

Effetti della stagionalità sull'inoculo aereo di *Gnomoniopsis castaneae* in alcuni castagneti dell'Italia nord-occidentale

Luana Giordano^{1,2}, Guglielmo Lione^{1,2}, Fabiano Sillo¹, Paolo Gonthier^{1,2}

¹Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA), Università degli Studi di Torino

²Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte, Chiusa Pesio (CN)

Introduzione

Storicamente la coltura del castagno (*Castanea sativa* Mill.) ha svolto un ruolo di primaria importanza nell'economia del mondo rurale italiano, sebbene il progressivo spopolamento delle aree montane e collinari nonché la diffusione di una serie di avversità di natura fitopatologica ed entomologica ne abbiano provocato il progressivo abbandono.

Il mal dell'inchiostro e il cancro corticale sono state senza dubbio, e lo sono tuttora, le più importate malattie del castagno tanto da condizionarne la produttività e la gestione, fino a minacciarne la sopravvivenza stessa. Il mal dell'inchiostro, i cui agenti eziologici sono oomiceti appartenenti al genere *Phytophthora*, in modo particolare *P. cambivora* (Petri) Buisman e *P. cinnamomi* Rands., è stato il primo flagello per i castagneti europei ed italiani (segnalato già alla fine del 1800). Il cancro del castagno, il cui agente eziologico è *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr., è invece comparso in Europa intorno al 1924 in Belgio e in Italia nel 1938. Gravi recrudescenze tanto dell'una quanto dell'altra malattia sono state segnalate in diverse aree castanicole italiane ed europee anche negli ultimi anni (Vettraino *et al.*, 2001 e 2005; Boni *et al.*, 2014). A partire dal 2002, il castagno è stato anche interessato da un'importante avversità di origine entomologica, l'imenottero galligeno *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, originario del nord della Cina e ritenuto uno degli insetti più nocivi per il castagno in tutto il mondo.

Ma è dal 2005 che un nuovo agente patogeno responsabile del marciume delle castagne, *Gnomoniopsis castaneae* G. Tamietti (Visentin *et al.*, 2012), ha iniziato a causare danni sempre più rilevanti, divenendo in poco tempo una delle principali minacce per la castanicoltura italiana e mondiale.

Attualmente il patogeno è segnalato in Europa, Asia e Australia con picchi di incidenza che possono raggiungere, nei casi più gravi, valori anche superiori al 90% (Lione *et al.*, 2019). La malattia si manifesta durante la maturazione delle castagne. L'endosperma assume una consistenza gessosa e una colorazione biancastra; al tatto la superficie dei cotiledoni si presenta ruvida e disidratata. Con il progredire delle infezioni, si assiste ad un graduale sgretolamento della polpa il cui colore vira gradualmente verso il marrone-bruno ed i cui frammenti sono frammisti ad una matrice filamentosa costituita dal micelio del fungo. La diagnosi precoce della malattia non sempre è possibile in quanto il fungo può essere presente nella castagna anche in assenza di alterazioni cromatiche o strutturali a carico dell'endosperma. Recentemente, *G. castaneae* è stato anche segnalato quale responsabile di cancri corticali morfologicamente molto simili a quelli indotti da *C. parasitica* (Pasche *et al.*, 2016), rendendo ancor più difficile la corretta stima del suo reale impatto.

Sebbene dalle prime segnalazioni del patogeno siano state condotte molte ricerche volte a studiarne la biologia di infezione e l'epidemiologia (Lione *et al.*, 2019), molti altri aspetti rimangono da chiarire e al momento non sono disponibili specifiche ed efficaci strategie di contenimento. Nel corso degli anni la difesa delle colture dalle malattie ha subito una profonda evoluzione ed oggi lo sviluppo di modelli epidemiologici rappresenta un supporto sempre più valido alle decisioni per la difesa definendo in modo univoco e semplice la presenza di condizioni favorevoli ad un determinato patogeno. Come dimostrato in altri patosistemi, l'andamento dell'inoculo aereo potenzialmente infettivo di un patogeno rappresenta un elemento chiave per lo sviluppo di tali modelli nonché per la messa a punto di corrette pratiche di difesa. In tale contesto, scopi del presente studio sono stati: i) quantificare l'inoculo aereo di *G. castaneae* in

* paolo.gonthier@unito.it

alcuni castagneti dell'Italia nord occidentale, ii) valutarne l'andamento in funzione della stagionalità, e iii) studiarne le relazioni con le condizioni climatiche.

Materiali e metodi

La quantificazione dell'inoculo aereo di *G. castaneae* è stata eseguita in 3 diversi castagneti dell'Italia nord-occidentale (Gaiola e Peveragno – CN, e San Giorio di Susa – TO) mediante l'impiego di un nuovo ed ottimizzato metodo di campionamento (trappole captaspore) combinato con un approccio molecolare (Real-time PCR) (Schweigkofler *et al.*, 2004; Garbelotto *et al.*, 2008). In ciascun castagneto sono state posizionate 14 trappole captaspore a circa 15 m di distanza l'una dall'altra lungo un transetto lineare permanente. Le trappole captaspore, costituite da dischi di carta da filtro del diametro di 15 cm imbibiti con Tris-EDTA buffer, sono state inserite in capsule Petri aperte e fissate ad una struttura portante in plastica. Le trappole sono state raccolte ogni due settimane dal 14 ottobre 2013 al 27 ottobre 2015 e conservate a -20°C in provette da 50 mL in attesa delle analisi di laboratorio.

Da ciascuna trappola captaspore si è proceduto all'estrazione del DNA fungino secondo il metodo descritto da Schweigkofler *et al.* (2004) modificato. L'identificazione del DNA di *G. castaneae* e la sua quantificazione sono state condotte in Real-time PCR (CFX-Connect, Bio Rad) mediante l'impiego di primer specie-specifici opportunamente sviluppati in questo studio. Curve standard sono state generate mediante l'impiego di estratti di DNA ottenuti da sospensioni di spore asessuali del patogeno a concentrazioni note (da 10^2 a 10^6 spore/mL). I dati ottenuti sono stati espressi in spore/cm² (Deposition Rate - DR).

Nel corso della prova sperimentale, l'incidenza della malattia è stata valutata eseguendo prove di isolamento *in vitro* da 40 castagne selezionate casualmente in ciascun sito di studio durante il periodo di raccolta come riportato in Visentin *et al.* (2012). Le colonie di *G. castaneae* sono state identificate sulla base delle caratteristiche macro- e micro-morfologiche e l'incidenza della malattia è stata calcolata per ciascun sito di studio come rapporto percentuale tra il numero di castagne positive al patogeno ed il numero totale di castagne analizzate.

Un modello basato su tecniche di *machine learning* è stato adattato ai dati sperimentali di DR per valutare l'effetto di diverse variabili stagionali. Le analisi sono state eseguite con il software R 3.5.2 (R Core Team, 2018) con un limite di significatività fissato al 5%.

Risultati e discussione

Lo studio della biologia di infezione e dell'epidemiologia dei patogeni vegetali è un elemento chiave per la comprensione dei fattori alla base degli eventi epidemici nonché per la messa a punto di efficaci strategie di difesa. L'agente di marciume delle castagne *G. castaneae* è attualmente una delle principali minacce per la castanicoltura non solo italiana ma anche mondiale. Sebbene negli ultimi anni molti aspetti inerenti il patosistema castagno-*G. castaneae* siano stati chiariti (Lione *et al.*, 2019), la complessità delle sfide che questo patogeno ha posto in essere richiede e richiederà nel prossimo futuro ulteriori sforzi da parte dell'intera comunità scientifica. Lo studio degli effetti della stagionalità sull'andamento dell'inoculo aereo potenzialmente infettivo del patogeno per lo sviluppo di modelli epidemiologici rappresenta senza dubbio il primo passo in tal senso.

I risultati preliminari di questo studio, condotto tra il 2013 e il 2015 con oltre 1700 campioni raccolti, hanno permesso di evidenziare come l'andamento dell'inoculo aereo di *G. castaneae* sia funzione del sito considerato. Il valore medio di DR riscontrato nei siti oggetto di studio nel corso del biennio considerando tutti i periodi di campionamento è risultato pari a 22,6 spore/cm². A San Giorio di Susa il picco massimo di 409,34 spore/cm² è stato registrato nel mese di luglio del 2015. A Gaiola il picco massimo di 92,70 spore/cm² è stato registrato nel mese di ottobre del 2015. A Peveragno, il picco massimo di 36,32 spore/cm² è stato registrato nel mese di ottobre del 2013. L'incidenza della malattia, calcolata in seguito alle prove di isolamento *in vitro* dalle castagne, ha raggiunto valori massimi del 30% suggerendo una correlazione positiva con la pressione di inoculo aereo rilevata in ciascun sito di studio. I risultati forniti dal modello statistico hanno mostrato che le temperature sono tra le variabili significativamente associate ($P < 0,05$) ai valori di DR di *G. castaneae*. Ciò è coerente con quanto riportato in letteratura, poiché peraltro temperature più miti sembrano favorire la manifestazione della malattia (Lione *et al.*, 2019).

Conclusioni

Quanto emerso da questo studio dovrà essere confermato da ulteriori analisi al momento in corso, ma i dati ottenuti potranno essere utilmente integrati con gli esistenti modelli predittivi *GnoMods* (Lione *et al.*, 2015) per ottenere stime sempre più accurate del livello di incidenza del patogeno nonché per lo sviluppo di software atti a supportare la messa a punto di

corrette pratiche di difesa integrata nei confronti di *G. castaneae*.

Lavoro condotto con il contributo della Regione Piemonte e del PSR nell'ambito delle attività del Centro Regionale di Castanicoltura.

Bibliografia

- BONI I., EBONE A., FERRARIS P., TERZUOLO P.G., ALMA A., BECCARO G.L., BOUNOUS G., FERRACINI C., GIORDANO L., GONTHIER P., LIONE G., MELLANO M.G., RAINA E., ADAMO D., 2014. *Il deperimento dei cedui castanili e la ricerca sul castagno in Piemonte: gli eventi si ripetono?* Quaderni della Regione Piemonte - Collana "Agricoltura" - Anno XVIII, n. 86: 38-41.
- GARBELOTTO M., SMITH T., SCHWEIGKOFER W., 2008. *Variation of spore dispersal of Fusarium circinatum, the causal agent of pine pitch canker, over a 12-month-period at two locations in Northern California*. Phytopathology, 98: 137-143.
- LIONE G., GIORDANO L., SILLO F., GONTHIER P., 2015. *Testing and modelling the effects of climate on the incidence of the emergent nut rot agent of chestnut Gnomoniopsis castanea*. Plant Pathology, 64(4): 852-863.
- LIONE G., DANTI R., FERNANDEZ-CONRADI P., FERREIRA-CARDOSO J.V., LEFORT F., MARQUES G., MEYER J.B., PROSPERO S., RADÓCZ L., ROBIN C., TURCHETTI T., VETTRAINO A.M., GONTHIER P., 2019. *The emerging pathogen of chestnut Gnomoniopsis castaneae: the challenge posed by a versatile fungus*. European Journal of Plant Pathology, 153(3): 671-685.
- PASCHE S., CALMIN G., AUDERSET G., CROVADORE J., PELLETERET P., MAUCH-MANI B., BARJA F., PAUL B., JERMINI M., LEFORT F., 2016. *Gnomoniopsis smithogilvyi causes chestnut canker symptoms in Castanea sativa shoots in Switzerland*. Fungal Genetics and Biology, 87: 9-21.
- R CORE TEAM, 2018. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- SCHWEIGKOFER W., O'DONNELL K., GARBELOTTO M., 2004. *Detection and quantification of airborne conidia of Fusarium circinatum, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method*. Applied Environmental Microbiology, 70: 3512-3520.
- VETTRAINO A.M., NATILI G., ANSELMINI N., VANNINI A., 2001. *Recovery and pathogenicity of Phytophthora species associated with a resurgence of ink disease in Castanea sativa in Italy*. Plant Pathology, 50: 90-96.
- VETTRAINO A.M., MOREL O., PERLEROU C., ROCIN C., DIAMANDIS S., VANNINI A., 2005. *Occurrence and distribution of Phytophthora species in European chestnut stands, and their association with Ink Disease and crown decline*. European Journal of Plant Pathology, 111: 169-180.
- VISENTIN I., GENTILE S., VALENTINO D., GONTHIER P., TAMIETTI G., CARDINALE F., 2012. *Gnomoniopsis castanea sp. nov. (Gnomoniaceae, Diaporthales) as the causal agent of nut rot in sweet chestnut*. Journal of Plant Pathology, 94(2): 411-419.