



Le «macchie brune» del nocciolo nel Viterbese: indagine sulla microflora batterica non anaerobica associata

Marco Scortichini* - Paola Di Prospero - Maria Pia Rossi

RIASSUNTO

Nel corso di sopralluoghi effettuati nel periodo 1999-2001 in aziende corilicole situate nei colli Cimini (VT), è stato possibile osservare il fenomeno delle «macchie brune» a carico del tronco e delle branche principali. Mensilmente sono stati effettuati prelievi dai tessuti interessati dall'alterazione al fine di isolare, possibilmente identificare la microflora batterica non strettamente anaerobica e verificarne l'eventuale ruolo patogenetico. *Pantoea agglomerans* è stata la specie maggiormente rinvenuta durante tutte le stagioni. *Bacillus* sp. è stato rinvenuto frequentemente associato agli essudati acquosi fuoriuscenti dalle «macchie brune» in primavera. Altre due specie rinvenute occasionalmente, non sono state identificate. Tutte le tipologie batteriche ottenute sembrano non rivestire alcun ruolo patogenetico e due anni dopo la comparsa delle «macchie brune», le piante hanno cicatrizzato i tessuti interessati dall'alterazione. Le piante colpite non sono mai avvizzite nei tre anni di osservazioni. Questo studio conferma quanto osservato in precedenza in Piemonte circa la natura abiotica del fenomeno.

PAROLE CHIAVE:

Nocciola, fattori abiotici, patogenicità, *Pantoea*, *Bacillus*.

SUMMARY

The "brown spot" of hazelnut: investigation on the non anaerobic bacterial microflora. During surveys carried out on 1999-2001 in the province of Viterbo (Latium, central Italy), it has been possible to observe the so called "brown spots" along the branches and trunk of hazelnut trees. In order to isolate, possibly identify and to ascertain the pathogenic role of non anaerobic bacterial microflora, samples from symptomatic trees were taken monthly. *Pantoea agglomerans* was the species more frequently recovered in all seasons. In addition, *Bacillus* sp. was frequently

found associated with bacterial exudates oozing out the spots during spring. Two other species occasionally found, have not been identified. However, all isolates representing all the non anaerobic bacterial microflora associated with the "brown spots" do not show pathogenicity. Moreover, two years after the appearance of "brown spots", most of the trees healed the tissues. All tree showing this syndrome resulted alive over the three years. This study confirms previous investigations carried out in Piedmont pointing out the "brown spots" as an abiotic syndrome.

KEY WORDS:

Hazelnut, abiotic factors, pathogenicity, *Pantoea*, *Bacillus*.

Introduzione

L'alterazione del nocciolo (*Corylus avellana* L.) denominata «macchie brune», fu segnalata per la prima volta in Piemonte nel 1971 (Pesante, 1973). Negli anni successivi, il fenomeno si estese (Gianetti *et al.*, 1983) e, in annate particolari, come quelle dei primi anni ottanta e nel 1991, fu riscontrata su numerosi ettari del comprensorio corilicolo delle Langhe (Scapin *et al.*, 1994). La cultivar maggiormente interessata dall'alterazione fu la Tonda Gentile delle Langhe.

Durante i sopralluoghi effettuati nel corso degli ultimi anni al fine di verificare l'estensione della «moria» del nocciolo causata da *Pseudomonas avellanae* (Psallidas) Janse *et al.* (Scortichini *et al.*, 2002), sono stati notati, in provincia di Viterbo, sulle cultivar Tonda Gentile Romana e

Nocchione, sintomi simili a quelli descritti per le «macchie brune» in Piemonte.

Le alterazioni interessano prevalentemente le branche principali e/o il tronco. Ad uno stadio iniziale, le «macchie brune» si rendono evidenti come piccole aree superficiali di colore bruno scuro interessanti il tessuto corticale. Successivamente, le macchie ingrandiscono ed assumono una forma tendenzialmente circolare, dal diametro variabile tra i 2-3 e i 7-8 cm. In alcuni casi, le macchie possono confluire interessando porzioni ampie della corteccia. Soprattutto in primavera, ma talvolta anche in estate e in autunno, si assiste alla fuoriuscita di essudati acquosi. Asportando la corteccia, si evidenziano imbrunimenti dei tessuti sottostanti che, solitamente, interessano aree sottocorticali più estese di quelle evidenziate dalle macchie. L'anno successivo, la corteccia inizia a screpolarsi, diminuisce l'emissione di essudato, e, nella maggior parte dei casi, dopo 1-2 anni, la pianta finisce col rimarginare l'area. In tutto il periodo che va dalla comparsa delle macchie alla cicatrizzazione, generalmente, la parte aerea non manifesta sindromi patologiche evidenti (avvizzimenti fogliari o dei rami). Ad un esame superficiale, il fenomeno delle «macchie brune» può essere confuso con la «moria» da *P. avellanae*.

Al fine di verificare se la microflora batterica non strettamente anaero-

Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Roma

* L'autore è nei ruoli dell'Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale di Roma, temporaneamente distaccato presso l'ISF

bica fosse responsabile delle “macchie brune” del nocciolo, sono stati effettuati studi volti ad isolare, identificare e chiarire l’eventuale ruolo patogenico delle specie batteriche aerobiche o facoltativamente anaerobiche associate. Il presente lavoro ne riassume i risultati.

Materiali e metodi

Isolamenti

Dall’autunno 1999 alla primavera 2001, porzioni di tessuto corticale e sottocorticale ottenute dai margini delle macchie, sono state prelevate in modo sterile, mensilmente, da alberi di nocciolo in piena produzione delle cultivar Tonda Gentile Romana e Nocchione, situati nei comuni di Capranica e Vetralla (VT), mostranti i sintomi iniziali dell’alterazione sopra descritta. Frammenti di tessuto sono stati macerati in mortai sterili contenenti alcuni ml di soluzione fisiologica (0,85% di NaCl in acqua distillata) sterile (SFS). Sono state allestite anche diluizioni decimali in tubo. Dopo

alcuni minuti, aliquote di 0,1 ml delle sospensioni sono state piastrate sui seguenti substrati: agar nutritivo (NA), agar nutritivo aggiunto del 5% di saccarosio (ANS) e substrato B di King *et al.* (KB). Le piastre venivano incubate a 25-27 °C per 2-4 giorni. Ad ogni isolamento venivano prelevate le colonie rappresentative di tutti i tipi morfologici individuati. Le colonie venivano strisciate in purezza su AN per effettuare i successivi saggi.

Saggi biochimici e nutrizionali

Con gli isolati batterici ritenuti rappresentativi dei vari isolamenti, sono stati effettuati saggi biochimici e nutrizionali di cui alla tabella 1, volti alla loro identificazione secondo le metodologie descritte da Lelliott e Stead (1987).

Confronto dei profili proteici

Al fine di confermare l’identità delle specie batteriche più frequentemente riscontrate, sono state estratte le proteine solubili totali degli isolati. Dopo corsa elettroforetica mono-

dimensionale (SDS-PAGE), i profili sono stati confrontati con quelli di alcuni ceppi di riferimento di *Pantoea agglomerans* (Beijerinck) Gavini *et al.* (Sinonimi: *Erwinia herbicola* (Lohins) Dye; *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck) Ewing e Fife) PD 525, *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* (Jones) Hauben *et al.* (sinonimo: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey *et al.*) PD 1769, *Brenneria nigrifluens* (Wilson *et al.*) Hauben *et al.* (Sinonimo: *Erwinia nigrifluens*, Wilson *et al.*) PD 968 e *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn NCPPB 1246.

Prove di patogenicità

Al fine di verificare l’eventuale patogenicità degli isolati di ognuna delle quattro tipologie, sono state effettuate inoculazioni artificiali su piante di nocciolo cv. Tonda Gentile Romana e Nocchione di 4 anni, allevate in vaso. A tale scopo, le colture batteriche (tre isolati per ogni tipologia), accresciutesi per 48 ore su AN, sono state sospese in SFS fino a raggiungere una concentrazione corrispondente a 1-2 x 10⁷ u.f.c./ml. Sono state adottate due tecniche di inoculazione. In un caso, con un bisturi sterile sono state praticate ferite longitudinali di circa 1 cm lungo la parte basale del tronco e immediatamente dopo, sono state deposte su di esse alcune gocce della sospensione batterica; nel secondo, con il bisturi sterile sono stati sollevati di alcuni millimetri i tessuti corticali e gocce della sospensione sono state deposte al disotto del taglio. Per ogni isolato sono state inoculate quattro piante per cultivar. Piante controllo sono state inoculate seguendo le stesse modalità con sola SFS. I reisolamenti sono stati effettuati a partire da sei mesi dopo l’inoculazione con le modalità descritte in precedenza.

Risultati

Isolamenti

Colonie batteriche sono state isolate in tutti i mesi dell’anno su AN, ANS e KB, tuttavia, non sono mai state rinvenute colonie fluorescenti

Tab. 1 - Saggi biochimici e nutrizionali effettuati con gli isolati delle diverse tipologie (A,B,C e D), ottenuti dalle “macchie brune” del nocciolo nel Viterbese.

	A	B	C	D
Reazione di Gram	-	+	-	-
Presenza di ossidasi	-	-	-	+
Presenza di catalasi	+	+	+	+
Ipersensibilità in tabacco	-	-	-	-
Marciume della patata	-	-	-	-
Pigmenti gialli su AN		+	-	-
Pigmenti aranciati su AN	-	-	-	+
Riduzione dei nitr	+	+	-	-
Idrolisi dell’amido	-	+	+	-
Liquefazione della gelatina	+	+	-	-
Tolleranza al 7% di NaCl	-	+	-	-
Crescita a 37°C	+	+	-	-
Sopravvivenza a 80°C	-	+	-	-
Utilizzazione di:- citrato	+	+	+	-
- malonato	+	+	-	-
Produzione di acidità da:- glicerolo	-	+	+	+
- cellobiosio	+	+	+	-
- maltosio	+	+	-	-
- melibiosio	-	-	-	-
- salicina	-	-	-	-

AN: agar nutritivo.



Fig. 1 - Evoluzione delle "macchie brune" sul tronco di nocciolo. (Le foto si riferiscono ad uno stesso albero.) a) Comparsa delle "macchie brune" a fine estate-autunno. b) Fuoriuscita di essudati acquosi nella primavera successiva. c) In autunno, inizio della cicatrizzazione dei tessuti interessati dall'alterazione. d) Due anni dopo la comparsa dei primi sintomi, l'albero ha completamente cicatrizzato l'area interessata.

su KB. Colonie circolari, a margine intero, di colore giallo chiaro su AN (tipologia A), sono risultate quelle rinvenute con maggiore frequenza, soprattutto come numerosità nelle

single piastre di isolamento. Colonie di questa tipologia sono state ottenute ad ogni isolamento. Soprattutto nei mesi primaverili (aprile-giugno), sono state rinvenute anche co-

lonie di colore bianco-crema su AN (tipologia B), non elevate, a margine ondulato e irregolare. Inoltre, sono state ottenute colonie circolari, di colore bianco crema, a margine intero su AN (tipologia C) nonché colonie di colore giallo intenso e aranciato, circolari, a margine intero su AN (tipologia D). Queste ultime due tipologie, sono state rinvenute occasionalmente nel corso degli isolamenti effettuati. Ad ogni isolamento, colonie rappresentative delle morfologie osservate sono state selezionate e conservate in purezza per l'effettuazione dei saggi biochimici e le prove di patogenicità. Per ogni tipologia sono stati prescelti cinque isolati.

Saggi biochimici e nutrizionali

I risultati dei saggi biochimici e nutrizionali per le tipologie delle colonie batteriche rinvenute, sono riportati in tabella 1. Gli isolati della tipologia A hanno mostrato notevole similitudine con *P. agglomerans* mentre quelli appartenenti alla tipologia B sono da ritenere appartenenti al gruppo di *Bacillus* spp. Di incerta collocazione sono gli isolati delle tipologie C e D e la loro identificazione necessita di ulteriori saggi.

Confronto dei profili proteici

Il confronto dei profili proteici, effettuato dopo corsa elettroforetica monodimensionale, ha evidenziato una notevole similarità tra *P. agglomerans* PD 525 e gli isolati appartenenti alla tipologia A e tra *B. subtilis* e gli isolati della tipologia B. Le altre tipologie batteriche, si discostavano notevolmente dai profili di *P. agglomerans*, *P. carotovorum*, *B. nigri-fluens* e *B. subtilis*. Sulla base dei saggi biochimici e nutrizionali nonché dal confronto dei profili proteici, si ha motivo di ritenere che gli isolati della tipologia A appartengano a *Pantoea agglomerans* mentre quelli della tipologia B a *Bacillus* sp. Per gli isolati delle tipologie C e D sono in corso ulteriori saggi identificativi al fine di arrivare ad una corretta identificazione.

Prove di patogenicità

Nessuno degli isolati appartenenti alle quattro tipologie ha riprodotto, anche parzialmente, sintomi assimilabili alle "macchie brune". Infatti, anche dopo sei mesi dalle inoculazioni non sono mai stati osservati sintomi apprezzabili né presenza di essudati e/o progressione di infezioni. Si esclude, pertanto, il coinvolgimento diretto degli isolati oggetto del presente studio alle "macchie brune".

Conclusioni

Le indagini effettuate hanno consentito di accertare una frequente associazione di alcune specie batteriche aerobiche o facoltativamente anaerobiche al fenomeno delle "macchie brune" del nocciolo nel Viterbese. Anche in Piemonte, Gianetti *et al.* (1983) trovarono "ripetutamente, in stagioni diverse", due specie batteriche bastoncellari, Gram-negative associate ai tessuti legnosi interessati dal fenomeno, anche se studi successivi consentirono di escludere la responsabilità di agenti patogeni nel fenomeno delle "macchie brune" in Piemonte (Scapin *et al.*, 1994). *P. agglomerans* è risultata la specie maggiormente presente sia durante la stagione vegetativa sia durante il riposo invernale. Tuttavia, il suo ruolo patogenetico è risultato nullo. Questa specie si trova frequentemente associata ai tessuti vegetali (Coplin e Kado, 2001). In Italia, è stata rinvenuta in tessuti legnosi di cerri (*Quercus cerris* L.) deperienti dell'Italia centrale (Scortichini *et al.*, 1993). Alcuni ceppi di *P. agglomerans*, inoltre, sono utilizzati nella lotta biologica contro *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* *Bacillus* spp. sono altri colonizzatori delle "macchie brune" nel Viterbese, sia pure in minor misura della specie precedente. Anche in questo caso esse non rivestono un ruolo patogenetico primario. È interessante far notare che *B. cereus* fu isolato in primavera da essudati fuoriuscenti da alberi di cerro deperienti (Scortichini e Stead, 1993). Alcuni isolati rimangono da identificare a livello di specie e, al pari delle altre,

non sembrano essere responsabili delle "macchie brune". Lo studio effettuato ha anche consentito di escludere la presenza di pseudomonadi fluorescenti fitopatogene associate alle "macchie brune" del nocciolo. Infatti, non sono mai stati isolati né *P. avellanae* né *P. syringae* pv. *syringae* van Hall. Studi per verificare l'eventuale presenza di specie batteriche strettamente anaerobiche associate alle "macchie brune" verranno intrapresi in futuro.

Per quanto riguarda l'insorgenza delle "macchie brune" del nocciolo, il presente studio conferma gli studi e le ipotesi avanzate da Gianetti *et al.* (1983) e Scapin *et al.* (1994) sul ruolo dei fattori abiotici quali fattori predisponenti l'alterazione. Nelle aree del Viterbese oggetto dello studio, sono frequenti gelate primaverili nonché periodi siccitosi estivi, a volte molto prolungati che potrebbero interferire con il metabolismo dell'albero. È stato, infatti, osservato nelle Langhe (Scapin *et al.*, 1994) e in alcune aree del Viterbese che le "macchie brune" non compaiono negli impianti che praticano l'irrigazione. Una simile osservazione è stata fatta anche per le "macchie brune" del pioppo (Anselmi, 1979). Potrebbe, quindi, esistere uno stretto legame tra annate particolarmente asciutte ed insorgenza del fenomeno. Anche uno stato di sofferenza dell'albero legato a svariate cause (distanza d'impianto ridotta, suolo compatto, notevole età della pianta) può rendere l'alterazione più estesa (Scapin *et al.*, 1994). Nei casi da noi osservati, in effetti, è stato interessante rilevare come, alla rimozione di alcune piante limitrofe, le "macchie brune" siano state circoscritte dall'albero che, in circa due anni, ha cicatrizzato completamente la parte interessata dall'alterazione.

In precedenza (Aloj *et al.*, 1987), i sintomi peculiari delle "macchie brune" sono stati descritti e menzionati tra quelli caratterizzanti la "moria" del nocciolo nel Viterbese. Tuttavia, negli alberi colpiti da "moria" si possono osservare cancri longitudinali e aree corticali più o meno depresse causati da *P. avellanae*. Inoltre, le

piante colpite dal cancro batterico muoiono o avvizziscono parzialmente mentre gli alberi mostranti solo "macchie brune" continuano a vegetare e produrre. È evidente che si tratta di due quadri sintomatologici ben distinti a cui sono associate microflorie batteriche diverse.

Ringraziamenti

Lavoro svolto nell'ambito di una borsa di studio del Consiglio Nazionale delle Ricerche-Comitato Scienze Agrarie 201.0635/21.06.15: "Le batteriosi del nocce e del nocciolo".

LAVORI CITATI

- Aloj B., Bartoletti F., Caporossi V., D'Errico F.P., Di Dato F., Grande C., Olmi M., Papparatti B., Tombesi A., Varvaro L. (1987) - Una "moria" del nocciolo di natura ignota nel Viterbese. *L'Informatore Agrario*, 43 (26), 55-57.
- Anselmi N., Govi G. (1996) - *Patologia del legname*. Edagricole, Bologna, pp. 397.
- Coplin D.L., Kado C. (2001) - *Pantoea*. In: *Plant Pathogenic Bacteria*, 3^a ed.: Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. Eds., pp. 73-83.
- Gianetti G., Mancini G., Scapin I., Gullino G., Vietto L. (1983) - *Indagine sulla diffusione ed eziologia delle "macchie brune" del nocciolo in Piemonte*. Atti Convegno Internazionale sul Nocciolo, Avellino, 22-24 settembre 1983, pp.109-113.
- Lelliott R.A., Stead D.E. (1987) - *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Methods in Plant Pathology*. Vol. 2. T.F. Preece Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 216.
- Pesante A. (1973) - *Patologia e terapia del nocciolo*. Comptes rendes des troisième journee de phytopharmacie circum-mediterranienne, Sassari, 20-24 settembre 1971, pp. 378-386.
- Scapin I., Cravero S., Morone C., Pinoggi G. (1994) - Recenti acquisizioni sulla eziologia delle "macchie brune" del nocciolo. *Acta Horticulturae*, 351, 567-574.
- Scortichini M., Stead D.E. (1993) - *Bacterial microflora associated with exudates of declining Turkey oaks (Quercus cerris L.)*. *Proceedings Recent advances in oak decline*. Luisi N., Lerario P., Vannini A. Eds., pp. 109-113.
- Scortichini M., Stead D.E., Rossi M.P. (1993) - Oak decline: aerobic bacteria associated with declining *Quercus cerris* L. in central Italy. *European Journal of Forest Pathology*, 23, 120-127.
- Scortichini M., Marchesi U., Rossi M.P., Di Prospero P. (2002) - Bacteria associated with hazelnut (*Corylus avellana* L.) decline are of two groups: *Pseudomonas avellanae* and strains resembling *P. syringae* pv. *syringae*. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 476-484.