzione originario. Recenti introduzioni sono da mettere in relazione al commercio di piante di sviluppo medio grande, già infestate al momento dell'importazione, sebbene senza evidenti sintomi di danno. Un esempio è rappresentato dalla comparsa in Italia di *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, un coleottero curculionide di origine asiatica segnalato per la prima volta in un vivaio di Pistoia in Toscana nel 2004, su esemplari di *Phoenix canariensis* (Hortorum ex Chabaud) che mostravano evidenti sintomi di deperimento (Sacchetti *et al.*, 2005; 2006). Successivamente la sua presenza è stata rilevata in Sicilia (Longo & Tamburino, 2005), Campania (Anonimo, 2005), Lazio (Regione Lazio, 2006), Puglia e Sardegna (Eppo, 2007).

*Rhynchophorus ferrugineus*, conosciuto anche come curculionide ferruginoso delle palme, è un coleottero appartenente alla famiglia *Curculionidae*, sottofamiglia *Rhynchophorinae*, genere *Rhynchophorus*. Questo genere include circa 100 specie di cui sette viventi su diverse palme nelle zone tropicali. È il più diffuso tra le specie asiatiche grazie alla sua capacità di vivere in zone con clima temperato. Originario dell'India meridionale il curculionide è tipicamente diffuso nell'Asia sud orientale, dove fin dall'inizio del secolo, è nota soprattutto per gli ingenti danni arrecati alle piantagioni di palma da cocco (Wattanapongsiri, 1966; Murphy & Briscoe, 1999). Negli anni '80 esso è stato segnalato, in Arabia Saudita, Emirati Arabi Uniti ed Oman, anche se la presenza della specie nella penisola araba era stata già riportata ai primi del secolo (Buxton, 1920). In seguito la diffusione in Medio oriente è avvenuta rapidamente e, a partire dal 1990, la specie è stata segnalata in Iran, poi in Egitto, Giordania, Israele e territori palestinesi. Dall'Egitto è stato inevitabile il passaggio all'Europa e già nel 1994 il

curculionide è stato segnalato nel Sud della Spagna, a causa del commercio di palme ornamentali tra i due paesi. Attualmente è presente in tutta l'area mediterranea, dal Marocco alla Turchia (EPPO, 2007). La palma da cocco (*Cocos nucifera* L.) rappresenta la specie su cui il curculionide causa i danni economici più consistenti, ma possono essere attaccate numerose Arecaceae tra cui *Areca catechu*, *Arenga pinnata*, *Borassus flabellifer*, *Caryota maxima*, *C. cumingii*, *Corypha elata*, *C. gebanga*, *Elaeis guineensis*, *Metroxylon sagu*, *Roystonea regia*, *Phoenix sylvestris* (Wattanapongsiri, 1966). In anni più recenti, con la diffusione verso occidente, *R. ferrugineus* è stato segnalato su altre palme: *Livistona decipiens*, *Phoenix canariensis*, *P. dactylifera*, *Sabal umbraculifera*, *Trachycarpus fortunei*, *Washingtonia* sp. (Esteban-Durán *et al.*, 1998).

#### 4.1 Descrizione morfologica e ciclo

Gli adulti di *Rhynchophorus ferrugineus* presentano un colore variabile dal rosso ruggine al marrone-rossastro, con elitre caratterizzate da striature nere di forma e numero variabili. La lunghezza può variare da 19 a 45 mm (Esteban-Durán *et al.*, 1998) e la larghezza da 11,50 a 15,50 mm (Wattanapongsiri, 1966). Le femmine hanno generalmente un rostro più lungo, più sottile ed arcuato rispetto agli individui maschili, nei quali, inoltre, è presente una fitta peluria.

*R. ferrugineus* si sviluppa tipicamente come endofita all'interno delle palme attaccate. Generalmente gli adulti sono maggiormente attratti da piante danneggiate o malate, ma è diffusa anche l'infestazione di piante sane (Murphy e Briscoe, 1999).

Nelle zone d'origine a clima caldo il punteruolo rosso compie più generazioni nel corso dell'anno di circa tre mesi e mezzo ciascuna. I maschi di *R. ferrugineus* producono un feromone d'aggregazione capace di richiamare molti individui, al fine di favorire il successo riproduttivo. La femmina vive circa tre mesi e depone

le uova in fori praticati con il rostro sia alla base delle foglie o dei giovani germogli, nonché in piccole ferite dello stipite anche in posizione non apicale, che poi sono richiusi con materiali impastati e saliva.

Il numero di uova deposte in totale da una femmina può variare da alcune decine a centinaia (Murphy e Briscoe, 1999). Dopo 2-3 giorni le uova, lunghe circa 2,5 mm e di colore variabile dal bianco al giallo più o meno intenso, schiudono e le larve neonate cominciano a nutrirsi dei tessuti più teneri scartando quelli fibrosi. La larva è apoda e inizialmente lunga 3-4 mm, ma può superare i 5 mm a completo sviluppo. È caratterizzata da un capo fortemente sclerificato dotato di potenti mandibole con le quali scava gallerie anche molto profonde all'interno del peduncolo fogliare e dello stipite che riempie di rosura mescolata ad essudati della pianta. Essa attraversa 4-5 stadi larvali e completa lo sviluppo in circa 2-3 mesi. La durata del periodo larvale riportata in letteratura è comunque molto variabile (Murphy e Briscoe, 1999). Da recenti studi svolti in Spagna risulterebbe che la larva raggiunga la maturità mediamente in 96 giorni, dopo avere effettuato 3-4 mute (Esteban-Durán *et al.*, 1998). A maturità la larva si dirige nella parte più esterna della galleria dove cessa di alimentarsi e costruisce un bozzolo con le fibre della pianta; all'interno tali fibre risultano molto serrate e rivestite da uno strato liscio impermeabile costituito da una secrezione mucosa prodotta dalla prepupa (Wattanapongsiri, 1966; Ferry e Gomez, 2002). Il bozzolo così formato misura circa 80 x 35 mm, è ovale e leggermente allungato. Generalmente il bozzolo è formato entro cavità scavate alla base dei peduncoli fogliari, oppure tra la sostanza organica all'ascella delle foglie.

Anche la durata della fase pupale indicata da diversi Autori è molto variabile, da 2-3 settimane a 50 giorni (Wattanapongsiri, 1966; Murphy e Briscoe, 1999). Studiando lo sviluppo di *R. ferrugineus* a temperature costanti, Salama *et al.* (2002) è stato evidenziato come questa fase duri 18 giorni a 21,2°C e di 13 giorni a 29,5°C per individui allevati su frutti di banana.

Nella stessa palma e durante tutto l'anno è possibile trovare tutti gli stadi post-embriionali del punteruolo. Diverse prove hanno dimostrato che l'intero ciclo

biologico può essere svolto, da agosto a settembre, in circa 70 giorni, per cui si può ipotizzare che l'insetto completi almeno due generazioni annue nei nostri ambienti.

## 4.2 Danni causati

Il primo rinvenimento del punteruolo in Sicilia è stato accertato su *P. canariensis* (Longo e Tamburino, 2005). La particolare suscettibilità di tale specie e la rapidità del ciclo biologico svolto dal punteruolo al suo interno ha fatto sì che in Spagna questa specie sia stata utilizzata come pianta esca in palmeti costituiti da *P. dactylifera* al fine di individuare precocemente la presenza dell'insetto. Il danno è causato dall'attività trofica delle larve che scavano gallerie all'interno dello stipite delle palme. In questo modo è ostacolata la traslocazione degli elementi nutritivi tanto da pregiudicare lo sviluppo e minare la stabilità della pianta. Le piante attaccate possono evidenziare un disseccamento delle foglie centrali e/o la fuoriuscita di essudati dal tronco, tuttavia in genere è difficile rilevare la presenza del fitofago se non quando l'infestazione è ad uno stadio avanzato e la sopravvivenza della pianta è ormai compromessa.

Quando l'attacco interessa l'apice vegetativo, nelle fasi iniziali è possibile osservare erosioni sulle giovani foglie e/o fori alla base delle stesse. In seguito all'attacco si verificano fenomeni di marcescenza e fermentazione, a seguito dei quali dalla massa dei tessuti vegetali danneggiati si origina un caratteristico odore acidulo ed un innalzamento della temperatura. Le foglie apicali iniziano a collassare facendo assumere alla pianta un assetto asimmetrico della cima. Nei casi di gravi infestazioni l'intera cima si piega afflosciandosi sulle foglie inferiori e la pianta appare come capitozzata. Nel caso in cui le larve danneggiano il meristema principale si ha la morte della pianta. Le palme infestate muoiono in 4-8 mesi, a seconda dell'età della pianta e dell'entità dell'infestazione. È stato

osservato come un numero limitato di larve siano state capaci di uccidere grossi esemplari di oltre 60 anni d'età e 20 metri di stipite. Le foglie laterali non più ancorate allo stipite possono, talvolta, cadere costituendo un potenziale pericolo, inoltre, alla loro base si possono osservare residui di rosime umido e gallerie all'interno delle quali si possono trovare larve e bozzoli. L'ovideposizione avviene quasi sempre nella corona apicale, ma se la pianta presenta lesioni in punti diversi dello stipite, queste possono attrarre gli adulti attraverso la produzione di sostanze volatili. In questo caso, in cui è molto difficile individuare la presenza dell'infestazione, sono danneggiate porzioni non apicali del tronco, su cui si possono insediare anche patogeni agenti di marciumi compromettendo la stabilità della pianta. Ad esempio in provincia di Catania una palma dell'età di circa 15 anni è stata infestata solo nella zona mediana dello stipite dove le larve hanno completato lo sviluppo praticando un foro di notevoli dimensioni che ha reso precaria la stabilità della pianta. In questo caso la chioma non manifestava alcuna alterazione. Nel centro storico di Catania una palma di circa 50 anni è crollata in seguito all'infestazione della parte basale dello stipite. Quest'ultimo caso ha confermato come crolli improvvisi di esemplari apparentemente sani possono accadere.

Il punteruolo rosso inizialmente ha infestato le palme delle Canarie di sesso maschile di età superiore ai 50 anni, successivamente sono state riscontrate infestazioni di esemplari di sesso femminile e piante giovani. Inoltre, sono state accertate infestazioni su piante adulte di *P. dactyfera*, di *Washingtonia* sp., *Chaemerops humilis*, *Syagrus romanzoffianum*, *Livistonia chinensis*, *Howea forsteriana*, *Jubaea chilensis* ed infine piante giovani di *Sabal* sp.



**Fig. 4 – Esempari di *Phoenix canariensis* infestate da *Rhynchophorus ferrugineus* (sopra), foglie seghettate e larve di punteruolo (sotto).**

### **4.3 Mezzi di lotta**

Il contenimento di *R. ferrugineus* si presenta difficile a causa di alcuni aspetti biologici dell'insetto, le cui larve vivono ben protette all'interno della pianta spostandosi verso l'esterno solo a maturità, rendendo inefficaci i più comuni mezzi di lotta, e a causa della scarsa disponibilità di insetticidi autorizzati per l'impiego in ambiente urbano e in particolare su piante ornamentali.

Nei paesi asiatici, dove *R. ferrugineus* danneggia seriamente le piantagioni di palma da cocco, per limitare le infestazioni di tale insetto sono stati applicati praticamente tutti i mezzi di controllo disponibili.

Tra i mezzi chimici sono stati utilizzati soprattutto esteri fosforici e carbammati distribuiti con diverse modalità, su tagli di potatura, o lungo il tronco, o irrorando la chioma, oppure attraverso iniezioni ai tronchi. Alcuni autori riportano che un'uniforme bagnatura della pianta mediante alti volumi di soluzione risulti efficace nel prevenire l'attacco in quanto la percolazione lungo il tronco consente di raggiungere ferite o cavità e nello stesso tempo eventuali stadi dell'insetto presenti nella pianta (Abraham e Kurian, 1975; Abraham *et al.*, 1998; Azam e Razvi, 2001). La tecnica dell'iniezione ai tronchi è stata particolarmente studiata nei paesi del medio oriente, per difendere dal curculionide le palme da dattero (Murphy e Briscoe, 1999).

Altri autori riportano prove in cui l'uso di insetticidi come piretrine + piperonil butossido (Nirula, 1956), carbaryl (Mathen e Kurian, 1967), trichlorphon (Abraham e Kurian, 1975), e diversi formulati a base di dimetoato, endosulfan, dichlorvos, fenitrothion, azadiractina, estratti dal seme di *Annona squamosa* in miscela tra loro o usati singolarmente (Azam e Razvi, 2001a; b) hanno determinato risultati positivi quando iniettati attorno alle zone colpite dall'insetto mediante buchi profondi 12-15 cm e larghi, rispettivamente, 5 e 1,5 cm. Il numero dei fori variava con le dimensioni della zona colpita. Anche nella difesa delle palme di interesse ornamentale sono stati impiegati diversi mezzi di controllo. In Spagna, numerosi esemplari di *P. canariensis* dei giardini di pertinenza pubblica sono state ripetutamente trattate mediante iniezioni ai tronchi e trattamenti fogliari con esteri fosforici (fenitrothion, clorpirifos, diazinone, metidation, dimetoato), e con prodotti a base di carbaril e imidacloprid (Ferry e Gómez, 2002; Hernández-Marante *et al.*, 2003).

La disponibilità del feromone d'aggregazione del *R. ferrugineus*, prevalentemente 4-metil-5-nonanolo, ha permesso di migliorare il contenimento del curculionide, mediante l'impiego di trappole innescate col feromone sintetico e un attrattivo

alimentare (materiale vegetale in decomposizione), utilizzabili sia per il monitoraggio che per la cattura massale. La tipologia ed il posizionamento delle trappole giocano un ruolo fondamentale per la cattura degli insetti. La forma maggiormente utilizzata fa ricorso ad un secchio con fori sia nella parte laterale che sul coperchio di 5 cm di diametro. I secchi devono essere parzialmente interrati e opportunamente distanziati dalle piante bersaglio in modo da evitare che gli insetti giunti in prossimità della trappola salgano sulla pianta.

Come alternativa all'uso dei prodotti chimici la ricerca è stata rivolta alla valutazione di antagonisti naturali in ambiente controllato. Diverse prove sono state condotte con i funghi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Vitale *et al.*, 2008) isolati ripetutamente da insetti morti e il batterio *Bacillus thuringensis* (Manichini *et al.*, 2008). Queste sono in corso di approfondimento in modo da poter mettere in evidenza le effettive potenzialità applicative e le capacità di adattamento alle peculiari condizioni ambientali in cui dovrebbero essere impiegati.

Nematodi entomopatogeni appartenenti ai generi *Steinernema* ed *Heterorhabditis* sono stati saggiati in diverse prove (Abbas *et al.*, 2001 a,b; Elawad *et al.*, 2001; Saleh e Alheji, 2003; Shamseldean e Atwa, 2004), in particolare quest'ultimo è stato saggiato utilizzando formulazioni contenenti in miscela il chitosano al fine di proteggere i microrganismi dagli agenti abiotici ed esaltare contemporaneamente la loro efficacia (Gomez Vives *et al.*, 2008; Lo Bue *et al.*, 2008). A causa del comportamento dell'insetto la diagnosi precoce dell'infestazione gioca un ruolo di primaria importanza nella gestione della problematica soprattutto quando si parla di ambiente urbano, a tal proposito sono state saggiate differenti tecniche di diagnosi precoce come la termografia (Suma e Longo, 2008; La loggia *et al.*, 2008) e l'endoscopia (Suma e Longo, 2008), nonché tecniche bioacustiche ed olfattive. Per esemplari di particolare valore sono stati provati interventi di dendrochirurgia che comportano la ripulitura di piante.

In Italia, la Decisione della Commissione Europea 2007/365/CE è stata recepita in tutti i suoi punti dal Decreto "Disposizioni sulla lotta obbligatoria contro il

punteruolo rosso delle palma *R. ferrugineus*” nel quale si sancisce l’obbligo di lotta, si confermano le regole sull’importazione e circolazione del materiale vegetale e si individuano gli ordini preposti al controllo su territorio nazionale e alla divulgazione sul territorio di tutti i più importanti aspetti riguardante l’insetto. In Sicilia, il primo atto legislativo è stato rappresentato dal Decreto dell’Assessorato dell’Agricoltura e Foreste n. 294 “Misure fitosanitarie per il controllo e l’eradicazione del *R. ferrugineus* - punteruolo rosso della palma”.

## 5. Scopo del lavoro

Il comparto florovivaistico ha acquisito negli ultimi anni in Italia ed in particolare in alcune aree del meridione un notevole sviluppo, in termini di produzione, occupazione e reddito. In ambito nazionale le regioni del Mezzogiorno costituiscono un importante bacino per le produzioni florovivaistiche grazie alle favorevoli condizioni climatiche ed alla capacità di alcuni imprenditori di rispondere ai cambiamenti della domanda sia sul mercato interno che estero. In Sicilia, in particolare, si concentra gran parte della produzione florovivaistica meridionale (33,7% del totale meridionale) ed il settore ha assunto una notevole importanza soprattutto nella fascia costiera orientale (Schimmenti *et al.*, 2007; 2008).

La continua ricerca di specie e varietà rispondenti alle richieste del mercato e la necessità di introdurre prodotti nuovi ed originali, hanno incrementato gli scambi di materiale di propagazione con paesi di tutto il mondo, favorendo così, talvolta, l'introduzione di nuovi microrganismi.

A causa dell'intensa attività di scambio di materiale di propagazione recentemente si deve la comparsa in Italia del coleottero curculionide *Rhynchophorus ferrugineus*, segnalato per la prima volta in un vivaio di Pistoia in Toscana nel 2004, su esemplari di *Phoenix canariensis* che mostravano evidenti sintomi di deperimento (Sacchetti *et al.*, 2005; 2006). Successivamente la sua presenza è stata rilevata in Sicilia (Longo & Tamburino, 2005), Campania (Anonimo, 2005), Lazio (Regione Lazio, 2006), Puglia e Sardegna (Eppo, 2007).

Il danno è causato dall'attività trofica delle larve che scavano gallerie all'interno dello stipite delle palme. In questo modo, è ostacolata la traslocazione degli elementi nutritivi tanto da pregiudicare lo sviluppo e minare la stabilità della pianta. Le piante attaccate possono evidenziare un disseccamento delle foglie centrali e/o la fuoriuscita di essudati dal tronco, tuttavia in genere è difficile

rilevare la presenza del fitofago se non quando l'infestazione è ad uno stadio avanzato e la sopravvivenza della pianta è ormai compromessa.

Quando l'attacco interessa l'apice vegetativo, nelle fasi iniziali è possibile osservare erosioni sulle giovani foglie e/o fori alla base delle stesse. In seguito all'attacco si verificano fenomeni di marcescenza e fermentazione, a seguito dei quali dalla massa dei tessuti vegetali danneggiati si origina un caratteristico odore acidulo ed un innalzamento della temperatura. Le foglie apicali iniziano a collassare facendo assumere alla pianta un assetto asimmetrico della cima. Nei casi di gravi infestazioni l'intera cima si piega afflosciandosi sulle foglie inferiori e la pianta appare come capitozzata. Nel caso in cui le larve danneggiano il meristema principale si ha la morte della pianta. La lotta al punteruolo rosso si presenta difficile a causa della localizzazione dell'insetto nella zona interna delle palme, della difficoltà ad attuare interventi chimici localizzati sulla chioma e della mancanza di prodotti autorizzati per il suo contenimento, specialmente in ambiente pubblico. A ciò si aggiunge l'elevato impatto ambientale delle ripetute applicazioni rese necessarie dall'elevata prolificità dell'insetto e la difficoltà di una diagnosi precoce.

Numerosi prodotti chimici sono stati saggiati in campo sperimentale, soprattutto esteri fosforici e carbammati distribuiti su tagli di potatura, lungo il tronco o nella chioma (Abraham *et al.*, 1975; 1998), o attraverso l'iniezione ai tronchi (Ferry e Gómez, 2002) oppure mediante l'associazione di quest'ultima con irrorazioni alla chioma (Hernandez-Marante *et al.*, 2003; Azam e Razvi 2001a; b).

La tecnica dell'iniezione ai tronchi rappresenta una valida alternativa ai tradizionali interventi nella lotta al punteruolo. È stata sviluppata per la prima volta nei paesi del medio oriente, nei confronti del curculionide sulla palma da dattero (Murphy e Briscoe, 1999). In seguito è stata utilizzata in diversi paesi tra i quali la Spagna, in cui le palme coltivate nei giardini pubblici sono state ripetutamente trattate mediante iniezioni ai tronchi con prodotti a base di carbaril e imidacloprid (Ferry e Gómez, 2002). Altri autori riportano prove in cui l'uso di insetticidi a base di piretrine + piperonil butossido (Nirula, 1956), carbaryl

(Mathen e Kurian, 1967), trichlorphon (Abraham e Kurian, 1975), e diversi formulati a base di dimetoato, endosulfan, dichlorvos, fenitrothion, azadiractina, estratti del seme di *Annona squamosa* in miscela tra di loro o usati singolarmente hanno determinato risultati positivi (Azam e Razvi, 2001). Questa tecnica potrebbe risultare utile per eliminare o ridurre il numero delle applicazioni fogliari e ottenere una maggiore persistenza di azione delle molecole impiegate. In Italia in ambiente urbano non sono attualmente autorizzate molecole chimiche efficaci per il contenimento del punteruolo rosso su palme ornamentali. A tal proposito nel 2008 il ministero della salute con un decreto ha autorizzato in via eccezionale e provvisoria l'utilizzo di alcuni agrofarmaci per un periodo di 120 giorni, e proroghe successive hanno allungato questo periodo per alcuni di questi principi attivi fino a ottobre 2010. Questa decisione ha consentito di avviare prove sperimentali per valutare l'efficacia di alcune molecole incluse nella lista con nuove tecniche di distribuzione di potenziale impiego in ambiente pubblico e privato.

L'utilizzazione della *Phoenix canariensis* in molti paesi del mondo è minacciata anche dall'introduzione e diffusione di una tracheomicosi causata da *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*. La malattia è stata segnalata in Italia nel '74 (Corte, 1974). Generalmente l'infezione si manifesta a partire dalle fronde più vecchie site negli anelli basali di un settore della corona apicale progredendo successivamente verso l'interno. In alcune occasioni i sintomi compaiono a partire dalla parte centrale della chioma per progredire sia sulle foglie superiori che su quelle inferiori. Sulle singole fronde i segmenti laterali appassiscono progressivamente dalla base sino all'apice molto spesso sul lato della fronda. È tipico vedere foglie con una sola metà del rachide colpita, mentre la metà opposta si presenta sana. Sul rachide si evidenzia, inoltre, a partire dalla base, un imbrunimento vascolare di colore scuro che procede progressivamente verso l'apice della foglia (Simone *et al.*, 1996). In tutti i casi la malattia porta a morte la pianta; la rapidità con cui questo accade è di difficile valutazione potendo variare da due mesi sino a due anni.

Il trasporto del fungo su residui di potatura contaminati rappresenta il più probabile mezzo di diffusione. Questa pratica diviene quindi un facile mezzo di diffusione del patogeno, specialmente quando gli strumenti non sono opportunamente disinfettati. Il contenimento del patogeno è esclusivamente preventivo e dipende, innanzitutto, da corrette pratiche agronomiche quali la movimentazione di materiale sano e di provenienza certa, la disinfezione degli strumenti di potatura e la rapida diagnosi sia nei vivai che sul territorio. Sino ad oggi nessun prodotto chimico è risultato in grado di curare un esemplare malato, ma alcuni lavori riportano l'efficacia preventiva dei benzimidazoli su *Fusarium* spp. (Reid *et al.*, 2002; Rose *et al.*, 2003).

Su *Cycas revoluta* tra le alterazioni che interessano l'apparato epigeo e che possono compromettere la vitalità della pianta, quella più ampiamente diffusa nei nostri ambienti è rappresentata dalla carenza di manganese. Il manganese svolge un ruolo centrale in alcuni fondamentali processi biologici come la fotosintesi e in diverse reazioni cellulari nelle quali entra come componente degli enzimi (superossido dismutasi) ovvero più spesso come attivatore di alcuni enzimi (Burnell, 1988; Romheld e Marschner, 1991). La malattia si manifesta nel periodo primaverile - estivo, al momento dell'emissione delle nuove foglie con macchie o aree clorotiche più o meno estese che iniziano prevalentemente in prossimità della parte mediana dei segmenti e al centro della foglia. I tessuti clorotici rapidamente necrotizzano e il fenomeno finisce per interessare ampi settori fogliari. Nei casi più gravi l'alterazione può interessare tutte le foglie e determinare la morte della pianta (Dehgan *et al.*, 1994; Polizzi e Grasso, 1994).

L'applicazione di solfato di manganese al terreno prima della ripresa vegetativa, in molti casi e soprattutto per le piante in vaso, risulta efficace. Nel caso di piante adulte coltivate in piena terra la cura si è dimostrata più difficile con tempi di risposta al trattamento più lunghi e uso di elevate dosi del microelemento (Polizzi e Grasso, 1994; Polizzi, 1995). Nonostante l'apporto di elevate dosi di solfato di manganese (fino a 1,5 kg/pianta), infatti, è spesso necessario ripetere l'applicazione per diversi anni come conseguenza della scarsa mobilità del

manganese, aggravata dal sistema conduttore primitivo di cui la specie è dotata, nonché per la rapida lisciviazione e insolubilizzazione a cui è soggetto il microelemento nel terreno. L'insolubilizzazione dell'elemento viene peraltro accentuata da condizioni di pH neutro o alcalino del substrato di coltivazione.

Un'interessante alternativa ai trattamenti tradizionali per la cura di carenze e per il contenimento di patogeni e insetti è rappresentata dalla tecnica endoterapica con cui si intende la somministrazione di sostanze, che iniettate direttamente nel flusso linfatico di una pianta attraverso fori praticati nel fusto, sono trasportate lungo tutta la pianta fino a raggiungere la chioma. I trattamenti endoterapici presentano diversi vantaggi rispetto ai tradizionali trattamenti alla chioma o alle radici specialmente laddove non sia possibile intervenire con trattamenti esterni alla chioma come è il caso degli ambienti pubblici. Essa infatti permette di ridurre al minimo i rischi derivati dall'immissione nell'ambiente di prodotti con scarsa selettività o con scarsa degradabilità ambientale ed è l'unica alternativa nei casi di patogeni che per la loro localizzazione nell'ospite sono difficilmente raggiungibili.

La pratica dell'endoterapia ha origine antichissime, ma la tecnica è stata studiata e perfezionata nell'ultimo mezzo secolo. Il suo uso per la terapia di carenza di elementi minerali era riportata già nel 1929 da Thomas e Haas per la cura della clorosi ferrica su agrumi (Thomas e Haas, 1928) e nel 1973 da Kadman e Cohen (Kadman e Cohen, 1973) su piante adulte di avocado che presentavano carenze di ferro in California. In campo entomologico sono numerosi i successi riportati (McClure, 1992; Young, 2002; Doccola *et al.*, 2003). Basti citare le prove con azadiractina per il controllo di insetti defogliatori di alcune conifere forestali (Helson *et al.*, 2001) e di *Tessaratomya papillosa* (Schulte *et al.*, 2006).

Tra i successi ottenuti sulle patologie fungine si possono citare i trattamenti nei confronti di *Cytospora* spp. su susino mediante l'utilizzo di diversi prodotti chimici (Helton e Rohrbach, 1966) e il contenimento del marciume radicale da *Phytophthora cinnamoni* su avocado con macroiniezioni di Phosethyl-Al (Darvas *et al.*, 1984). Alcune ricerche, inoltre, hanno permesso di valutare l'efficacia di

fungicidi applicati in endoterapia per il contenimento di *Ganoderma* sp. su piante di palma da olio (Idris *et al.*, 2002) e nei confronti di *Endothia parasitica* su *Castanea dentata* (Jaynes e VanAlfen, 1974).

Alla luce di queste considerazioni, scopo della presente tesi di dottorato è stato quello di verificare sperimentalmente l'efficacia di trattamenti in endoterapia, a confronto con applicazioni tradizionali, per la risoluzione di differenti problematiche su *P. canariensis* e *C. revoluta*. Sulla prima specie le prove sono state incentrate sulla valutazione dell'efficacia di prodotti chimici applicati in endoterapia attiva per il contenimento di *F. oxysporum* f.s. *canariensis* e del punteruolo rosso delle palme *R. ferrugineus*.

In particolare, le prove rivolte al contenimento di attacchi del curculionide sono state effettuate su centinaia di esemplari di differenti età di *P. canariensis* in ambiente urbano e in parchi e giardini privati. L'obiettivo è stato quello di valutare differenti principi attivi applicati in endoterapia da sola e in combinazione con trattamenti fogliari, parallelamente allo studio dei tempi, delle modalità di applicazione, della dose efficace e degli eventuali effetti fitotossici.

Un'ulteriore prova è stata effettuata in un vivaio commerciale su 168 esemplari di questa palma coltivati in vaso per valutare l'efficacia di prodotti chimici applicati in endoterapia, a confronto con applicazioni radicali, per il contenimento di *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis* in condizioni di inoculo naturale. Al fine di monitorare la mobilità delle soluzioni fungicide e insetticide all'interno del sistema vascolare della *Phoenix*, alcuni esemplari sono stati iniettati con una soluzione miscelata con un colorante (Safranina O).

Su *Cycas revoluta* le prove hanno riguardato la risoluzione di carenze di manganese. Nel primo anno è stata valutata l'efficacia di applicazioni al terreno e fogliari a base, rispettivamente, di solfato di manganese e chelato di manganese su 360 piante in vaso e in piena terra in giardini privati ed in un vivaio commerciale sito in provincia di Catania. Durante il secondo anno l'attività sperimentale ha riguardato la valutazione di applicazioni endoterapiche con chelato di manganese su 100 piante selezionate in un campo di circa 3000 esemplari in un vivaio

commerciale e, su 20 piante in giardini privati. Inoltre, in vivaio sono stati messi a confronto due differenti metodi quali il metodo ad assorbimento naturale e il metodo a pressione.

## **PARTE SPERIMENTALE**

## **6 - EFFICACIA DELL'ENDOTERAPIA A PRESSIONE PER IL CONTENIMENTO DEL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME SU *PHOENIX CANARIENSIS* IN AMBIENTE PUBBLICO E PRIVATO**

### **6.1 MATERIALI E METODI**

Le diverse prove eseguite in ambiente urbano sono state effettuate in collaborazione con lo staff del dott. Marco Murabito (responsabile del verde del comune di Catania e con lo staff del dott. Carmelo Fruscione (Studio Verde s.a.s. di Torino). Il dott. Carmelo Fruscione ha fornito, soprattutto nelle prove iniziali eseguite su *P. canariensis*, le attrezzature utilizzate e l'esperienza acquisita in ambiente urbano sull'uso della tecnica endoterapica.

#### **6.1.1 Valutazione dell'efficacia dell'endoterapia a pressione su piante apparentemente sane in ambiente urbano**

In ambiente urbano la prima prova, avviata nel 2007, è stata rivolta al contenimento di attacchi del curculionide *R. ferrugineus* su 40 esemplari di differenti età di *P. canariensis* in un giardino pubblico. In particolare, l'obiettivo della prova è stato quello di valutare l'efficacia dei trattamenti endoterapici su piante apparentemente asintomatiche e con stipite variabile da 3 a 8 metri e utilizzando l'apparecchiatura denominata Arbosan<sup>®</sup>. L'apparato è essenzialmente costituito da un serbatoio per i liquidi e un serbatoio per l'aria della capacità di 15 litri e 8 bar. Il serbatoio per il liquido posto sopra il contenitore per l'aria ha una capacità di 1 litro, peso a vuoto 6,3 kg ed è munito di 8 rubinetti porta – iniettore. A questi sono collegati i tubi alla cui estremità è fissato l'iniettore che tramite appositi aghi inseriti all'interno di fori praticati sullo stipite, permette l'introduzione della soluzione nel legno della pianta (Fig. 5).

I fori (da 2 a 3 in rapporto alla dimensione della sezione) del diametro di 8 mm ed una profondità di 15-22 cm (a seconda del diametro dello stipite) sono stati praticati un metro al di sotto della corona fogliare con un normale trapano elettrico. La pressione durante l'iniezione variava da 1 a 1,5 atm. Per ogni palma sono stati utilizzati 400-600 ml di soluzione insetticida a base di abamectina miscelata con azadiractina (tab.3). Al fine di limitare l'ingresso di patogeni da ferita (*Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*, *Gliocladium vermoeseni*, *Thielaviopsis paradoxa*) alla soluzione è stato aggiunto un fungicida ad ampio spettro a base di tiofanato-metile.

Dopo ogni trattamento i fori praticati sono stati coperti con mastice di potatura e gli aghi e la punta del trapano sono stati disinfettati con sali d'ammonio quaternario al 2%.

Il rilievo sull'efficacia dei prodotti chimici e la selettività dei trattamenti è stato effettuato dopo 7-10 mesi dall'applicazione determinando il numero di piante sintomatiche e la vitalità dei diversi stadi dell'insetto presenti sulle piante trattate.

### **6.1.2 Valutazione dell'efficacia dell'endoterapia a pressione su piante apparentemente sane e sintomatiche in ambiente urbano**

La seconda prova è stata effettuata alla fine del 2007 al fine di valutare l'efficacia dell'endoterapia per il contenimento del punteruolo rosso su 60 esemplari di *P. canariensis* con uno stipite variabile da 3 a 10 metri. Inoltre, è stata valutata anche l'influenza dell'altezza del foro praticato sull'efficacia del trattamento endoterapico. Su 30 piante i fori sono stati praticati un metro al di sotto della corona fogliare come nella prova precedente mentre sulle restanti ad altezza uomo. Tra le piante selezionate per la prova 50 erano apparentemente sane e 10 piante manifestavano una leggera asimmetria della chioma, indice di una grave infestazione. La prova è stata eseguita con le stesse attrezzature e modalità descritte sopra.

### **6.1.3 Valutazione della diffusione delle infestazioni di *Rhynchophorus ferrugineus* in diverse aree urbane di Catania**

La valutazione dell'efficacia dell'endoterapia a pressione risulta difficile a causa della difficoltà di individuare precocemente le palme infestate. Le piante attaccate, infatti, possono evidenziare un disseccamento delle foglie e/o la fuoriuscita di essudati dal tronco, ma in genere è complicato rilevare la presenza del fitofago se non quando l'infestazione è ad uno stadio avanzato e la sopravvivenza della pianta è ormai compromessa. A ciò si aggiunge il lungo periodo (anche un anno) che intercorre tra l'inizio dell'infestazione e la morte della pianta.

In via preliminare è stata, quindi, valutata la diffusione delle infestazioni di punteruolo rosso delle palme nelle diverse zone e sottozone della città di Catania. A tal fine è stato determinato il numero di piante di *P. canariensis* con sintomi evidenti di attacco e il numero di piante rimosse nel 2007 prima dell'avvio dei trattamenti endoterapici.

Le diverse sottozone prese in esame sono state, poi, suddivise sulla base della percentuale di infestazione (numero piante sintomatiche + numero piante morte) utilizzando la scala empirica riportata in tabella 2.

**Tabella 2 - Scala utilizzata per la valutazione del grado di infestazione nelle diverse sottozone urbane di Catania.**

0% piante rimosse e sintomatiche = aree apparentemente non infestate

1-10% piante rimosse e sintomatiche = aree a bassa infestazione

10-35% piante rimosse e sintomatiche = aree mediamente infestate

>35% piante rimosse e sintomatiche = aree altamente infestate

#### **6.1.4 Valutazione dell'efficacia dell'endoterapia a pressione in diverse zone di Catania**

Una terza prova è stata avviata con l'obiettivo di valutare l'efficacia preventiva dei trattamenti endoterapici su 541 piante con stipite variabile da tre a dodici metri dislocate in differenti zone (A, B, C, D, E, F, G) e sottozone urbane. Per i trattamenti endoterapici è stata utilizzata l'attrezzatura professionale Arboprof. I fori sono stati praticati ad altezza uomo. In rapporto alla capacità di assorbimento dei singoli esemplari per ogni pianta sono stati utilizzati da 300 a 1200 ml di soluzione (contenente gli insetticidi usati nella prova precedente miscelati con imidacloprid). Nella zona B le piante sono state trattate mediante endoterapia in associazione con irrorazioni alla chioma con un prodotto commerciale a base di clorpirifos (Dursban) utilizzando volumi d'adacquamento pari a 20 litri per pianta. L'elenco e le caratteristiche dei prodotti saggiati è riportato in tabella 3. Le applicazioni sono state avviate nel dicembre 2007 e le palme di ogni sottozona sono state trattate secondo il calendario riportato in tabella 4. Sono stati effettuati tre rilievi nel corso di un anno (tab.4). L'ultimo rilievo è stato effettuato nel mese di novembre 2008. L'efficacia e gli effetti degli interventi sulle piante trattate sono stati valutati rilevando la percentuale di piante collassate e rimosse (febbraio-aprile), di piante con ricaccio o foglie centrali seghettate a giugno-luglio e di piante con nuovi collassi e con ricaccio collassato (novembre 2008).

Gli insetticidi impiegati in questa prova sono stati forniti dall'Amministrazione comunale nell'ambito della convenzione stipulata con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Fitosanitarie dell'Università di Catania.

**Tabella 3 - Caratteristiche e dosi d'impiego dei prodotti impiegati nelle prove su *Phoenix canariensis* in ambiente urbano.**

Trattamento	Formulato	Ditta produttrice	Concentrazione p.a. g/l	Dose f.c. ml-g/l
Abamectina	Vertimec EC	Syngenta Crop Protection	18	100
Azadiractina	Oikos 25 Plus	Sipcam S.p.a.	25	30
Imidacloprid	Warrant SL	Bayer CropScience	200	6
Clorpirifos*	Dursban	Dow AgroSciencesItalia S.r.l.	480	1,2

\* utilizzato solo per trattamenti fogliari

**Tabella 4 - Numero ed epoca dei trattamenti nelle diverse sottozone urbane.**

Sottozone urbane	N° trattamenti/epoca	Sottozone urbane	N° trattamenti/epoca
A1	dic.07-apr.08	B	dic.07-feb.08-giu.08
A2	dic.07-feb.08-lug.08	C	gen.08-mag.08
A3	nov.07-apr.08	D1	gen.08-giu.08
A4	dic.07-apr.08	D2	gen.08-giu.08
A5	apr.08	E	gen.08-giu.08
A6	mag.08-nov.08	F1	apr.08
A7	apr.08-lugl.08	F2	mag.08
A8	dic.07-mar.08	F3	apr.08
A9	feb.08	G1	gen.08-giu.08
A10	apr.08-nov.08	G2	apr.08
A11	apr.08-ott.08	G3	apr.08
A12	apr.08-ott.08		

### **6.1.5 Efficacia di insetticidi su larve di *Rhynchophorus ferrugineus* e valutazione della mobilità delle soluzioni iniettate mediante endoterapia**

Contestualmente alle prove svolte in ambiente urbano, è stata effettuata una prova in laboratorio al fine di valutare in via preliminare l'attività degli insetticidi su 30 larve di *R. ferrugineus* alimentate con tessuti di piante di *P. canariensis* precedentemente trattate mediante endoterapia. Inoltre, è stata valutata la mobilità delle soluzioni iniettate all'interno del sistema vascolare su 38 esemplari metà apparentemente sani e metà con sintomi evidenti di attacco.

A tal fine, dopo un mese dall'applicazione degli insetticidi per via endoterapica, alcuni apici vegetativi di piante trattate sono stati trasportati in laboratorio e impiegati per alimentare le larve di punteruolo. Dopo 3-4 giorni di alimentazione è stata valutata la percentuale di mortalità larvale nei tessuti trattati a confronto con tessuti non sottoposti al trattamento. Al fine di monitorare la mobilità della soluzione insetticida le piante sono state iniettate con una soluzione miscelata con un colorante di colore rosso all'1% (Safranina O). Al rilievo sezioni trasversali prelevate sopra e sotto il punto di inoculazione sono state osservate per determinare la presenza della colorazione rossa nei tessuti.

### **6.1.6 Valutazione dell'efficacia dell'endoterapia a pressione in associazione con irrorazioni alla chioma in giardini privati**

Una quarta prova è stata avviata nel 2008 con l'obiettivo di valutare l'efficacia dei trattamenti endoterapici in associazione con trattamenti alla chioma su 20 piante con lievi sintomi di infestazione in differenti giardini privati. Un ugual numero di piante sintomatiche e limitrofe ai giardini costituiva il controllo non trattato. I fori sono stati praticati ad altezza uomo. Per i trattamenti endoterapici sono stati utilizzati da 800 a 1000 ml di soluzione per pianta (contenente 2 prodotti in

miscela) (tab. 5) in rapporto alla capacità di assorbimento dei singoli esemplari e sono stati ripetuti tre volte l'anno ad intervalli di 4 mesi. A differenza delle precedenti prove, abamectina e azadiractina sono state saggiate a dosi inferiori riportate in tabella 4. I trattamenti alla chioma sono stati effettuati con un prodotto commerciale a base di clorpirifos alla dose di 120ml/hl e sono stati ripetuti una volta al mese nel periodo tra marzo e ottobre. Il rilievo finale è stato effettuato dopo 2 anni dal primo trattamento. L'efficacia degli interventi è stata valutata determinando il numero di piante rimosse e/o con ricaccio sul totale delle piante trattate.

**Tabella 5 - Caratteristiche e dosi d'impiego dei prodotti impiegati nella prova su *Phoenix canariensis* in giardini privati.**

Trattamento	Formulato	Ditta produttrice	Concentrazione p.a. g/l	Dosi f.c. ml-g/l
Abamectina	Vertimec EC	Syngenta Crop Protection	18	50
Azadiractina	Oikos 25 Plus	Sipcam S.p.a.	25	10
Clorpirifos*	Dursban	Dow AgroSciencesItalia S.r.l.	480	1,2

\* utilizzato solo per trattamenti alla chioma



**Fig .5 -** Differenti fasi del trattamento endoterapico su *Phoenix canariensis*.

## **6.2 RISULTATI**

### **6.2.1 Valutazione dell'efficacia dell'endoterapia a pressione su piante apparentemente sane in ambiente urbano**

La prima prova in ambiente pubblico rivolta al contenimento di attacchi di *R. ferrugineus* su 40 esemplari di differenti età di *Phoenix canariensis* non ha permesso di ottenere indicazioni precise sull'efficacia dei trattamenti endoterapici. Dopo 7-10 mesi dal trattamento, infatti, tre piante su 40 trattate un metro al di sotto della corona fogliare sono collassate. All'interno dei tessuti attaccati, inoltre, è stato rilevato un elevato numero di individui (larve, ninfe e adulti) vitali. Gli insetticidi utilizzati si sono dimostrati selettivi per la coltura. I tempi di assorbimento sono stati variabili e hanno consentito di trattare 2 palme/ora. L'esame dei tessuti alterati ha permesso di accertare anche infezioni riconducibili al marciume causato da *G. vermoeseni*.

### **6.2.2 Valutazione dell'efficacia dell'endoterapia a pressione su piante apparentemente sane e sintomatiche in ambiente urbano**

La seconda prova effettuata in ambiente urbano al fine di valutare l'efficacia dell'endoterapia per il contenimento del punteruolo rosso su 60 esemplari di *Phoenix canariensis* ha permesso di rilevare una buona attività del trattamento endoterapico sia su piante apparentemente sane sia su piante sintomatiche. Tutte le piante sottoposte al trattamento endoterapico, infatti, indipendentemente dal grado di infestazione hanno mantenuto la vitalità della chioma contrariamente a quanto generalmente accade in assenza di trattamenti. Inoltre, questa prova ha permesso di dimostrare un'efficacia delle applicazioni effettuate ad altezza uomo, paragonabile ai trattamenti eseguiti un metro sotto la corona fogliare, e ha consentito l'abbattimento dei tempi di lavoro per l'esecuzione del trattamento. Le

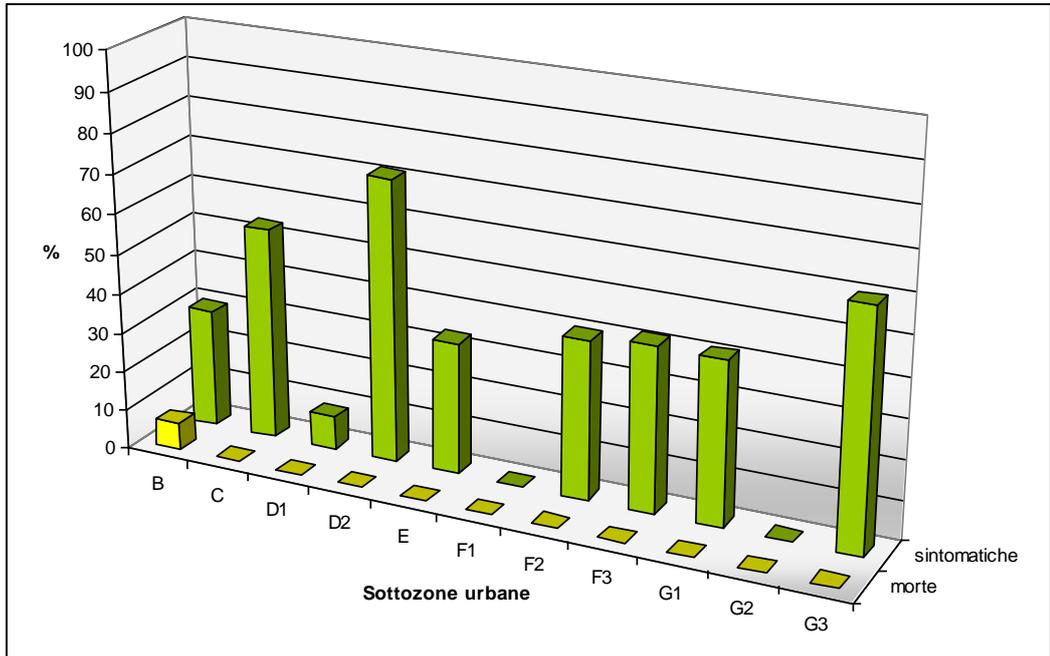
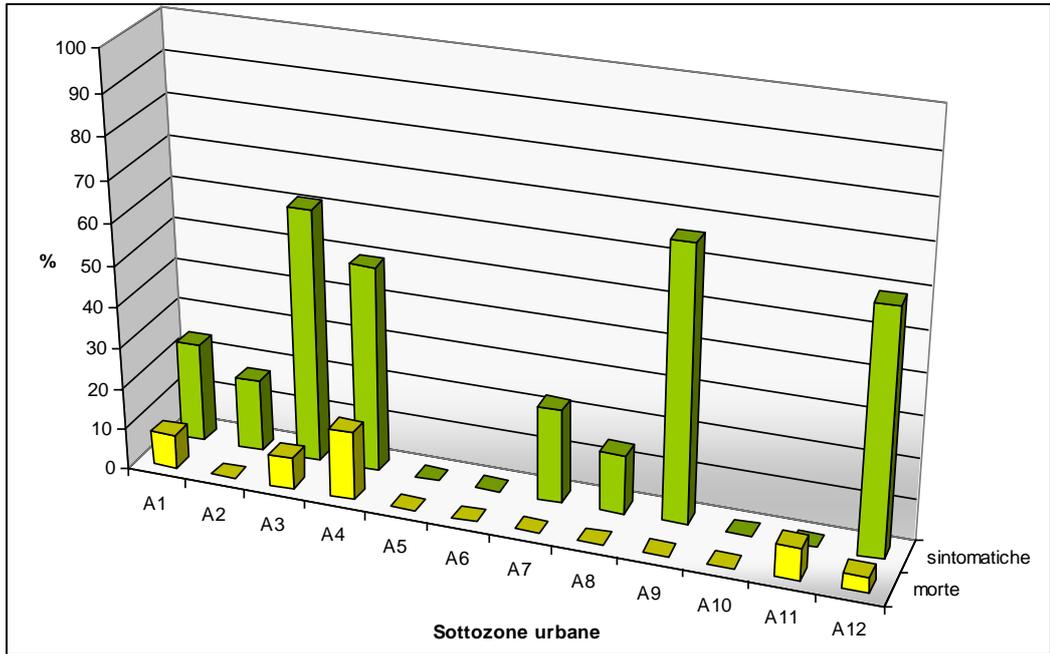
applicazioni ad altezza uomo, infatti, hanno consentito di trattare 3 piante/ora riducendo le perdite di tempo legate all'uso del cestello necessario per i trattamenti all'altezza della corona fogliare.

### **6.2.3 Valutazione della diffusione delle infestazioni di *Rhynchophorus ferrugineus* in diverse aree di Catania**

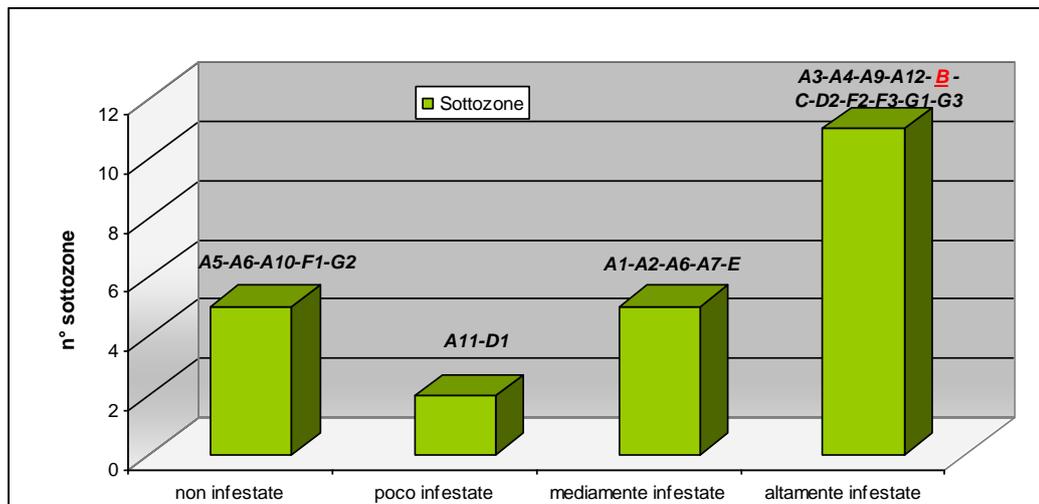
Nei grafici 1-2 sono riportati i risultati sulla diffusione delle infestazioni nelle diverse zone e sottozone di Catania espressi come percentuale di piante sintomatiche e come numero di piante morte e rimosse prima dell'inizio dei trattamenti endoterapici. Dai grafici è possibile osservare come nelle diverse zone (A, B, C, D, E, F, G) e sottozone la percentuale di piante già rimosse prima dell'inizio dei trattamenti variava da 0 a 16,6%, mentre le piante sintomatiche variavano da 0 a 71,4% secondo la sottozona considerata.

Complessivamente tra 561 palme oggetto di indagine alla fine del 2007, il 3,6% risultavano già morte e rimosse e il 29,8% mostravano sintomi di attacco.

Nel grafico 3 sono riportate le diverse sottozone suddivise sulla base della percentuale di infestazione (numero piante sintomatiche + numero piante morte) in quattro gruppi; 5 sono risultate apparentemente non infestate, 2 a bassa infestazione, 5 mediamente infestate e 11 altamente infestate. La maggior parte delle sottozone è risultata mediamente o altamente infestata.



**Grafici 1-2** Diffusione delle palme di *Phoenix canariensis* morte e sintomatiche per gli attacchi di *Rhynchophorus ferrugineus* nelle sottozone urbane del comune di Catania.



**Grafico 3- Sottozone urbane del comune di Catania suddivise per grado di infestazione da *Rhynchophorus ferrugineus*.**

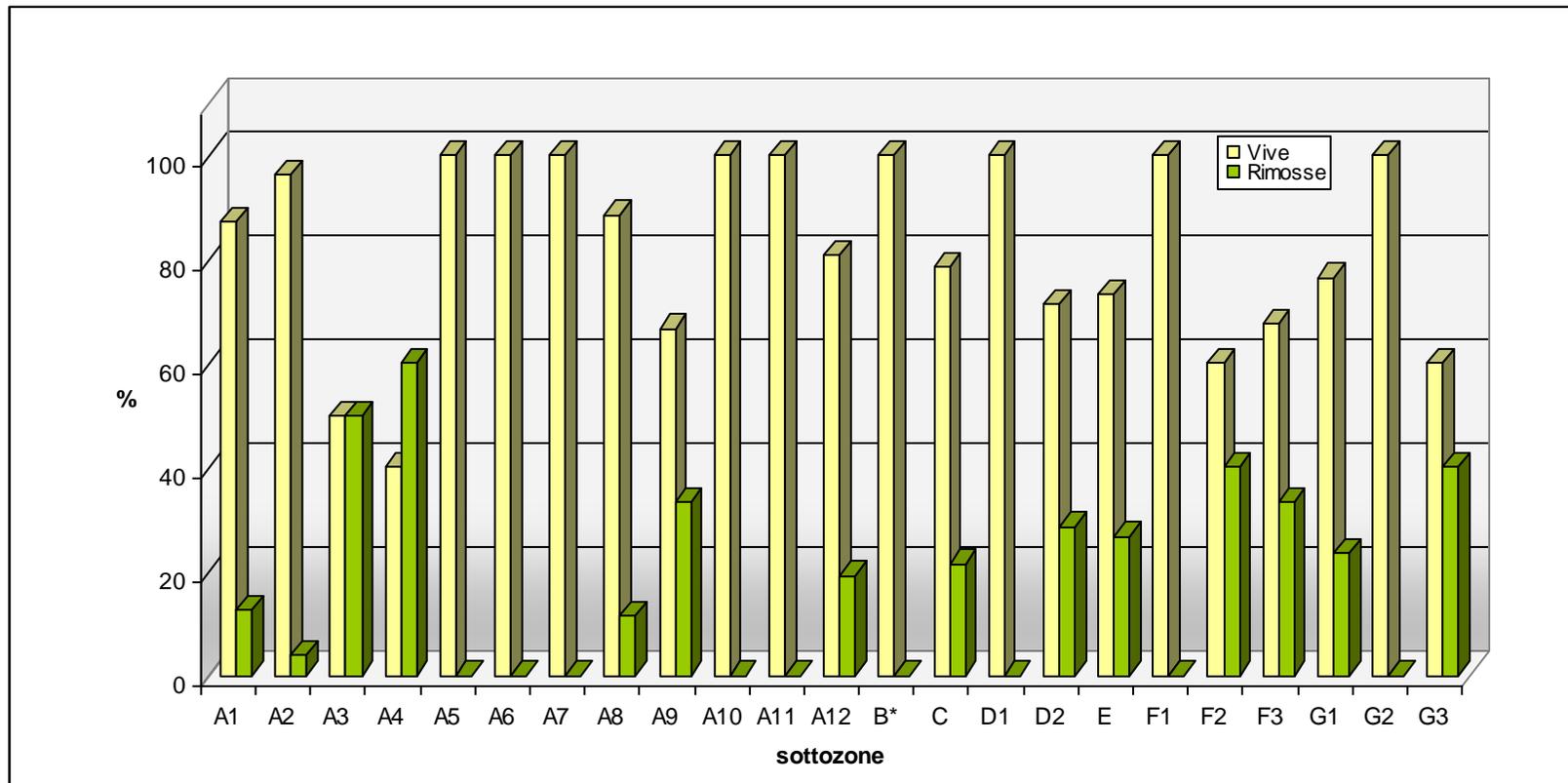
#### **6.2.4 Valutazione dell'efficacia dell'endoterapia a pressione in diverse zone di Catania**

I risultati dei trattamenti endoterapici su esemplari di *P. canariensis* dislocati in diverse zone e sottozone del centro urbano di Catania sono riportati nei grafici 4-7. Dal grafico 4 si evince come la percentuale di palme rimosse sul totale delle piante presenti, in corrispondenza del primo rilievo effettuato a febbraio-aprile del 2008, è risultato variabile da 0 a 33,3% a seconda della sottozona considerata e del grado di infestazione. Tutte le piante collassate, infatti, si presentavano già gravemente colpite. La percentuale di piante ancora vitali variava dal 40 al 100%. Il rilievo alla ripresa vegetativa (graf. 5) ha consentito di mostrare una discreta efficacia dell'endoterapia a pressione nei confronti del punteruolo rosso sia su piante leggermente sintomatiche che su piante apparentemente sane. Nessuna pianta a giugno-luglio 2008 è risultata collassata. Inoltre, un'elevata percentuale di piante presentavano ricacci o foglie seghettate nel germoglio centrale indice di

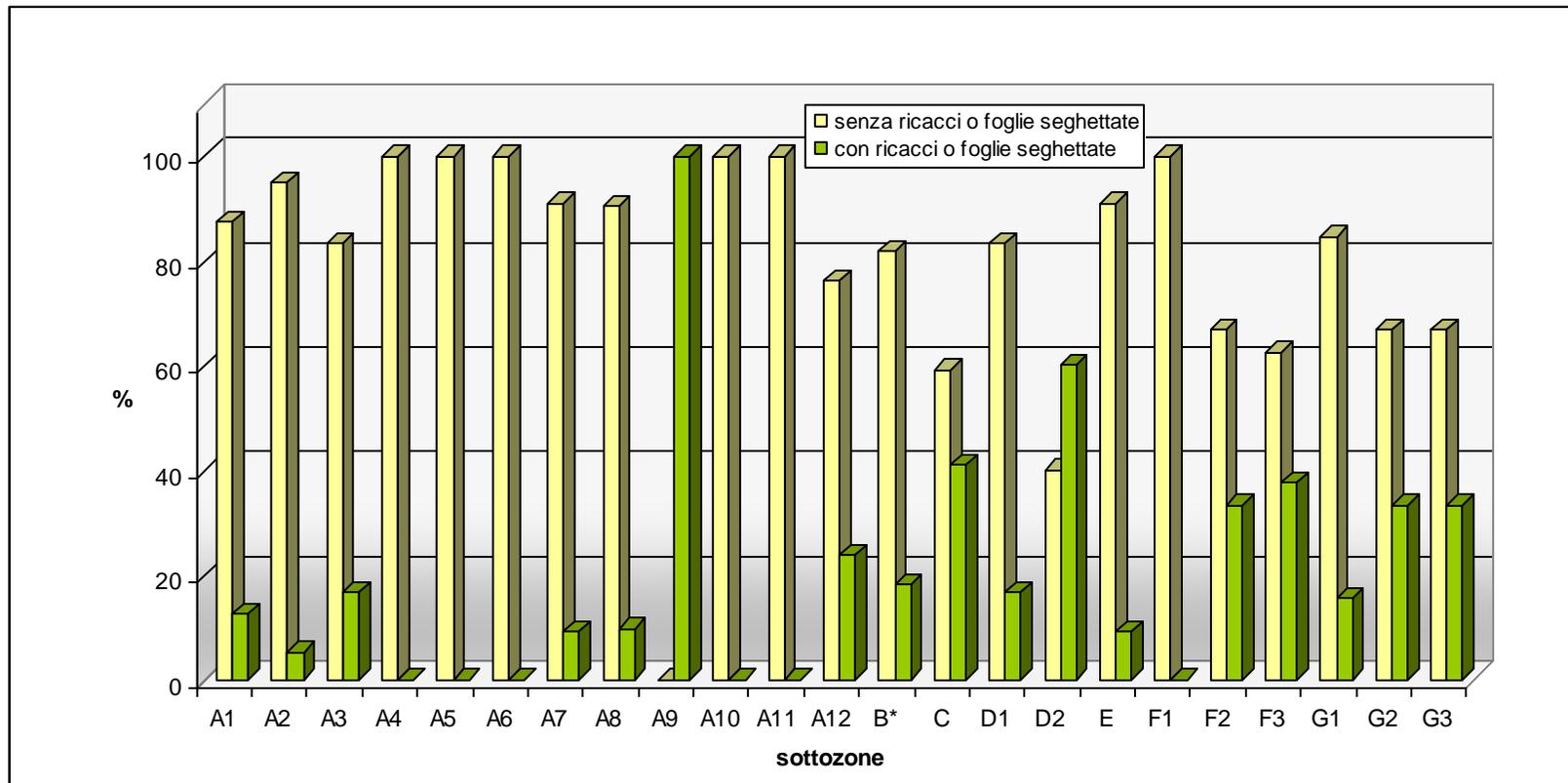
una reazione all'infestazione da attribuire esclusivamente al trattamento endoterapico effettuato. La percentuale variava da 0 a 40,9%. Le restanti piante non mostravano questa reazione, ma si presentavano ancora vitali. Analizzando, però, i risultati del terzo rilievo (novembre 2008) (graf. 6) sulla percentuale di nuove palme collassate e con ricacci collassati (dopo un anno dal primo trattamento) si evidenzia un'efficacia parziale del trattamento endoterapico, indipendentemente dal numero di applicazioni effettuate e dall'intervallo di tempo. Il numero di piante con nuovi collassi variava da 0 a 66,7% a seconda della sottozona indagata, mentre il numero di piante con ricaccio collassato variava da 0 a 23,8%. Le piante vitali variavano da 33,3 al 100%.

I risultati sui trattamenti endoterapici in associazione con irrorazioni fogliari (zona B) hanno permesso di evidenziare come in corrispondenza del rilievo finale (nov. 2008) diversamente dalle altre zone fortemente infestate non sono stati accertati nuovi collassi di piante o di nuovi germogli. In particolare, su 83 palme presenti nella zona (di cui 27 sintomatiche al momento del primo trattamento), nessuna è stata rimossa nel periodo febbraio-aprile, alla ripresa vegetativa 15 presentavano ricaccio o foglie centrali seghettate indice di una reazione all'infestazione in seguito al trattamento endoterapico e nessuna presentava nuovi collassi o ricacci collassati in corrispondenza del rilievo finale.

Complessivamente su 541 piante presenti all'inizio dei trattamenti, di cui 167 sintomatiche, le piante rimosse al primo rilievo sono risultate 64, 71 presentavano ricacci o foglie seghettate al secondo rilievo e 58 e 20 risultavano, rispettivamente, con nuovi collassi e con ricaccio collassato in corrispondenza del rilievo finale effettuato nel novembre 2008 (graf. 7).



**Grafico 4 – Percentuale di palme vive e rimosse per attacchi da *Rhynchophorus ferrugineus* dopo trattamento endoterapico nelle diverse sottozone urbane del comune di Catania in corrispondenza del 1° rilievo effettuato a febbraio-aprile del 2008 (\* = i trattamenti endoterapici sono stati integrati da irrorazioni alla chioma).**



**Grafico 5 – Percentuale di palme con ricacci o foglie seghettate per attacchi da *Rhynchophorus ferrugineus* e senza dopo trattamento endoterapico nelle diverse sottozone urbane del comune di Catania in corrispondenza del 2° rilievo effettuato a giugno-luglio del 2008 (\* = i trattamenti endoterapici sono stati integrati da irrorazioni alla chioma).**

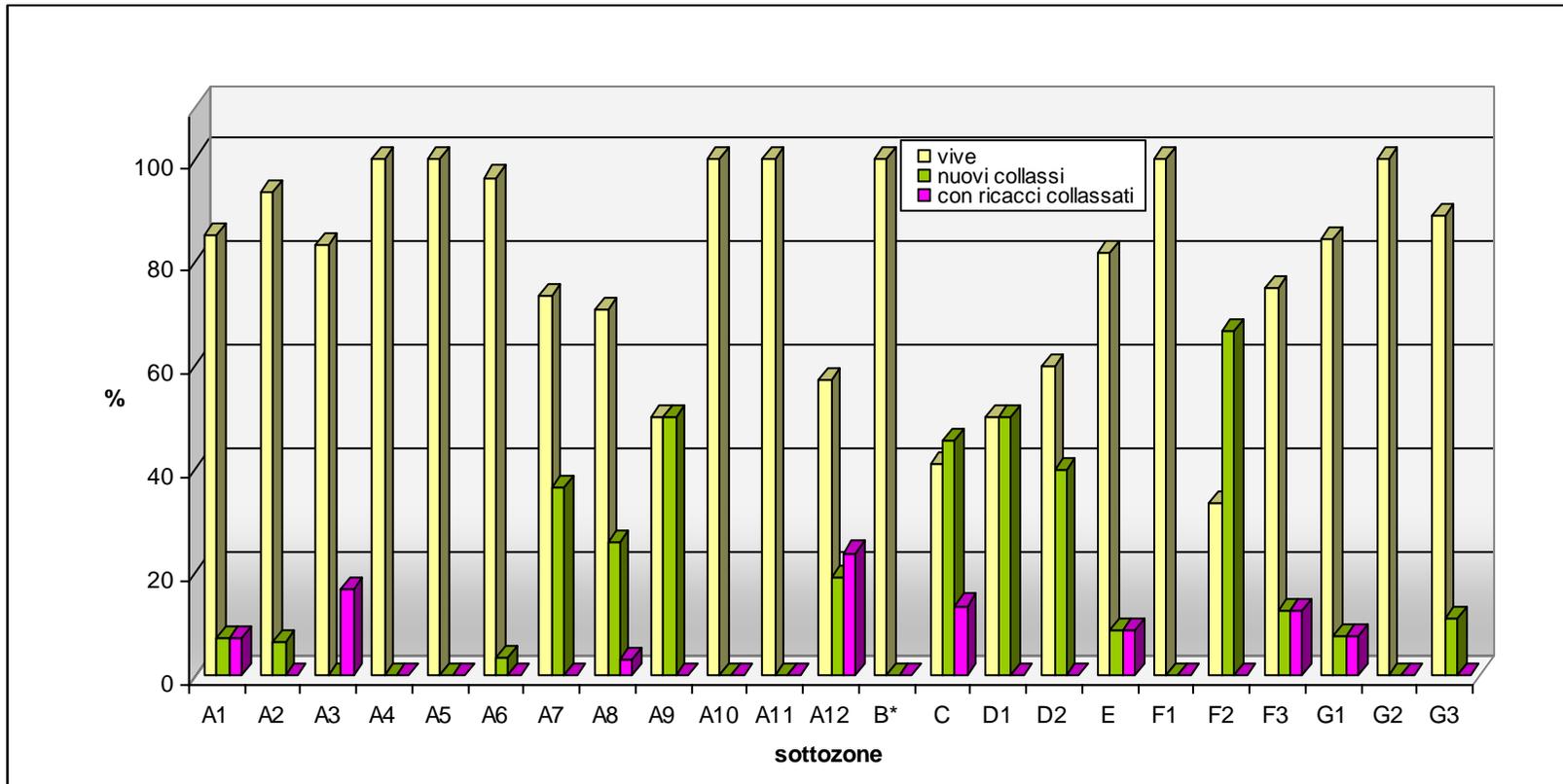
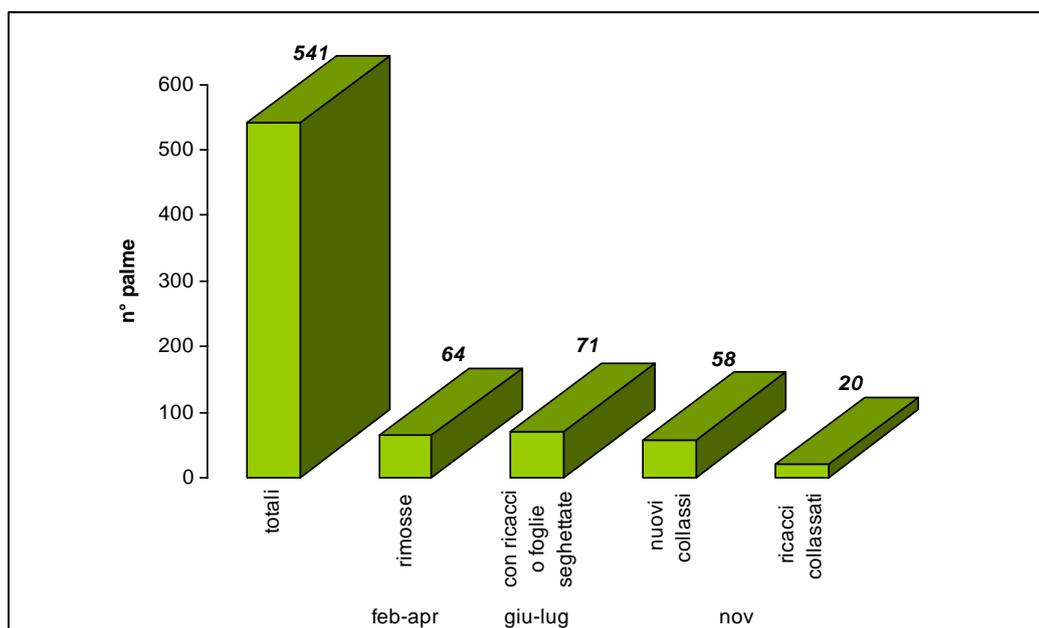


Grafico 6 – Percentuale di palme vive, con nuovi collassi e con ricacci collassati per attacchi da *Rhynchophorus ferrugineus* dopo trattamento endoterapico nelle diverse sottozone urbane del comune di Catania in corrispondenza del 3° rilievo effettuato a novembre del 2008 (\* = i trattamenti endoterapici sono stati integrati da irrorazioni alla chioma).



**Grafico 7 – Risultati della sperimentazione sul totale delle palme indagate in corrispondenza dei tre rilievi effettuati.**

### **6.2.5 Efficacia di insetticidi su larve di *Rhynchophorus ferrugineus* e valutazione della mobilità delle soluzioni iniettate mediante endoterapia**

L'efficacia dei principi attivi saggiati nei confronti di *Rhynchophorus ferrugineus* è stata dimostrata dall'elevata mortalità delle larve alimentate con tessuti prelevati da palme trattate in endoterapia. I tessuti prelevati in corrispondenza del germoglio centrale e trasferiti in laboratorio dopo un periodo di alimentazione variabile da tre a quattro giorni hanno determinato la morte del 100% delle larve, contrariamente a quanto accertato su tessuti non sottoposti a trattamento nei quali i diversi individui si presentavano ancora vitali.

Inoltre, le sezioni trasversali prelevate dalle piante sane dopo un mese dal trattamento hanno permesso di rilevare, attraverso la colorazione rossa dei tessuti, come la soluzione insetticida si sia diffusa microscopicamente fino a 1 metro al di

sotto e al di sopra del punto di inoculazione (fig.6). Leggermente inferiore, però, è risultata la traslocazione delle soluzioni nelle piante sintomatiche.

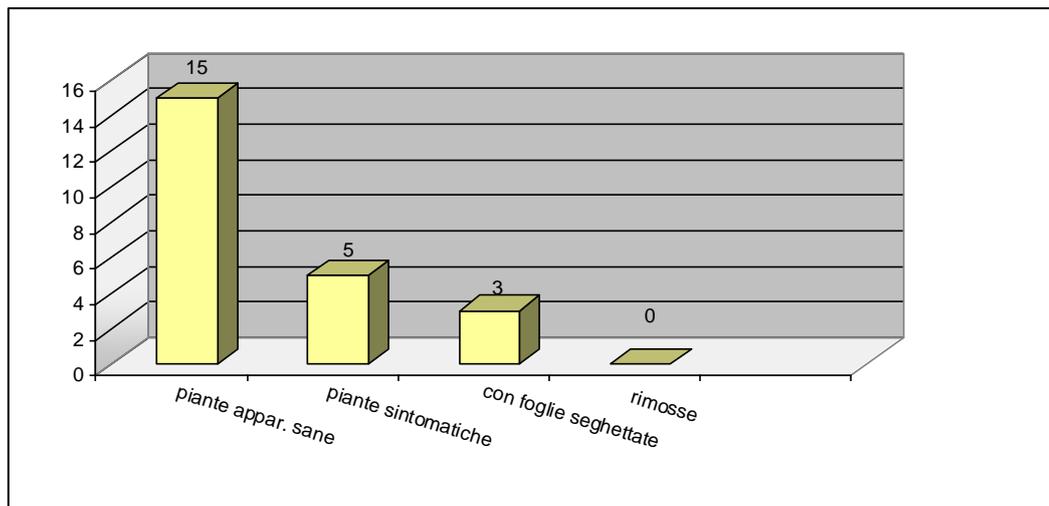


**Fig 6 - Colorazione rossa dei tessuti prelevati da piante di *Phoenix canariensis* sottoposte a trattamento endoterapico con insetticidi miscelati a safranina.**

#### **6.2.6 Valutazione dell'efficacia dell'endoterapia a pressione in associazione con irrorazioni alla chioma in giardini privati**

I risultati delle prove effettuate su 15 piante lievemente sintomatiche e su 5 piante gravemente infestate in giardini privati sono riportati nel grafico 8. I dati ottenuti hanno permesso di accertare l'elevata efficacia dei trattamenti endoterapici in associazione con irrorazioni alla chioma sia su piante già infestate che su piante apparentemente sane. Inoltre, i due prodotti saggiati in miscela (abamectina e azadiractina) si sono dimostrati efficaci anche a dosi più basse rispetto alle precedenti prove. Al rilievo effettuato alla fine del secondo anno, infatti, tutte le piante trattate hanno mantenuto l'integrità della chioma a differenza delle piante non sottoposte a trattamento presenti in zone adiacenti ai giardini, le quali sono

morte e sono state rimosse. Inoltre, 3 piante su 5 caratterizzate da gravi sintomi al momento del primo trattamento, presentavano ricacci o foglie seghettate nel germoglio centrale indice di una reazione all'infestazione dovuta al trattamento endoterapico.



**Grafico 8 – Percentuale di palme vive (apparentemente sane e sintomatiche), rimosse e con ricaccio o foglie seghettate dopo trattamento endoterapico in associazione con irrorazione alla chioma in giardini privati.**

### 6.3 - DISCUSSIONE

Le prove sperimentali condotte in ambiente urbano, in laboratorio e in giardini privati nel corso di due anni consecutivi, hanno permesso di ottenere diverse informazioni sull'efficacia di insetticidi applicati mediante trattamenti endoterapici nei confronti del punteruolo rosso su *P. canariensis*.

La prima prova effettuata in ambiente urbano ha dato solo informazioni preliminari che hanno consentito di apportare utili modifiche per la messa a punto

del trattamento endoterapico e del protocollo sperimentale. La prova, infatti, ha mostrato innanzitutto che la persistenza del trattamento ha una durata limitata ovvero un'efficacia preventiva e/o curativa parziale. Tre piante su 40 apparentemente sane dopo 10 mesi sono collassate e all'interno dei tessuti sono stati riscontrati tutti gli stadi dell'insetto ancora vivi. Le applicazioni in ogni caso si sono dimostrate selettive per la coltura. L'esecuzione del foro un metro al disotto della corona fogliare se da un lato apparentemente potrebbe facilitare la traslocazione della soluzione nelle parti apicali più suscettibili all'infestazione, dall'altro appare antieconomica (è necessario l'impiego del cestello o di lunghe scale e comunque più operatori) aumentando considerevolmente i tempi d'esecuzione del trattamento.

La seconda prova ha fornito ulteriori elementi per la messa a punto del trattamento endoterapico permettendo di riscontrare una risposta positiva delle piante sintomatiche al trattamento endoterapico e un notevole abbattimento dei tempi di lavoro per l'esecuzione del trattamento. Tutte le piante sintomatiche, infatti, hanno mantenuto la vitalità della chioma per 7-10 mesi dal trattamento. A tale conclusione si perviene per il decorso che normalmente hanno le piante infestate dal punteruolo in assenza di trattamenti chimici. Le piante infestate, infatti, se non sono trattate con abbondanti soluzioni insetticide alla chioma avendo cura di bagnare abbondantemente tutta la corona fogliare e soprattutto la gemma apicale normalmente collassano in breve tempo. Il risultato ottenuto è di grande rilievo se si considera che l'efficacia del trattamento sembra indipendentemente dall'altezza del foro. I dati rilevati dimostrano che le soluzioni iniettate sono capaci indipendentemente dall'altezza della pianta di diffondersi attraverso il sistema vascolare fino a raggiungere il germoglio apicale. L'esecuzione dei fori sotto la corona radicale come detto è stata causa di notevoli perdite di tempo. Le applicazioni endoterapiche eseguite nella seconda prova ad altezza uomo hanno consentito di ridurre considerevolmente il tempo di lavoro permettendo di trattare 3 piante/ora.

La valutazione della diffusione degli attacchi nel centro urbano di Catania ha permesso di evidenziare un diverso grado di infestazione nelle diverse zone e sottozone indagate prima dell'avvio della sperimentazione e pertanto ha consentito di predisporre un adeguato protocollo sperimentale. La maggior parte di queste sono risultate mediamente o altamente infestate. La prova di lotta effettuata nelle diverse zone ha permesso di ottenere diverse informazioni sugli effetti dell'endoterapia per il contenimento del punteruolo rosso. La percentuale di piante rimosse in corrispondenza del primo rilievo (feb.- apr. 2008) è risultata variabile da 0 a 33,3% a seconda della sottozona considerata. Questo dato è correlato al grado di infestazione della sottozona considerata, queste piante, infatti, si presentavano già gravemente sintomatiche al momento dell'inizio dei trattamenti. Il rilievo alla ripresa vegetativa ha messo in evidenza gli effetti dell'endoterapia a pressione su piante apparentemente sane e sintomatiche. Nessuna pianta, infatti, risultava collassata e in alcune aree fino al 40,9% delle piante presentavano nuovi ricacci o foglie centrali seghettate indice di una reazione all'infestazione da attribuire al trattamento endoterapico effettuato. I dati dell'ultimo rilievo, però, hanno evidenziato un'efficacia parziale del trattamento; alcune piante, infatti, presentavano nuovi collassi e/o ricacci collassati, indipendentemente dal numero di applicazioni effettuate e dall'intervallo di tempo. L'efficacia delle soluzioni insetticide impiegate nelle diverse prove è stata dimostrata anche dalla mortalità del 100% delle larve alimentate con tessuti prelevati dal germoglio centrale di piante trattate. Inoltre, questo risultato in associazione con la colorazione rossa dei tessuti accertata nelle sezioni prelevate a diversa altezza ha permesso di dimostrare come la soluzione insetticida si è diffusa sotto e sopra il punto di applicazione fino a raggiungere la chioma come riportato in letteratura da diversi Autori (Khan *et al.*, 2001; Kaakeh, 2006; Hernández-Marante *et al.*, 2003).

L'efficacia del trattamento endoterapico risulta influenzata da diversi fattori tra i quali il grado di infestazione delle palme trattate e la mobilità delle soluzioni impiegate all'interno di queste. A sua volta la mobilità degli insetticidi può variare

in relazione alla diversa solubilità dei prodotti, alla loro eventuale cristallizzazione, al pH della soluzione, alla dose d'impiego, al numero di fori praticati e alla presenza di tessuti integri all'interno della pianta. Relativamente a quest'ultimo aspetto i dati rilevati consentono di ribadire la difficoltà di traslocazione delle soluzioni nelle piante già infestate e/o colonizzate da alcuni patogeni. Frequentemente, infatti, all'interno di piante sezionate sono state rilevate porzioni di tessuto colonizzato da *G. vermoeseni* e *F. oxysporum* che compromettono la funzionalità del sistema vascolare e contribuiscono alla riduzione della traslocazione delle soluzioni iniettate. A ciò si aggiungono due aspetti legati alla particolare anatomia del sistema vascolare delle palme quali la difficoltà d'intercettazione dei fasci vascolari della pianta e la produzione di embolismi. Le palme, infatti, non presentano cambio vascolare e non si accrescono secondariamente, come le dicotiledoni, producendo cerchi annuali concentrici. Inoltre, in alcuni casi è stata accertata la presenza di ampie cavità dovute alla formazione di emboli che in genere si manifestano in fasi di stress idrico delle piante e che possono ridurre la mobilità delle soluzioni. Tali manifestazioni sono comunque reversibili, nelle palme, durante i periodi di pioggia come riportato in letteratura (Sperry, 1986).

Degni di nota sono i risultati ottenuti nelle palme trattate in endoterapia in associazione con irrorazioni alla chioma nella zona urbana B e in giardini privati. In corrispondenza dell'ultimo rilievo (novembre 2008) nella zona B diversamente dalle altre zone altamente infestate, non sono stati accertati nuovi collassi o germogli collassati.

I risultati ottenuti suggeriscono di impiegare molecole e/o microrganismi a ridotto impatto ambientale ad integrazione del metodo endoterapico così come riportato in letteratura da alcuni lavori effettuati in altri paesi (Hernández-Marante *et al.*, 2003;). L'integrazione dei due metodi consentirebbe, inoltre, di ridurre i rischi di stabilità delle palme e l'ingresso di patogeni da ferita che le applicazioni endoterapiche ripetute potrebbero causare nel tempo. Vista la mancanza di cicatrizzazione dei fori di iniezione nelle palme, risulta comunque indispensabile

procedere alla loro chiusura dopo il trattamento con un mastice protettivo da potatura (Howard, 2001).

Dai dati ottenuti nel presente lavoro e riportati in letteratura si può concludere che l'endoterapia è una tecnica utilizzabile per il contenimento delle infestazioni di punteruolo rosso purché siano considerati diversi aspetti. I trattamenti in endoterapia risultano maggiormente efficaci a scopo preventivo e devono essere presi in considerazione in un programma di lotta integrata. Questo deve prevedere l'integrazione di mezzi di tipo agronomico quali il mantenimento dello stato di salute delle palme, la repentina eliminazione di piante compromesse, una corretta gestione delle pratiche di potatura, una precisa valutazione del grado di infestazione, in associazione a mezzi chimici che prevedano l'uso combinato dell'endoterapia con trattamenti alla chioma.

## **7 – CARATTERIZZAZIONE DI *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. CANARIENSIS E PROVA DI LOTTA SU PHOENIX CANARIENSIS IN VIVAIO**

### **7.1 - MATERIALI E METODI**

#### **7.1.1 Indagine di campo, isolamento in coltura e caratterizzazione molecolare di isolati di *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* su *Phoenix canariensis***

Nel 2008 diversi sopralluoghi condotti in un vivaio commerciale in provincia di Catania hanno permesso di individuare differenti esemplari di *P. canariensis* di circa 6 anni d'età, coltivati in vaso, mostrandoti sintomi di malattia. Al riguardo, campioni sintomatici sono stati prelevati e sottoposti ad indagini di laboratorio.

In particolare, i prelievi hanno interessato le foglie con sintomi o segni della malattia, le quali sono state trasferite in laboratorio per essere sottoposte ad isolamento in coltura dell'agente causale e alla sua caratterizzazione morfologica e molecolare. Porzioni di tessuto vascolare imbrunite, di circa 4 mm<sup>2</sup>, ottenute dall'asportazione dei primi strati superficiali del rachide, sono state disinfettate esternamente con immersioni in ipoclorito di sodio al 1,5% per 1 minuto, lavate in acqua sterile e poste in piastre Petri contenenti PDA (agar patata-destrosio). I campioni vegetali sono stati, quindi, incubati in frigotermostato alla temperatura di 24° C. Dai singoli isolati ottenuti, è stato quindi prelevato un singolo conidio al fine di ottenere delle colture monoconidiche.

Tutte le colonie monoconidiche sono state, quindi, sottoposte ad analisi morfologica mediante esame delle caratteristiche morfobiometriche macroscopiche e microscopiche del micelio e dei conidi. Successivamente, è stata effettuata l'analisi molecolare mediante PCR. A tal fine trenta isolati identificati come *Fusarium* sp. allevati in piastra di PDA per 5 giorni sono stati raschiati leggermente con un bisturi e posti, singolarmente, in tubi da centrifuga da 1,5 ml.

I campioni di micelio sono stati preliminarmente congelati e liofilizzati. Successivamente, è stato controllato il peso per verificare il rispetto del range di 0,02-0,06 gr. citato in letteratura (Lee *et al.*, 1988). Per l'estrazione è stato utilizzato il protocollo di Lee *et al.* (1988) con alcune modifiche. Le fasi dell'estrazione hanno previsto:

- Aggiungere, per ogni eppendorph, 100 mg di sabbia sterile e 400 µl di tampone di lisi (50 mM Tris-HCl pH 7,2; 50 mM EDTA; 3% SDS; 1% 2-mercaptoetanol) sino a ridurre in poltiglia con un pestello di eppendorph. Se la soluzione si presenta troppo densa aggiungere il tampone di lisi sino a 700 µl.
- Incubare a 65 °C per 1 ora.
- Aggiungere 400 µl di una soluzione di fenolo:cloroformio:isoamilalcol (25:24:1) e agitare con il vortex a bassa velocità per circa 1 minuto. È necessario utilizzare un volume di 1:1 tra il tampone di lisi e la soluzione di fenolo:cloroformio:isoamilalcol, si devono quindi considerare eventuali addizioni nel punto 1.
- Invertire un paio di volte i tubi e centrifugare a 12000 giri per 10 minuti. Rimuovere la fase acquosa, contenente il DNA, ponendola in una nuova eppendorph.
- Aggiungere all'eppendorph contenente la soluzione organica 400 µl di tampone di lisi, agitare con il vortex e centrifugare a 12000 giri per 10 minuti.
- Rimuovere la fase acquosa aggiungendola alla nuova eppendorph del punto 4.
- Aggiungere all'eppendorph con la fase acquosa un ugual volume di cloroformio: isoamilalcol, agitare con il vortex e centrifugare a 12000 giri per 10 minuti.

- Rimuovere la fase superiore in una nuova eppendorph e aggiungere 10 µl di NaOAc 3M e 0,5 volumi di isopropanolo. La precipitazione del DNA dovrebbe essere visibile.
- Centrifugare a 10000 giri per 2 min. ed eliminare il surnatante.
- Aggiungere 200 µl di etanolo al 70% e centrifugare a 12000 giri per 2 min. Eliminare l'etanolo e fare asciugare i tubi.
- Risospendere il pellet in 100-500 µl di tampone TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 mM EDTA). La quantità di TE dipende dalla concentrazione del DNA che deve essere compresa tra 0,1 e 10 ng/µl. Per la PCR ogni campione di DNA deve presentare una concentrazione di 0,1-10 ng/µl, che può essere raggiunta con diluizione in TE o acqua distillata.

La quantificazione del DNA estratto da ogni campione è stata eseguita mediante elettroforesi a  $5,7 \text{ V cm}^{-1}$  in gel di agarosio 0,8% in 0.5 TAE tampone (Sambrook *et al.*, 1989), colorati con bromuro di etidio e fotografati su un transilluminatore UV. In ogni corsa elettroforetica sono stati posti marcatori standard per 500, 250, 125, 63, 31, 15 ng/6µl, di peso molecolare (Gibco BRL).

Il Dna estratto è stato diluito 10 volte e analizzato mediante PCR con i primer HK66 e HK 67 (tab. 6) per l'identificazione di *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* (Plyler *et al.*, 1999).

**Tabella 6 – Sequenza dei primer specifici utilizzati nella PCR per l'identificazione di *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*.**

Primer	Sequenza	Bersaglio
HK66	CATCAGAAGTGC GTTCGTAGG	Foc
HK67	CGTTGTAATGGTTTGCCTCAC	Foc

L'amplificazione è stata eseguita in 25 µl di miscela di reazione contenente: tampone di PCR (Gibco, BRL), MgCl<sub>2</sub> 1,8 mM, dNTP 115 µM, primer 13 ng ognuno, *Taq* DNA polimerasi 0,2 U (Gibco, BRL). Come DNA bersaglio per la reazione di PCR è stato utilizzato 5 µl del DNA estratto (concentrazione 0,1-10 ng/µl). L'amplificazione è stata eseguita in un amplificatore Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystem), con il seguente programma: un ciclo di 30 sec. a 94 °C, seguito da 30 cicli di 30 sec. a 90 °C, 1 min. a 62 °C e 2 min. a 72 °C, seguiti da una estensione finale di 10 min. a 72 °C. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi a 5.7 V cm<sup>-1</sup> in gel di agarosio 1,5% in 0.5 TAE tampone (Sambrook *et al.*, 1989), colorati con bromuro di etidio e fotografati con transilluminatore UV. In ogni corsa elettroforetica è stato posto un marcatore di peso molecolare che produce una banda ogni 100 coppie di basi (100 bp ladder).

### **7.1.2 Efficacia di fungicidi applicati in endoterapia per il contenimento di *F. oxysporum* f. s. *canariensis* su *Phoenix canariensis***

La prova è stata effettuata in vivaio in un campo di circa 10000 esemplari di *Phoenix canariensis* di circa 6 anni d'età, coltivati in vaso. L'obiettivo è stato quello di valutare l'efficacia di due fungicidi applicati mediante endoterapia attiva per il contenimento di infezioni vascolari causate da *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* in condizioni di inoculo naturale su piante sintomatiche e apparentemente sane (fig. 7) L'efficacia dei principi attivi applicati in endoterapia è stata valutata a confronto con quella ottenuta da trattamenti radicali con un prodotto commerciale a base di tiofanato-metile autorizzato per il contenimento della fusariosi su alcune colture ornamentali. Inoltre, su alcune piante (1 per

replica) è stata valutata la capacità delle soluzioni iniettate di distribuirsi all'interno delle piante mediante l'uso di un colorante la safranina O (1%) che è stato miscelato ai prodotti chimici.

A tal fine, sono state predisposte 7 tesi replicate tre volte distribuite secondo lo schema sperimentale a blocchi randomizzati con 7 piante per replica. Un ugual numero di piante non trattate costituiva il controllo. Considerata l'attività esclusivamente preventiva del tiofanato-metile, sulle piante sintomatiche sono stati effettuati esclusivamente i trattamenti endoterapici.

I fungicidi iniettati in endoterapia sono stati applicati una sola volta mentre il trattamento radicale con tiofanato-metile è stato ripetuto due volte somministrando circa 4 litri di soluzione per pianta. Le caratteristiche dei fungicidi saggiati e le dosi utilizzate sono riportate in tabella 8.

Per tutta la durata della prova le piante sono state mantenute in vaso in pieno campo.

Prima dell'applicazione dei fungicidi in campo è stata valutata sulle piante sintomatiche selezionate la gravità dei sintomi facendo riferimento alla scala convenzionale riportata in tabella 7.

**Tabella 7 - Scala utilizzata per la valutazione della gravità delle infezioni vascolari causate da *Fusarium oxysporum* f.s. *canariensis* su piante di *Phoenix canariensis*.**

0 = nessun sintomo
1 = da 1 a 3 foglie sintomatiche
2 = da 4 a 6 foglie sintomatiche
3 = da 7 a 9 foglie sintomatiche
4 = pianta avvizzita

Per i trattamenti endoterapici in pressione è stata utilizzata la stessa apparecchiatura descritta precedentemente. I fori sono stati praticati ad una profondità variabile a seconda del diametro dello stipite mediante un trapano elettrico.

La pressione di esercizio della macchina era compresa tra 1 e 1,2 Atm ed era adattata di volta in volta in base alla reazione della singola pianta (scarso assorbimento, emissione di gomma, ecc.). La soluzione iniettata variava da 50 a 250ml/pianta a seconda della capacità di assorbimento della pianta.

Il rilievo sull'efficacia dei trattamenti è stato effettuato dopo due mesi dall'applicazione dei fungicidi ed alla comparsa dei sintomi sulla tesi controllo determinando la diffusione e la gravità delle infezioni calcolata in base all'espressione di McKinney e utilizzando per la classificazione dei sintomi la scala riportata in tabella 7.

I risultati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza per accertare la significatività dei fattori mediante il test di Student-Newman-Keuls.

Dopo il rilievo dalle piante sane e apparentemente sintomatiche iniettate con il colorante sono state prelevate sezioni dello stipite e delle guaine fogliari sotto e sopra il punto di inoculazione.

**Tabella 8 - Caratteristiche e dosi d'impiego dei trattamenti effettuati nella prova di lotta su *Phoenix canariensis*.**

Trattamento	Formulato	Ditta produttrice	Principio attivo (%)	Dose ml-g/hl
Tiofanato-metile*	Faro	Gowan Italia S.p.a.	38,3	100
Tiabendazolo	Arbotect 20 S	Ital-Agro S.r.l.	20	200
Propiconazolo	Tilt 25 EC	Syngenta Crop Protection	25,5	600

\* utilizzato solo per trattamenti al terreno



**Fig. 7- Schema del campo (in alto a sinistra) e piante apparentemente sane e sintomatiche (in alto a destra); diverse fasi del trattamento endoterapico (in basso).**

## 7.2 - RISULTATI

### 7.2.1 Indagine di campo, isolamento in coltura e caratterizzazione molecolare di isolati di *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* su *Phoenix canariensis*

Le indagini effettuate in campo hanno evidenziato un'elevata diffusione della tracheomicosi sugli esemplari sottoposti allo studio. Il numero di piante malate è risultato del 10%. Le piante colpite mostravano sintomi di disseccamento settoriale a partire dalle foglie più vecchie poste negli anelli più bassi della corona apicale, la quale si presentava interamente colpita nelle piante in uno stato avanzato della malattia.

Tali disseccamenti manifestavano un andamento ascendente interessando le foglie più giovani degli anelli superiori. In alcuni esemplari, tuttavia, tale sintomatologia poteva essere osservata a partire dalla regione mediana della corona apicale, con sintomi riguardanti sia le fronde degli anelli superiori che quelle degli anelli inferiori. Sulle fronde colpite, la malattia manifestava spesso un andamento unilaterale; i segmenti laterali disseccavano a partire dalla base fogliare di un lato della foglia sino all'apice, dal quale prendeva inizio il disseccamento del lato opposto con andamento discendente. Nelle foglie di alcuni esemplari era, tuttavia, possibile individuare l'inizio dei sintomi a partire dalla loro parte mediana. Sul rachide sono stati osservati, a partire dalla base, imbrunimenti di colore marrone scuro che procedevano progressivamente verso l'apice della foglia. Tagliando le foglie colpite e separandole dal fusto era possibile rilevare gli imbrunimenti dei fasci vascolari. Nelle sezioni di taglio trasversale è stata, talvolta, riscontrata la presenza di una colorazione rosea dei fasci vascolari.

Gli isolamenti effettuati hanno permesso di rinvenire frequentemente, dalle porzioni di tessuto vascolare imbrunito poste ad incubare su piastre Petri, colonie fungine riferibili al genere *Fusarium*. Gli isolati di *Fusarium* sp. su Potato

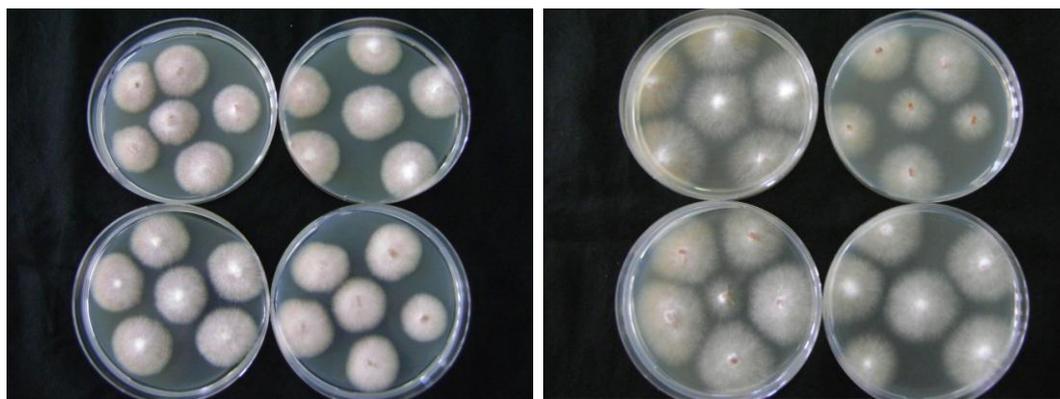
Dextrose Agar (PDA), dopo circa 6-7 giorni, hanno originato colonie di colore viola variabile da chiaro a scuro; il micelio appariva fioccoso, rado o abbondante, variabile dal biancastro al viola chiaro (Fig. 8). Abbondanti macroconidi arancio chiaro o viola chiaro erano prodotti in massa soprattutto nella parte centrale; caratteristiche che hanno portato all'attribuzione al genere *Fusarium*.

Dopo circa 15 giorni su agar foglia di garofano (CLA) questi isolati sono apparsi caratterizzati da macroconidi, riuniti in sporodochi arancio pallido generati da monofialidi su rami conidiofori o, alcune volte, sulle ife. I macroconidi si presentavano corti in lunghezza, falcati o quasi diritti, con parete sottile e generalmente trisetati. I microconidi erano riuniti in false teste su piccoli monofialidi; la loro forma era variabile da ovale, ellittica o reniforme e spesso non settata. In molti isolati, le clamidospore erano formate abbondantemente e rapidamente (2-4 settimane); si presentavano sia solitarie o appaiate, ma anche a grappolo o in piccole catene. Erano presenti sia in posizione intercalare che terminale, molto evidenti nelle ife superficiali anche se sembravano apparire da ife emergenti. Su CLA gli isolati sono stati identificati come *F. oxysporum* (Leslie e Summerell, 2006).

In alcuni campioni è stata accertata la presenza, in associazione all'agente principale, di colonie caratterizzate da un micelio aereo fioccoso di colore rosato, le quali avendo una crescita più veloce, riuscivano a coprire la crescita del primo; la caratterizzazione di tali colonie ha permesso d'identificare il fungo come *Gliocladium vermoesonii* (Biourge) Thom., agente del marciume rosa, la cui presenza su esemplari adulti di *P. canariensis*, indeboliti da fattori di stress abiotici o da attacchi di altri patogeni è riportata in letteratura (Polizzi, 2000). Successivamente, alle osservazioni morfologiche è stata creata una collezione di isolati monoconidici provenienti dai singoli esemplari di *P. canariensis* saggiati. Successivamente le analisi molecolari hanno permesso di identificare in modo inequivocabile la specie responsabile della malattia.

Il DNA dei trenta monoconidici saggiati, estratto mediante il protocollo precedentemente descritto ha permesso di verificare il rispetto delle concentrazioni

citare in letteratura, variando da 125 e 63 ng/6 $\mu$ l. L'analisi di questo DNA ha messo in evidenza la presenza di ampliconi ottenuta utilizzando i primer specifici per il *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis* HK66 e HK67.



**Fig. 8 -** Colonie fungine di *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis* isolate su PDA da *Phoenix canariensis*.

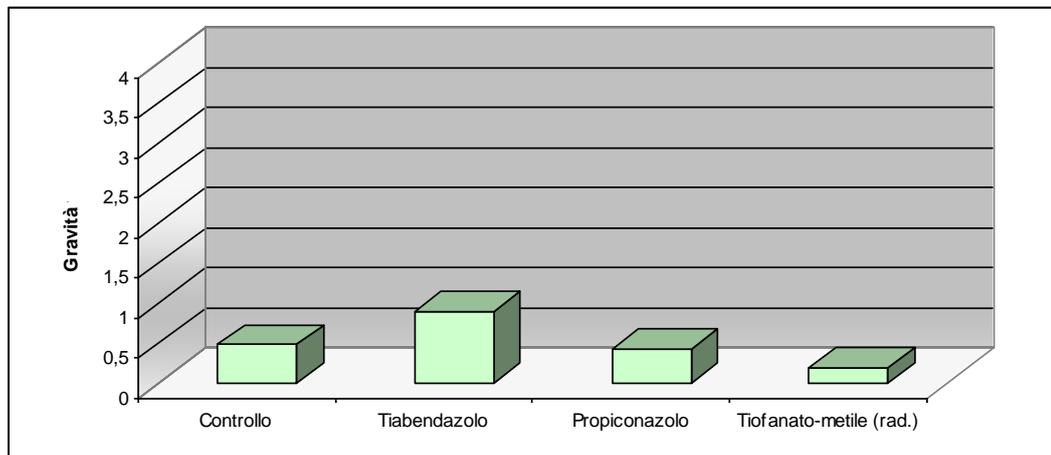
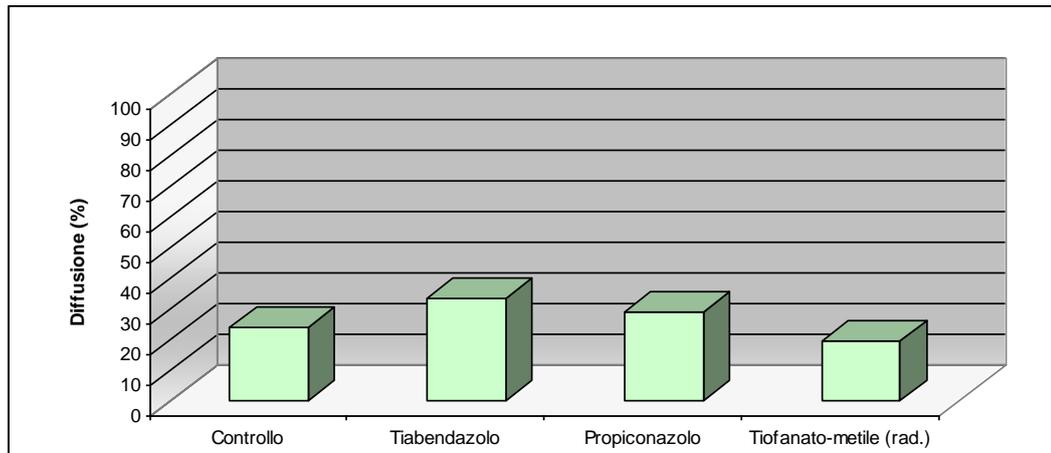
### **7.2.2 Efficacia di trattamenti in endoterapia per il contenimento di *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* su *Phoenix canariensis***

I risultati della prova di lotta su *P. canariensis* in vivaio sono stati rappresentati nei grafici 9-11. I valori rappresentano la media di 3 ripetizioni. Per l'elaborazione statistica i dati percentuali sono stati trasformati nei corrispondenti valori angolari. Valori contrassegnati da lettere eguali o privi di lettere non differiscono tra loro significativamente secondo il test di Student-Newman-Keuls, per  $P = 0,05$ .

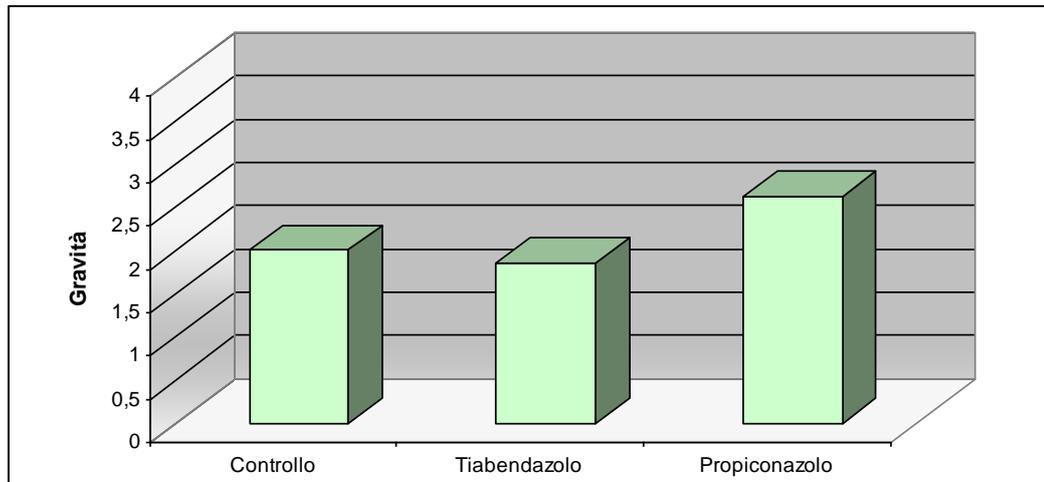
I trattamenti fungicidi applicati mediante endoterapia non hanno consentito di contenere le infezioni causate da *F. oxysporum* f. s. *canariensis* su piante di *Phoenix canariensis*. Al rilievo, effettuato dopo 2 mesi dal trattamento, la diffusione delle infezioni su piante apparentemente sane trattate in endoterapia con entrambi i fungicidi è risultata superiore al controllo non trattato con valori

del 33,3% per tiabendazolo e del 28,6% per propiconazolo mentre nella tesi controllo la diffusione rilevata è stata del 23,8%. Migliore è risultata l'attività del tiofanato-metile applicato al terreno che pur non differenziandosi statisticamente dal controllo non trattato ha determinato un valore di diffusione del 19,1% contrariamente a quanto accertato nella tesi controllo (23,8%) (graf. 9). Le applicazioni endoterapiche si sono dimostrate poco efficaci anche nei confronti della gravità delle infezioni. Nelle piante trattate con tiabendazolo la gravità delle infezioni è risultata pari a 0,90 e superiore al controllo in cui è stato accertato un valore pari a 0,48. Leggermente inferiore al controllo è risultata la gravità nella tesi trattata con propiconazolo (0,43). Il tiofanato-metile ha dimostrato una migliore attività anche nel contenimento della gravità delle infezioni determinando una riduzione rispetto al controllo non trattato del 60,4% (graf. 10). Su piante già sintomatiche al momento del trattamento, la gravità delle infezioni nella tesi trattata con propiconazolo è risultata superiore al controllo con un valore pari a 2,62 mentre un valore inferiore è stato accertato per il tiabendazolo (1,86). Nel controllo il valore rilevato è stato pari a 2. Nessuna differenza statistica è stata accertata (graf. 11).

Le sezioni prelevate dalle piante sane trattate con fungicidi in endoterapia miscelati al colorante hanno permesso di accertare un'elevata mobilità delle soluzioni iniettate che si sono diffuse oltre 40 cm sia sopra che sotto il punto di inoculazione. Leggermente inferiore è risultata la diffusione delle soluzioni nelle piante sintomatiche.



**Grafici 9-10 - Diffusione e gravità delle infezioni causate da *Fusarium oxysporum* f.sp. *canariensis* su esemplari di *Phoenix canariensis* apparentemente sani dopo i trattamenti in endoterapia.**



**Grafico 11- Gravità delle infezioni causate da *Fusarium oxysporum* f.sp. *canariensis* su esemplari di *Phoenix canariensis* sintomatici dopo i trattamenti in endoterapia.**

### 7.3 DISCUSSIONE

L'indagine svolta nel 2008 in un vivaio commerciale in provincia di Catania ha permesso di accertare un'elevata diffusione dell'avvizzimento vascolare su piante di *Phoenix canariensis* coltivate in vaso. Gli isolamenti su substrato nutritivo effettuati da tessuto sintomatico e l'osservazione delle principali caratteristiche morfo-biometriche degli isolati ottenuti in coltura in associazione con le analisi del DNA hanno consentito di identificare l'agente causale della malattia come *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*. In Italia, la presenza di questa specie è stata riportata per la prima volta nel 1974 (Corte, 1974) e successivamente è stata accertata in Sicilia (Catara *et al.*, 2001), Marche, Liguria e Sardegna (Migheli *et al.*, 2005).

La prova di lotta condotta in vivaio ha messo in evidenza la scarsa efficacia dei fungicidi applicati in endoterapia nei confronti di *F. oxysporum* f. sp. *canariensis*. Questi, infatti, non hanno permesso di contenere le infezioni sia su piante

apparentemente sane che sintomatiche. Questo risultato potrebbe essere spiegato anche dalla giovane età delle piante trattate ed in particolare dalla dimensione del diametro dello stipite. Alcuni lavori riportano che palme con un diametro dello stipite inferiore a 30 cm non sono adatte alle iniezioni nel tronco (Hernández-Marante *et al.*, 2003), a causa probabilmente della difficoltà d'intercettazione dei fasci vascolari della pianta.

Inoltre, la scarsa efficacia su piante sintomatiche, può essere legata alla minore mobilità delle soluzioni nei vasi colonizzati dal patogeno, oltre al fatto che molte delle piante considerate apparentemente sane, pur non manifestando sintomi esterni, potevano già essere infette all'inizio del trattamento. Questo risultato è stato evidenziato anche osservando le sezioni prelevate da piante sintomatiche trattate con una soluzione miscelata con safranina. Leggermente migliore rispetto ai fungicidi applicati in endoterapia, è risultata l'attività del tiofanato-metile applicato per via radicale che comunque non ha consentito di contenere statisticamente le infezioni. Questo principio attivo, infatti, ha prevalentemente un'attività preventiva pre-vascolare e non risulta efficace dopo l'insediamento del fungo nel sistema vascolare come si evince da alcuni lavori presenti in letteratura che riportano l'efficacia preventiva dei benzimidazoli su *Fusarium* spp. (Reid *et al.*, 2002; Rose *et al.*, 2003).

Il contenimento di questo patogeno si deve basare prevalentemente sull'uso di mezzi preventivi e dipende, innanzitutto, da corrette pratiche agronomiche quali la movimentazione di materiale sano e di provenienza certa, la disinfezione degli strumenti di potatura e la rapida diagnosi sia nei vivai che nel territorio.

## **8. PROVE PER IL RISANAMENTO DELLA CARENZA DI MANGANESE IN *CYCAS REVOLUTA***

### **8.1 MATERIALI E METODI**

#### **8.1.1 Efficacia di applicazioni fogliari e al terreno su piante in vaso e in piena terra**

Nel corso del primo anno sono state condotte diverse prove per valutare l'efficacia di trattamenti con apporto di manganese per la cura della carenza di questo microelemento in esemplari di *Cycas revoluta*.

Le prove sono state effettuate nel periodo primaverile (marzo – giugno), prima dell'emissione della nuova corona di fronde e durante l'accrescimento della stessa, su 360 piante di età compresa tra i 5 e i 25 anni. Tra queste 180 erano coltivate in vaso e 180 erano coltivate in piena terra in un vivaio sito in provincia di Catania. Per ciascuna tipologia di coltivazione (vaso e piena terra) le piante sono state suddivise e trattate così come riportato: tesi 1) 45 piante con sintomi lievi e 45 piante con sintomi gravi coltivate in vaso sono state trattate con applicazioni al terreno di solfato di manganese; tesi 2) 45 piante con sintomi lievi e 45 piante con sintomi gravi coltivate in piena terra sono state trattate con applicazioni al terreno di solfato di manganese; tesi 3) 45 piante con sintomi lievi e 45 piante con sintomi gravi coltivate in vaso sono state trattate con applicazioni fogliari di chelato di manganese; tesi 4) 45 piante con sintomi lievi e 45 piante con sintomi gravi coltivate in piena terra sono state trattate con applicazioni fogliari di chelato di manganese; tesi 5) 45 piante con sintomi lievi e 45 piante con sintomi gravi coltivate in vaso costituivano il controllo non trattato; tesi 6) 45 piante con sintomi lievi e 45 piante con sintomi gravi coltivate in piena terra costituivano il testimone non trattato.

Nelle piante coltivate in vaso le applicazioni sono state effettuate apportando al terreno da 100 a 500 g di solfato di manganese a seconda del volume del vaso e dell'età della pianta. Su piante in piena terra sono stati apportati fino a 1500 g di

prodotto distribuiti in tre soluzioni. I trattamenti fogliari sono stati effettuati utilizzando chelato di manganese (Manganese EDTA 78 L) alla dose di 400 g/hl e avendo cura di bagnare accuratamente l'apparato fogliare. Sono stati effettuati in totale 4 trattamenti fogliari durante tutta la fase di accrescimento del nuovo germoglio ad intervalli compresi tra 7 e 12 giorni.

I rilievi per la valutazione dell'efficacia dei trattamenti fogliari ed al terreno sono stati effettuati nel periodo settembre-ottobre sulle nuove foglie di età variabile tra 2 e 4 mesi formate successivamente al trattamento.

### **8.1.2 Efficacia di trattamenti in endoterapia passiva e a pressione**

Nel secondo anno la prova è stata effettuata in una coltivazione in piena terra, poco prima della ripresa vegetativa, selezionando 200 piante sintomatiche tra circa 3000 esemplari di *C. revoluta* e su 30 piante, anch'esse in piena terra, coltivate in giardini privati. L'obiettivo della prova è stato quello di valutare l'efficacia di applicazioni in endoterapia a base di chelato di manganese (Manganese EDTA 78 L) per il risanamento di piante, di età compresa tra i 10 e i 20 anni, con sintomi visibili di carenza del microelemento. In campo (Fig. 11) 50 piante sono state trattate utilizzando il metodo ad assorbimento naturale e 50 con il metodo a pressione. Lo stesso numero costituiva il testimone non trattato. I trattamenti sulle piante di privati sono stati effettuati esclusivamente con il metodo di iniezione attivo. In entrambi i casi è stata effettuata una sola applicazione.

Prima della applicazione del microelemento in vivaio è stata valutata sulle piante selezionate la gravità dei sintomi facendo riferimento alla scala convenzionale riportata in tabella 8.

**Tabella 8 - Scala utilizzata per la valutazione della gravità dei sintomi causati da carenza di manganese su piante di *Cycas revoluta*.**

0 = nessun sintomo
1 = clorosi fogliare
2 = clorosi associata a lievi disseccamenti
3 = clorosi associata a gravi necrosi
4 = intere foglie necrotiche

Nel caso di applicazione per assorbimento naturale è stata realizzata una semplice apparecchiatura utilizzando materiali comunemente usati in medicina, così come è stato peraltro riportato in letteratura per numerose prove effettuate con questo metodo (Schreiber, 1969; Jones e Gregory, 1971). L'apparato era composto da un sacchetto catetere, un tubo per flebo con valvola di regolazione del flusso e meccanismo anti-embolia e degli iniettori specifici per iniezioni endoterapiche. Il sacchetto a cui è stato attaccato il tubo con la valvola di regolazione chiusa è stato riempito con la soluzione precedentemente preparata e sospeso a un'altezza di 2 m sopra il punto di iniezione, quindi è stato inserito l'iniettore nel foro praticato nel fusto, è stato collegato il tubo all'iniettore e infine è stata aperta la valvola di regolazione del flusso. Il foro è stato praticato sul fusto mediante un trapano con punta da 6 mm a 40 cm dall'apice e inclinato di 45° rispetto all'asse principale. La profondità del foro variava a seconda della circonferenza del fusto della pianta trattata.

Per i trattamenti endoterapici in pressione si è fatto ricorso all'apparecchio utilizzato nelle precedenti prove, mentre per le piante in giardini privati è stato utilizzato l'apparecchio denominato Arboprof®. L'apparato è costituito da un serbatoio per i liquidi e un serbatoio per l'aria della capacità di 15 litri a 8 bar. Il serbatoio per il liquido posto sopra il contenitore per l'aria ha una capacità di 3 litri, peso a vuoto 6,3 kg ed è munito di 8 rubinetti porta – iniettore. Ad essi sono

stati collegati i tubi alla cui estremità è fissato l'iniettore che è stato inserito all'interno del foro sul fusto.

La pressione di esercizio della macchina era compresa tra 0,8 e 1,2 Atm ed era adattata di volta in volta in base alla reazione della singola pianta (scarso assorbimento, emissione di gomma, ecc.). La soluzione iniettata variava da 50 a 100 ml/pianta utilizzando una dose di chelato di manganese pari a 10g/100 ml di acqua distillata.

La valutazione dell'efficacia dei trattamenti è stata effettuata su foglie di età variabile da 2 a 4 mesi e sul germoglio formatosi l'anno successivo all'applicazione.



**Fig. 9 – Sintomi di carenza di manganese su piante di *Cycas revoluta* allevate in piena terra**



**Fig. 10 – Sintomi di carenza di manganese su piante di *Cycas revoluta* allevate in contenitore.**



Fig. 11 – Schema del campo e differenti fasi del trattamento endoterapico su *Cycas revoluta*.

## **8.2 RISULTATI**

### **8.2.1 Efficacia di applicazioni fogliari e al terreno su piante in vaso e in piena terra**

I risultati delle prove condotte in vivaio e in giardini privati al fine di valutare l'efficacia di trattamenti fogliari e radicali nella cura della carenza di manganese in *Cycas revoluta* sono riassunti nelle tabelle 9-10.

Le prove condotte nel corso del primo anno sia in vaso che in piena terra con trattamenti fogliari con chelato di manganese non hanno permesso di risanare la carenza in nessuno degli esemplari in esame.

I trattamenti con solfato di manganese al terreno si sono dimostrati risolutivi in vaso determinando una percentuale di risanamento del 100% sia nelle piante con gravi sintomi che in quelle con sintomi lievi (tab. 10). Nessuna delle piante trattate, infatti, ha ripresentato sulla nuova vegetazione i sintomi dell'alterazione.

Sulle piante coltivate in piena terra le applicazioni con solfato di manganese sono risultati variabili. Esse hanno consentito nella maggior parte dei casi il risanamento degli esemplari (82% delle piante con sintomi lievi di carenza e 74% nel caso di piante con gravi sintomi di carenza) per i quali non sono state accertati sintomi visibili nel nuovo getto di foglie (tab. 9). Per le restanti piante è stata accertata solo una attenuazione dei fenomeni dopo il primo anno di trattamento.

**TABELLA 9 Risultati dei trattamenti al terreno e fogliari effettuati su esemplari di *Cycas revoluta* allevati in piena terra.**

Trattamenti		Numero di piante	Percentuale di piante risanate
Applicazioni di solfato di manganese al terreno *	Piante con sintomi lievi	45	82%
	Piante con sintomi gravi	45	74%
Applicazioni fogliari di manganese chelato **	Piante con sintomi lievi	45	0%
	Piante con sintomi gravi	45	0%
Totale piante trattate		180	

\* Effettuati apportando 1500 g distribuiti in tre soluzioni.

\*\* manganese EDTA 78 L alla dose di 400g/hl.

**TABELLA 10 Risultati dei trattamenti al terreno e fogliari effettuati su esemplari di *Cycas revoluta* allevati in vaso.**

Trattamenti		Numero di piante	Percentuale di piante risanate
Applicazioni di solfato di manganese al terreno *	Piante con sintomi lievi	45	100%
	Piante con sintomi gravi	45	100%
Applicazioni fogliari di manganese chelato **	Piante con sintomi lievi	45	0%
	Piante con sintomi gravi	45	0%
Totale piante trattate		180	

\* Effettuate apportando al terreno da 100 a 500g a seconda delle dimensioni del vaso e dell'età della pianta

\*\* manganese EDTA 78 L alla dose di 400g/hl.

### **8.2.2 Efficacia di trattamenti in endoterapia passiva e a pressione**

Le prove condotte durante il secondo anno hanno permesso di determinare l'efficacia delle applicazioni mediante trattamenti endoterapici sia in vivaio che in giardini privati. La gravità delle infezioni valutata in campo prima del trattamento ha permesso di evidenziare una elevata severità dei sintomi con valori compresi prevalentemente nelle classi 3 e 4 della scala utilizzata (tab. 8).

Un differente risultato è stato ottenuto utilizzando il metodo a pressione e il metodo per assorbimento naturale. In quest'ultimo caso (endoterapia passiva) non è stato possibile valutare l'efficacia del trattamento a causa delle difficoltà di iniezione della soluzione all'interno dello stipite per la fuoriuscita immediata di mucillagini dal foro praticato.

Nelle prove condotte utilizzando trattamenti endoterapici per pressione in vivaio è stata evidenziata un'elevata attività dell'applicazione che ha determinato il risanamento del 100% degli esemplari trattati. Tutte le piante hanno beneficiato dell'apporto dell'elemento mediante endoterapia attiva e non hanno manifestato i sintomi dell'alterazione sulla nuova vegetazione fino all'anno successivo al trattamento. Lo stesso risultato è stato ottenuto con questo metodo nelle piante trattate in giardini privati (tab. 11) (Fig. 12).

Tutte le piante non trattate nella tesi controllo hanno manifestato nuovi sintomi di carenza sul nuovo getto di foglie.

**TABELLA 11 Risultati dei trattamenti in endoterapia effettuati su esemplari di *Cycas revoluta* allevati in piena terra.**

<b>Trattamenti</b>	<b>Numero di piante</b>	<b>Percentuale di piante affette da carenza</b>
Applicazioni in endoterapia attiva in vivaio *	50	0%
Applicazioni in endoterapia passiva in vivaio *	50	100%
Applicazioni in endoterapia attiva in giardini privati *	30	0%
Controllo	100	100%
<b>Totale piante</b>	<b>230</b>	

\* Effettuate con una soluzione a base di chelato di manganese utilizzandola dose di 10g/100ml



**Fig. 12 – Pianta di *Cycas revoluta* prima (in alto) e dopo il trattamento endoterapico (in basso).**

### 8.3 DISCUSSIONE

Le prove sperimentali condotte in vivaio e in giardini privati nel corso di due anni consecutivi, hanno permesso di ottenere diverse informazioni sull'efficacia di trattamenti in vaso e piena terra per la cura della carenza di manganese in *Cycas revoluta*.

Le prove eseguite nel corso del primo anno hanno messo in evidenza l'efficacia dei trattamenti al terreno con solfato di manganese su piante in vaso consentendo il risanamento del 100% delle piante trattate. L'elevata efficacia ottenuta è legata probabilmente al volume limitato di substrato presente nelle coltivazioni in vaso, che consente di ottenere nel suolo una concentrazione sufficiente. A ciò si aggiungono le limitate dinamiche a cui è soggetto il microelemento in contenitore. I trattamenti al terreno effettuati su piante in piena terra hanno mostrato buoni risultati nella maggior parte degli esemplari trattati, ma hanno richiesto l'apporto di notevoli quantità di manganese e diverse applicazioni. Nelle piante coltivate in piena terra gli interventi non sono stati sempre risolutivi. Ciò è probabilmente imputabile alle reazioni chimiche a cui è soggetto il manganese nel suolo e alla facilità con cui può andare incontro a reazioni di ossido-riduzione che lo trasformano in forme chimiche ad alta valenza non più assimilabili dalle piante. Il manganese, infatti, è presente nel suolo in tre stati di ossidazione, tra i quali lo stato ridotto bivalente ( $Mn^{2+}$ ), rappresenta la forma disponibile per l'assorbimento da parte di piante e per il trasporto interno. La prevalenza dell'una o dell'altra forma di manganese nel suolo è un fattore fortemente influenzato da numerosi fattori quali pH, concentrazione di  $O_2$  e attività microbica (Gilkes e McKenzie, 1988; Norvel, 1988). Anche l'irrigazione potrebbe aver influenzato i risultati ottenuti in piena terra determinando un'eccessiva lisciviazione del manganese e una ridotta capacità di assorbimento da parte delle radici nel caso di eccessi idrici. Inoltre, le elevate dosi necessarie per i trattamenti al terreno nel caso di piante in piena terra spesso sono in netto contrasto con i criteri di sostenibilità per l'ambiente che deve guidare gli interventi sulle piante. Il rischio di inquinamento

delle falde e di alterazione degli equilibri minerali nel suolo legati all'apporto di dosi eccessive di solfato di manganese rendono i trattamenti al suolo in taluni contesti inapplicabili o eccessivamente costose in termini ambientali ed economici.

La carenza di manganese è molto diffusa in tutti i suoli vulcanici tipici delle zone ricadenti alle pendici dell'Etna. In alcuni casi sarebbe opportuno valutare la convenienza pratica di estirpare le piante e trapiantarle su terreni naturalmente dotati di questo elemento. Probabilmente, però, un intervento di questo genere seppure risolutivo richiederebbe costi elevati e un periodo di recupero dell'ordine di alcuni anni, oltre al pericolo di esporre gli esemplari a rischi di danni e infezioni radicali durante la fase di travaso.

Le prove hanno, inoltre, messo in evidenza la scarsa efficacia dei trattamenti fogliari con manganese in forma chelata sia su piante in vaso che in piena terra. Nonostante i trattamenti ripetuti a partire dall'emissione della nuova corona di foglie e fino all'indurimento non è stato ottenuto nessun effetto sulle piante probabilmente a causa della particolare struttura delle foglie di *C. revoluta*. Queste presentano, infatti, una consistenza coriacea già nei primi stadi di sviluppo e sono rivestite da un'epidermide fortemente cutinizzata che non ha permesso al prodotto di essere veicolato all'interno dell'epidermide.

Nelle prove condotte nel secondo anno è stato possibile accertare l'attività dell'endoterapia a pressione in piena terra dimostrando un'efficacia elevata con una percentuale di risanamento del 100% e consentendo di ridurre drasticamente le dosi di microelemento utilizzate. L'iniezione al tronco di manganese in forma chelata risulta risolutiva degli stati carenziali anche in forma grave, ma è necessaria una pressione positiva per spingere la soluzione all'interno del fusto. Infatti, nessun risultato è stato ottenuto attraverso l'impiego del trattamento per assorbimento naturale in conseguenza dell'emissione di mucillagini dai fori di iniezione praticati al fusto.

La maggiore efficacia dell'endoterapia rispetto ai trattamenti radicali è legata alla capacità della soluzione iniettata di diffondere nello stelo in maniera uniforme in

senso radiale e di spostarsi sia in direzione acropeta sia basipeta all'interno della pianta. Ciò è anche dimostrato dalla facilità con cui si muovono soluzioni di safranina nel fusto di diverse specie di *Cycas* così come evidenziato dagli studi di Fisher *et al.* (2009). Il risanamento si presenta velocemente ed è già manifesto nel nuovo getto di foglie dell'anno stesso. Le dosi più basse utilizzate in endoterapia, a confronto con quelle necessarie per trattamenti al suolo mettono in evidenza uno dei principali vantaggi dell'endoterapia rispetto ai trattamenti tradizionali.

Nel corso delle prove in endoterapia è stata osservata la capacità di *Cycas revoluta* di richiudere prontamente le ferite con l'emissione di abbondanti mucillagini in seguito alla perforazione del fusto. Le cellule parenchimatiche vive della corteccia, degli anelli vascolari e della corteccia adiacenti al foro e al tessuto necrotico secondario vanno incontro a mitosi e producono file di cellule perpendicolari alla superficie del foro o delle aree danneggiate. Questa reazione è stata osservata anche in altri casi di danneggiamento meccanico delle piante (Fink, 1999).

Il ruolo delle mucillagini delle *Cycadales* non è stato ben compreso, secondo Norstog e Nicholls (1997) potrebbero servire a sigillare e proteggere la superficie di tessuto danneggiato. Ma le differenze nelle quantità di mucillagini prodotte osservate da Fisher *et al.* (2009) sembra far cadere l'ipotesi di una correlazione tra emissione di mucillagini e reazione alle ferite.

I dati in nostro possesso hanno quindi dimostrato per la prima volta l'efficacia dell'endoterapia attiva per la cura della carenza di manganese che rappresenta quindi una valida alternativa ai trattamenti al terreno in piante in piena terra. Resta da indagare la durata degli effetti del trattamento nel lungo periodo in considerazione del fatto che i dati in letteratura sull'endoterapia per la cura della carenza minerali su agrumi (Thomas e Haas, 1928) e su avocado (Kadman e Cohen, 1973) riportano la necessità di interventi periodici per mantenere lo stato nutrizionale della pianta. In ogni caso, a un anno di distanza dai trattamenti endoterapici, non sono state ancora osservate nuove manifestazioni di carenza.

## 9. CONCLUSIONI

Il lavoro sperimentale svolto nel triennio di dottorato ha consentito di acquisire diverse informazioni sul potenziale uso della tecnica endoterapica per la risoluzione di differenti problematiche su piante ornamentali.

I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare l'efficacia delle applicazioni endoterapiche per la risoluzione della carenza di manganese su *C. revoluta* e per il contenimento di *R. ferrugineus* su *P. canariensis* confermando quanto riportato in letteratura per la cura di carenze (Thomas e Haas, 1928; Kadman e Cohen, 1973) e nei confronti di insetti (McClure, 1992; Young, 2002; Doccola *et al.*, 2003) su differenti specie.

L'impiego dell'endoterapia potrebbe contribuire alla gestione di altre problematiche su differenti ospiti ornamentali. I trattamenti endoterapici, infatti, presentano diversi vantaggi rispetto ai tradizionali trattamenti alla chioma o alle radici specialmente in ambienti pubblici. Essi permettono di ridurre al minimo i rischi derivati dall'immissione nell'ambiente di prodotti con scarsa selettività o con scarsa degradabilità ambientale e rappresentano l'unica alternativa nei casi di patogeni che per la loro localizzazione nell'ospite sono difficilmente raggiungibili. Inoltre, permettono di ottenere un effetto prolungato nel tempo e in alcuni casi necessitano di volumi di soluzione e dosi inferiori rispetto a quelle normalmente utilizzate per i trattamenti tradizionali. A supporto della tecnica non meno importante è la recente normativa Europea sull'uso sostenibile dei pesticidi e delle specifiche norme sul probabile divieto in ambiente pubblico dei trattamenti fogliari o radicali con gli agrofarmaci. Inoltre, la suddetta normativa, a prescindere dalle restrizioni che saranno adottate in ambiente pubblico già impone a partire dal 2014, sempre al fine di ridurre l'utilizzo di agrofarmaci, l'impiego della lotta integrata.

Nonostante i risultati ottenuti mediante trattamenti endoterapici nei confronti di *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* su *P. canariensis*, numerosi sono i successi riportati

in letteratura nei confronti di altri patogeni fungini (Helton e Rohrbach, 1966; Darvas *et al.*, 1984; Idris *et al.*, 2002; Jaynes e VanAlfen, 1974). É importante considerare, infatti, che la scelta di questa tecnica deve essere valutata di volta in volta a seconda della specie da trattare, della molecola impiegata e della specie bersaglio e che i risultati raggiunti possono essere variabili e dipendenti da numerosi altri fattori. Per questo patogeno, in particolare, le prove svolte non devono considerarsi esaustive e sarà opportuno svolgere ulteriori prove sperimentali anche nell'ottica di un uso combinato dei diversi mezzi di lotta oggi disponibili.

## **RINGRAZIAMENTI**

Al Prof. Polizzi per avermi iniziato al mondo della patologia vegetale, per gli stimoli continui concessimi per lo svolgimento della tesi, per avermi insegnato ad affrontare le problematiche fitopatologiche con criticità e professionalità, ma soprattutto per la pazienza. Al Dott. Vitale per l'apporto datomi nella realizzazione della tesi, per i consigli e l'esperienza. Al Dott. Guarnaccia per la disponibilità in qualsiasi momento. Alla Prof.ssa Cirvilleri per la guida nel mio percorso di dottorato.

Infine, vorrei ringraziare la persona che ha permesso tutto questo e senza la quale non avrei potuto completare il mio percorso, collega e compagna di vita la Dott.ssa Dalia Aiello.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbas M.S.T., Hanounik S.B., Mousa S.A., Awash S.A. (2001a). Isolates o entomopathogenic nematodes from Ras Al-Khaima and Al –Fugaira Emirates (UAE). *Egypt. J. Biol. Pest Co.*, 11(1/2): 191.
- Abbas M.S.T., Saleh M.M.E., Akil A.M. (2001b). Laboratory and field evaluation of the pathogenicity of entomopathogenic nematode to the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliv.). *Anz. Schadl.\_J. Pest Sc.*, 74: 167-168.
- Abram V.A., Al-Shuaibi M.A., Falerio J.R., Abozuhairah R.A., Vidyasagar S.P. (1998). An integrated management approach for red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. a key pest of date palm in the Middle East. *SQU J. Sci. Res.-Agr. Sci.*, 3: 77-83.
- Abram N.A., Kurian C. (1975). An integrated approach to the control of *Rhynchophorus ferrugineus*, the red palm weevil of coconut palm. 4<sup>th</sup> session of the FAO Technical working party on coconut production, protection and processing. Kingston, Jamaica, Sept. 1975.

- Aloj B., Garibaldi A. (1984). Gravi attacchi di *Stigmina palmivora* (Saac.) Hughes su *Phoenix canariensis* Hort. in Campania. *Info. Fitop.*, 10: 41-42.
- Amiri A., Bussey K. E., Riley M. B., Schnabel G. (2008). Propiconazole inhibits *Armillaria tabescens* *in vitro* and traslocates into peach roots following trunk infusion. *Plant Dis.*, 92(9): 1293 - 1298.
- Anonimo (2005). Diffusione del punteruolo rosso in Italia. *Info. Agr.*, 30: 74.
- Appel D. N., Kurdyla T. (1992). Intravascular injection with propiconazole in live oak for oak wilt control. *Plant Dis.*, 76: 1120 - 1124.
- Arron G. P. (1986). Effect of trunk injection of flurprimidol and paclobutrazol on sprout growth in silver maple. *J. Arbo.*, 12(9): 233-236 .
- Azam K.M., Razvi S.A. (2001a). Infestation of *Rhynchophorus ferrugineus* in relation to off-shoots on date palm trunk and its management. *In: Proceedings of the Meeting on Rhynchophorus ferrugineus* (abstr.). Muscat (OM).
- Azam K.M., Razvi S.A. (2001b). Control of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier using prophylactic spraying of date palm and trunk injection. Proc. Second International Conference on Date Palms (Al-Ain, UAE, March 25-27, 2001). 216-222.
- Bartlett R. J. (1988). Manganese redox reactions and organic interactions in soils. Pp. 59 – 73. *In: R. D. Graham, R. J. Hannam, N. C. Uren (Eds.), Manganese in soils and plants*. Dordrecht, Olanda: Kluwer Academic Publishers.

- Bieller, J. A. (1991). Injection site wounding when using plant growth regulators. *J. Arbor.*, 17(3): 78 - 79.
- Bork J. (1990). Developmental cycles in shoot growth of male *Cycas circinalis*. *Amer. J. Bot.*, 77: 981–985.
- Broschat T.K., Meerow A.W. (2000). Ornamental palm Horticulture. University Press of Florida, Gainesville, FL.
- Browsers G. J., Vijgenboom E., Corstjens P. L., de Vrind J. P., de Vrind - de Jong E. W. (2000). Bacterial Mn<sup>2+</sup> oxidizing systems and multicopper oxidases: An Overview of mechenisms and functions. *Geomicrobiol. J.*, 17: 1 - 24.
- Brown G. K. (1978). Prototype equipment for commercial pressure - injection of aqueous growth regulators into trees. *J. Arbor.*, 4(1): 7–13 .
- Burnell J. N. (1988). The biochemistry of manganese in plants. Pp. 125 – 137. In: R. D. Graham, R. J. Hannam, e N. C. Uren, *Manganese in soils and plants*. Dordrecht, Olanda: Kluwer Academic Publishers.
- Buxton, P.A., 1920 - Insect pests of dates and the date palm in Mesopotamia and elsewhere. *Bull. Entomol. Res.*, 11: 287-303.
- Campbell L. C., Nable R. O. (1988). Physiological functions of managanese in plants. Pp. 139-154. In: *Manganese in Soils and Plants*. Graham R. J., Hannam, Uren N. C., editore Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Catara V., Greco S., Polizzi G. (2001). L'avvizzimento della Palma delle Canarie da *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis* in Sicilia. VIII Convegno Nazionale SIPaV, Potenza, 3-5 Ottobre 2001 (riassunto).
- Chamberlain C.J. (1935). *Gymnosperms: Structure and evolution*. University of Chicago Press, Chicago, IL [1966 reprint. Dover Publications, New York, NY].
- Corte A. (1973). La tracheomicosi da *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* della *Phoenix canariensis*. *Oss. per le malattie delle piante*, 88-89, 107-117.
- Darrietort G., Lecomte P. (2007). Evaluation of a trunk injection technique to control grapevine wood diseases. *Phytopathol. Mediterr.*, 46: 50-57.
- Darvas J. M., Toerien J. C., Milne D. L. (1984). Control of avocado root rot by trunk injection with phosethyl - Al. *Plant Dis.*, No 68.
- Dehgan B., Durando J. E., Yager T. H. (1994). Symptoms and Treatment of Manganese Deficiency in *Cycas revoluta* Thunb. *Hortic. Sci.*, 29(6), 645 - 648.
- DiTomaso J. M., Kyser G. B. (2007). Control of *Ailanthus altissima* using stem herbicide application techniques. *Arbor. Urb. For.* 33(1), 55 - 63.
- Doccola J. J., Bristol E. J., Sifleet S. D., Lojko J., Wild P. M. (2007). Efficacy and duration of trunk - injected imidacloprid in the management of hemlock woolly adelgid (*Adelges tsugae*). *Arbor. e Urb. For.*, 33(1): 12 - 21.

- Doccola J. J., Wild P. M., Ramasamy I., Castillo P., Taylor C. (2003). Efficacy of arborjet viper microinjection in the management of hemlock woolly adelgid. *J. Arbor.*, 29(6): 327 - 330.
- Elawad S. A., Mousa S. A., Shahbad A. S., Alawaash S. A., Alamiri A. M. A. (2008). Efficacy of entomopathogenic nematodes against Red Palm Weevil in UAE. ISHS *Acta Hort.* 736: III International Date palm Conference.
- El-Ezaby F. (1997). A biological in-vitro study on the red Indian date palm weevil. *Arab J. Plant Protec.*, 15(2): 84-87.
- Elliott M.L., Broschat T.K., Uchida J.Y., Simone G.W. (2004). Introduction. *In: Compendium of ornamental palm diseases and disorders*. The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota, pp. 1-4.
- EPPO Bulletin (2007). *Rhynchophorus ferrugineus* and *Rhynchophorus palmarum*. EPPO/OEPP Bulletin, 37(3): 571-579.
- Erlich H. L. (1996). Geomicrobiology of manganese. Pp. 388 – 488. *In: Geomicrobiology: 3rd edition*. New York: Marcel Dekker.
- Evans I. R., Solberg E., Huber D. M. (2001). Deficiency disease. Pp. 295 – 301. *In: O. C. Maloy, e T. D. Murray(Eds.), Enc. Plant Pathol.*, New York: John Wiley e Sons.
- Ferry M., Gomez S. (2002). The red palm weevil in the Mediterranean area. *Palms* 46(4): 172-178.
- Filer T. H. (1973). Pressure apparatus for injecting chemicals into trees. *Plant Dis. Rep.*, 57(4): 338 - 341.

- Fink S. (1999). Pathological and regenerative plant anatomy. Handbuch der Pflanzenanatomie Band 14, Teil 6. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Germany.
- Fisher J.B., T.E. Marler. (2006). Eccentric growth but no compression wood in horizontal stem of *Cycas micronesica* (Cycadales). *Intl. Assoc. Wood Anat. J.*, 27:377–382.
- Fisher J. B., Lindström Anders, Marler Thomas E. (2009). Tissue responses and solution movement after stem wounding in six *Cycas* species. *HortScience*, 44(3): 848 – 851.
- Garbellotto M., Schmidt D. J., Harnik T. Y. (2007). Phosphite injections and bark application on phosphite + pentrabark control sudden oak death in coast live oak. *Arbor. Urb. For.* 33(5): 309 - 317.
- Garibaldi A., Rapetti S. (1987). Alcune malattie delle piante da fronda verde. Atti del Convegno “Il verde come complemento al fiore reciso”. Padova, 8 Giugno 1987. *Flortecnica suppl. al n. 7/87*, XLI-XLIV.
- Ghiorse W. C. (1988). The biology of manganese transforming microorganisms in soil. Pagine 75 – 85. In Graham R. D., Hannam R.J., Uren N. C. *Manganese in soils and Plants*. Dordrecht, Olanda: Kluwer Academic Publishers.
- Gilkes R. J., McKenzie R. M. (1988). Geochemistry of manganese in soil. Pp. 23 – 35. In: Graham R. D., Hannam R. J., Uren N. C. (Eds.), *Manganese in soils and plants*. Olanda: Kluwer Academic Publishers

- Gill S., Jefferson D. K., Reeser R. M., Raupp M. J. (1999). Use of soil and trunk injection of systemic insecticides to control lace bug on hawthorn. *J. Arbor.*, 25(1): 38 - 42.
- Gomez Vives S., Muoz Irlles C., Ferry M., Martinez M. M. (2008). Primeros resultados sobre el uso de *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinermermatidae) asociado a quitosano para el control de *Rynchophorus ferrugineus*, Olivier en palmeras datileras. *Bol. San. Veg. Plagas*, 34: 147-149.
- Greguss P. (1968). Xylotomy of the living cycads. Akade'miai Kiado', Budapest, Hungary.
- Guest D. I., Anderson R. D., Foard H. J., Phillips D., Worboys S., Middleton R. M. (1994). Long-term control of *Phytophthora* diseases of cocoa using trunk-injected phosphonate. *Plant Pathol.*, 43: 479-492.
- Harrell M. (2006). Imidacloprid concentration in green ash (*Fraxinus pennsylvanica*) following treatments with two trunk - injection methods. *Arbor. Urb. For.*, 32(3), 126 - 129.
- Helburg L. B., Schomaker M. E., Morrow R. A. (1973). A new trunk injection technique for systemic chemicals. *Plant Dis. Rep.*, Vol. 57 No 6, 513 - 514.
- Helson B. V., Lyons B. D., Wanner K. W., Scarr T. A. (2001). Control of conifer defoliators with neem - based systemic bioinsecticides using a novel injection device. *Can. Entomol.*, 133: 729 - 744.

- Helton A. W., Rohrbach K. G. (1966). Translocation of twelve fungicidal compounds injected into trees of *Prunus domestica*. *Phytopatology*, 56: 933 - 939.
- Hernández-Marante D., Folk F., Sánchez A., Fernández Escobar R. (2003). Control del curculiónido ferruginoso de las palmeras (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier) mediante inyecciones al tronco y pulverización foliar. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29: 563-574.
- Howard F.W. 2001. Insect pests of palms and their control. *Pesticide Outlook*, 2001: 240-243.
- Idris A. S., Ismail S., Ariffin D., Ahmad H. (2002). Control of Ganoderma infected palm. Development of pressure injection and field applications. [http: //mpob.gov.my](http://mpob.gov.my). *Malaysian Palm Oil Board* No. 131.
- James R., Tisserat N., Todd T. (2006). Prevention of pine wilt of scots pine (*Pinus sylvestris*) with systemic abamectn injections. *Arbor. Urb. For.* 32(5), 195 - 201.
- Jaynes R. A. e Van Alfen N. K. (Novembre 1974). Control of American Chestnut Blight by trunk injection with methyl - 2 - Benzimidazole Carbamate (MBC). *Phytopatological Notes*, 64: 1479 - 1480.
- Jones D. L. (1993). *Cycads of the world*. Editore Reed books.
- Jones T. W., Gregory G. F. (1971). An apparatus for pressure injection of solutions into trees. *USDA Forest Service Research Paper*, NE - 233, 1 - 7.

- Kaakeh W. 2006. Toxicity of imidacloprid to developmental stages of *Rhynchophorus ferrugineus* (Curculionidae: Coleoptera): Laboratory and field tests. *Crop Prot.*, 25: 432-439.
- Kadman A., Cohen A. (1973). A rapid method for curing chlorotic avocado trees. *California Avocado Society 1973 - 74 Yearbook*, No 57, pp. 159 - 165.
- Khan A.J., Azam K.M., Razvi S.A. 2001. Pesticide residues analysis of date palm fruits by gas chromatography mass spectrophotometry. Proc. Second International Conference on Date Palms (Al-Ain, UAE, March 25-27, 2001). 211-215.
- Koehler C. S., Campbell R. L. (1968). Trunk - implanted systemics for control of foliage insects on shade trees in California. *J. Econ. Entomol.*, 61(3): 778 - 783.
- Kusunoki M., Hanada K., Iwaki M., Chang M. U., Doi Y., Yora K. (1986). *Cycas Necrotic Stunt Virus*, a New Member of Nepoviruses Found in *Cycas revoluta* Host Range, Purification, Serology and some other properties. *Ann. Phytop. Soc. Japan*, 52(2): 302 - 311.
- La Loggia G., Filardo G., Maltese A., Capodici F., Tulone M. (2008). Misure termografiche da pallone aerostatico per la diagnosi precoce di attacchi da Punteruolo rosso delle palme. *La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri litofagi delle palme in Sicilia*. Vol. 1: 113-118.

- Lee S. B., Milgroom M. G., Taylor J. W. (1988). A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Gen. Newsl.*, 35: 23-24.
- Longo S., Tamburino V. (2005). Gravi infestazioni di punteruolo rosso della palma. Segnalazione in Sicilia. *Inf. Agr.*, 61: 73-74.
- Lopes S. A., Teixeira D. C., Fernandes N. G., Ayres A. J. (2005). An experimental inoculation system to study citrus - *Xylella fastidiosa* interactions. *Plant Dis.* 89(3): 250 - 254.
- Lo Bue P., Caldarella C. G., Sala A., Chiabrando F., Grisafi F., La Mantia G., Musacchia D., Lo Verde G., Peri E., Colazza S. (2008). Impiego dei nematodi entomopatogeni in ambiente urbano per il controllo del Punteruolo rosso. *La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri litofagi delle palme in Sicilia*. Vol. 1: 161-163.
- Manichini B., Lo Bue P., Peri E., Colazza S. (2008). Indagini di laboratorio sulla patogenicità di *Bacillus thuringiensis* nei confronti del Punteruolo rosso delle palme. *La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri litofagi delle palme in Sicilia*. Vol. 1:169-172.
- Mathen K., Kurian C. (1967). Insecticidal trials against *Rhynchophorus ferrugineus* the coconut weevil. *Indian J. of Agr. Sci.*, 37: 231-235.
- McClure M. S. (1992). Effects of implanted and injected fertilizers on the survival of *Adelges tsugae* (Homoptera: Adelgidae) and on the growth of *Tsuga Canadensis*. *J. Econ. Entomol.* 85 (2): 468 - 472.

- McCoy R. E. (1977). Petiole injection of coconut palm, a method to prevent permanent trunk injury during antibiotic treatment for lethal yellowing. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 90: 114 - 117.
- Mercier S., Louvet J. (1973). Recherches sur les fusarioses. Une fusariose vasculaire (*Fusarium oxysporum*) du palmier des Canaries (*Phoenix canariensis*). *Ann. Phytopathology*. 5 : 203-211.
- Migheli Q., Balmas V., Muresu M., Otgianu L., Fresu B. (2005). First report of *Fusarium oxysporum* f.sp. *canariensis* causing Fusarium wilt on *Phoenix canariensis* in Sardinia, Italy. *Plant Dis.*, 89(7): 773.
- Muthuraman M. (1984). Trunk injection of undiluted insecticides—A method to control coconut red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Fab. Indian Coconut J.*, 15: 12–14.
- Neely D. (1988). Tree wound closure. *J. Arb.*, 14(6): 148 - 152.
- Niklas K.J., Cobb E.D., Marler, T. (2006). A comparison between the record height-to-stem diameter allometries of pachycaulis and leptocaulis species. *Ann. Bot. (Lond.)*, 97:79–83.
- Niklas K.J., T.E. Marler. (2008). Sex and population differences in the allometry of an endangered cycad species, *Cycas micronesica* (Cycadales). *Intl. J. Plant Sci.* 169: 659–665.
- Nirula K.K. (1956). Investigations on the pests of coconut palm. Part. IV, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Indian Coconut J.*, 10: 38-44.

- Norstog K.J., Nicholls T.J. (1997). The biology of the cycads. *Cornell University Press*, Ithaca, NY.
- Norvel W. A. (1988). Inorganic reactions of manganese in soils. Pp. 37 – 58. In R. D. Graham, R. J. Hannam, e N. C. Uren, *Manganese in soils and plants*. Dordrecht, Olanda: Kluwer Academic Publishers.
- Nyland G., Moller W. J. (1973). Control of pear decline with a tetracycline. *Plant Dis. Rep. Vol. 57 No 8*, 634 - 637.
- Perry T. O., Santamour F. S., Stipes R. J., Shear T., Shigo A. L. (1991). Exploring alternatives to tree injection. *J. Arb.*, 17(8): 217 - 226.
- Pinkas Y., Shabi E., Solel Z., Cohen A. (1973). Infiltration and translocation of thiabendazole in apple trees by means of pressure injection technique. *Phytopathology*, 63: 1166 - 1168.
- Plyler T. R., Simone G. W., Fernandez D., Kistler H. C. (1999). Rapid detection of the *F. oxysporum* lineage containing the Canary Island Date Palm wilt pathogen. *Phytopathology*, 89: 407-413.
- Polizzi G. (1994a). Disseccamenti fogliari di *Cycas revoluta* da *Phoma glomerata*. *Tec. ag.*, 4: 4-6.
- Polizzi G. (1994b). Casi di carenza di manganese in piante di *Cycas revoluta*. *Inf. Fitopat.*, 12: 39-43.
- Polizzi G. (1995a). Le fitopatie della *Cycas revoluta*. *Inf. Fitopat.*, 12: 27-33.

- Polizzi G. (1995b). Osservazioni su gravi alterazioni delle foglie di *Cycas revoluta*. *Inf. Fitopat.*, 6: 55-58.
- Polizzi G. (2000). Diffusione del marciume rosa causato da *Gliocladium vermoeseni* in palme ornamentali. *Inf. Fitopat.*, 12: 50-56.
- Polizzi G., Grasso, S. (1994). Una moria di *Cycas revoluta* da *Fusarium solani*. *Inf. Fitopat.*, 10: 48-51.
- Reid T.C., Hausbeck M.K., Kizilkaya K. (2002). Use of fungicides and biological controls in the suppression of *Fusarium* crown and root rot of asparagus under greenhouse and growth chamber conditions. *Plant Dis.* 86: 493-498.
- Reil W. O. (1979). Pressure - injecting chemicals into trees. *Calif. Agr.*, 16 – 19.
- Reil W. O., Beutel J. A., Hemstreet C. L., Seyman W. S. (1978). Trunk injection corrects iron and zinc deficiency in pear trees. *Calif. Agr.*, 22 – 23.
- Römheld V., Marschner H. (1991). Function of micronutrients in plants. Pp. 297 – 328. In J. J. Mortvedt, F. R. Cox, L. M. Shuman, e R. M. Welch, *Micronutrients in agriculture*. Madiso, Wisc.: Soil Science Society of America.
- Rumbold C. (1915). Methods of injecting trees. *Phytopathology*, 5: 225 - 229.
- Ruzin S.E. (1999). Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press, New York, NY.

- Sacchetti P., Camèra A., Granchietti A., Rosi M. C., Marzialetti P. (2005). Prima segnalazione in Italia del curculionide delle palme, *Rhynchophorus ferrugineus*. Ce.Spe.Vi. – Pistoia.
- Sacchetti P., Camèra A., Granchietti A., Rosi M. C., Marzialetti P. (2005). Identificazione. Biologia e diffusione del curculionide delle palme, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). *Inf. Fitopat.*,20(6): 35-40.
- Saleh M. M. E., Alheji M. (2003). Biological control of red palm weevil with entomopathogenic nematodes in the eastern province of Saudi Arabia. *Egyptian J. Biol. Pest Co.*, 13 (1/2): 55-59.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. A. (1989). Molecular cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez - Zamora M. A., Fernández - Escobar R. (2004). Uptake and distribution of trunk injections in conifers. *J. Arb.* 30(2), 73 - 79.
- Sánchez-Zamora M.A., Fernández-Escobar R. (2000). Injector-size and the time of application affects uptake of tree trunk-injected solutions. *Scientia Hortic.* 84(1-2): 163-177
- Shamseldean M. M., Atwa A. A. (2004). Virulence of Egyptian steinernematid nematodes used against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliv.). *Egyptian J. Biol. Pest Co.*, 14(1): 135-140.
- Schimmenti E., Di Trapani A.M., Di Franco C.P. & Carapezza R. (2007). Il Meridione nel florovivaismo ha un ruolo di primo attore. *Inf. Agr.* (47): 41-47.

- Schimmenti E., Ascuito A., Galati A. & Carapezza R. (2008). La competitività del comparto florovivaistico delle regioni del mezzogiorno sul mercato internazionale. XVI Meeting SIEA. Trieste, Italy, June 5-6, 2008.
- Schreiber L. R. (1969). A method for the injection of chemicals into trees. *Plant Dis. Rep.*, 53(9): 764 - 765.
- Schulte M. J., Martin K., Sauerborn J. (2006). Effects of azadirachtin in litchi trees (*Litchi chinensis* Sonn.) on the litchi stink bug (*Tessarotoma papillosa* Drury) in northern Thailand (solo Abstract). *J. Pest Sci.*, 79: 241 - 250.
- Schwarz R. E., Van Vuuren S. P. (1971). Decrease in fruit greening of sweet orange by trunk injection of tetracyclines. *Plant Dis. Rep.*, 55: 747 – 750.
- Shigo A.L. 1984. Compartmentalization: A conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 22: 189–214.
- Shigo A. L., Shortle W., Garret P. (1977). Compartmentalization of discolored and decayed wood associated with injection-tube wounds in hybrid poplar. *J. Arb.*, 3(6): 114 - 118.
- Siclair W. A., Larsen A. O. (1981). Wood characteristics related to “injectability” of trees. *J. Arb.*, 7(1): 6 – 10.
- Simone G.W., Cashion G. (1996). Fusarium wilt of Canary Island Date Palms in Florida. *Landscape and Nursery Digest*, May 1996, 28-31.
- Sperry J.S. 1986. Relationship of xylem embolism to xylem pressure potential, stomatal closure,

and shoot morphology in the palm *Raphis excelsa*. *Plant Physiol.*, 1986. 80: 110-116.

Sporne K.R. (1965). The morphology of gymnosperms. Hutchinson University Library, London, UK.

Stevenson D.W. (1980). Radial growth in the *Cycadales*. *Amer. J. Bot.*, 67:465–475.

Strasburger E. (1998). Trattato di botanica – Volume 2, Sistematica e geobotanica. Editore Gustav Fischer Verla.

Suma P., Longo S. (2008). Applicazioni di termografia, endoscopia ed analisi indiretta per la diagnosi precoce degli attacchi di Punteruolo rosso. *La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri litofagi delle palme in Sicilia*. Vol. 1: 103-106.

Tattar T. A., Tattar S. J. (1999). Evidence for the downward movement of materials injected into trees. *J. Arb.*, 25(6), 325 - 332.

Tebo B. M., Ghiorse W. C., van Waasbergen L. G., Seiring P. L., Caspi R. (1997). Bacterially mediated mineral transformation: Insights into manganese (II) oxidation from molecular genetic and biochemical studies. Pp. 225 – 260. In J. F. Banfield, K. H. Nealson, *Geomicrobiology: interactions between microbes and minerals* . Washington D.C.: Mineralogical Society of America.

Terrazas T. (1991). Origin and activity of successive cambia in *Cycas* (*Cycadales*). *Amer. J. Bot.*, 78: 1335–1344.

- Thomas E. E., Haas A. R. (1928). Injection method as a means of improving chlorotic orange trees (solo Abstract). *Bot. Gaz.*, 86: 355 - 362.
- Tinker P. B. (1986). Trace elements in arable agriculture. *J. Soil. Sci.*, 37: 587 - 601.
- Tonzig S., Marrè, E. (1983). Botanica generale, morfologia e fisiologia vegetale - Volume I. Milano: Casa Editrice Ambrosiana Milano.
- Tuttobene R., Pennisi A.M. (1987). Alcune malattie fogliari di palme ornamentali. *La difesa delle piante*, 10: 293-300.
- Uhl N.A., Dransfield J. (1987). *Genera Palmarum*. Allen Press, Lawrence, KS.
- Vai N. (2000). Endoterapia: una tecnica fitoiatrica a basso impatto ambientale. *Inf. Fitopat.*, 12:15 - 18.
- Vitale A., Leone V., Torta L., Burruano S., Polizzi G. (2008). Prove preliminari di lotta biologica con *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* nei confronti del Punteruolo rosso. *La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri litofagi delle palme in Sicilia*. Vol. 1:169-172.
- Wattanapongsiri A. (1966). A revision of the genera *Rhynchophorus* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae). Department of Agriculture Science Bull., Bangkok, 1: 1-328.
- Whiley Anthony W., Saranah Jack B., Langdon Peter W., Hargreaves P. A., Pegg K. G., Ruddle L. J. (1992). Timing of Phosphonate Trunk Injections for *Phytophthora* Root Rot Control in Avocado Trees. *Second World Avocado Congress*, (p. 7).

Yoshikawa T., Reil Wilbur O., Stromberg Leslie K. (1982). Trunk injection corrects iron deficiency in plum trees. *Cal. Agr.*, 36(2): 13-13.

Young L. C. (2002). The efficacy of micro - injected imidacloprid and oxydemeton - metyl on red gum eucalyptus trees (*Eucalyptus camaldulensis*) infested with red gum lerp psyllid (*Glycaspis brimblecombei*). *J. of Arb.*, 28(3): 144 - 147.