

## Caratterizzazione genetica molecolare di *Cryphonectria parasitica* nei castagneti dell'Alto Adige

Farooq Ahmad, Sanja Baric

Facoltà di Scienze e Tecnologie, Libera Università di Bolzano

Il castagno europeo (*Castanea sativa*) copre una superficie stimata di 2,5 milioni di ettari in 25 paesi europei (EU Science Hub, 2017). I castagneti da frutto sono presenti anche in diverse regioni d'Italia e si estendono su una superficie totale di circa 52.000 ettari (Castellotti e Doria, 2016). Nella Provincia Autonoma di Bolzano, i castagneti coprono una superficie di circa 123 ettari (ASTAT, 2016) e la produzione di castagne è stimata intorno alle 400 tonnellate all'anno (Bender, 2002). In passato le castagne hanno svolto un ruolo importante come alimento di base, soprattutto nelle zone montane e pedemontane (Bellini, 2004). Inoltre, il castagno è un elemento importante del paesaggio e delle foreste locali.

Gli alberi di castagno sono soggetti a diverse malattie e parassiti. La malattia più diffusa è il cancro corticale del castagno causato da *Cryphonectria parasitica* (Rigling e Prospero, 2018). *C. parasitica* induce cancri nella corteccia e lesioni dei tessuti vascolari, che possono causare la morte degli alberi nelle parti al di sopra del punto d'infezione (Rigling e Prospero, 2018). L'agente patogeno fungino è originario dell'Asia orientale ed è stato introdotto in Nord America nel 1900 e in Europa negli anni Trenta. In Italia è stato individuato per la prima volta nel 1938 nelle vicinanze di Genova (Biraghi, 1950) ed è stato riscontrato in Alto Adige nel 1958, dove oggi è presente su tutto il territorio (Windegger, 1994).

La compatibilità vegetativa (vc = vegetative compatibility) è rappresentata dalla capacità dei miceli fungini di fondersi con altri ceppi della stessa specie attraverso anastomosi ifali e di scambiare materiale e organuli citoplasmatici (Anagnostakis, 1977). Può essere determinata sia co-coltivando i funghi su terreni nutritivi o determinando gli alleli situati su sei loci di incompatibilità vegetativa (vic = vegetative incompatibility loci) (Short *et al.*, 2015). La compatibilità vegetativa rappresenta anche un importante meccanismo per trasferire i micovirus da un ceppo all'altro. Alcuni dei micovirus di *C. parasitica* (p.es. CHV-1) sono noti di diminuire la patogenicità del fungo, quindi agiscono come agenti di biocontrollo (Milgroom e Cortesi,

2004). L'impiego dei micovirus come agenti di biocontrollo ha portato allo studio dei tipi di vc di *C. parasitica* in diversi paesi e popolazioni. È stato ampiamente studiato in Nord America (Short *et al.*, 2015), Svizzera (Bryner e Rigling, 2012), Francia (Robin *et al.*, 2009), Spagna (Zamora *et al.*, 2012), Italia (Cortesi *et al.*, 1996), Croazia (Mlinarec *et al.*, 2018) e altri paesi dell'Europa sudorientale (Trestic *et al.*, 2001; Myteberi *et al.*, 2013). Nel complesso, la diversità di *C. parasitica* in Italia è stata maggiore nelle sottopopolazioni settentrionali che in quelle meridionali (Cortesi *et al.*, 1998; Pennisi *et al.*, 2005).

Negli anni '90, in Alto Adige, castagneti selezionati sono stati inoculati artificialmente ed in azioni mirate con ceppi ipovirulenti di *C. parasitica* comprendenti di micovirus (Heiniger e Rigling, 1994). Poiché il micovirus può essere trasmesso solo tra ceppi vegetativamente compatibili di *C. parasitica*, il successo dell'agente biocontrollo potrebbe essere compromesso da un aumento della variabilità genetica del fungo (Heiniger e Rigling, 2007). Ciò potrebbe verificarsi a causa dell'avvenuta introduzione di nuovi genotipi o per ricombinazione sessuale. Pertanto, lo scopo di questo studio era quello di valutare la diversità e la variabilità genetica di *C. parasitica* in Alto Adige sulla base dello studio di sei loci di incompatibilità vegetativa.

Il campionamento di castagni con sintomi di infezione da *C. parasitica* è stato effettuato nella primavera del 2017 e negli inverni del 2017/2018 e 2018/2019. Le porzioni malate dei rami sono state dapprima asportate manualmente e/o con l'aiuto di motoseghe nell'ambito delle misure sanitarie eseguite da specialisti professionali nella cura dei castani. Parti intere di rami con sintomi patologici sono state raccolte se erano di dimensioni ridotte. Nei rami di dimensioni superiori, porzioni di corteccia venivano rimosse con un cesello. Questi ultimi campioni sono stati prelevati al confine tra tessuto sano e tessuto necrotico. Laddove possibile, sono stati raccolti campioni da 10-12 alberi per castagneto per ottenere un quadro più completo della variabilità genetica di *C.*

*parasitica* in Alto Adige. Con il supporto dei collaboratori dell'Assessorato alle Foreste della Provincia Autonoma di Bolzano sono stati campionati 404 alberi affetti da cancro corticale, provenienti da 37 castagneti coltivati ed una popolazione forestale selvatica.

I campioni affetti da *C. parasitica* sono stati incubati in camere umide a temperatura ambiente per 7-20 giorni (in casi eccezionali fino a 40 giorni). I picnidi giallastro-arancioni erano chiaramente visibili sulla superficie dei rami e dei tessuti di corteccia nella maggior parte dei campioni, e in molti campioni i picnidi coprivano l'intera superficie corticale. I picnidi sono stati trasferiti con una lama o un ago su terreno di coltura di Potato Dextrose Agar (PDA). Il DNA è stato estratto dal micelio coltivato seguendo la procedura descritta da Cassago *et al.* (2002). Un protocollo PCR sviluppato da Short *et al.* (2015) e adattato da Mlinarec *et al.* (2018) è stato implementato per la caratterizzazione degli isolati di *C. parasitica* basati su alleli di incompatibilità vegetativa. Gli alleli vic sono stati separati e visualizzati su gel di elettroforesi di agarosio e i tipi di compatibilità sono stati assegnati agli isolati seguendo la nomenclatura descritta da Cortesi e Milgroom (1998).

Su 191 isolati di *C. parasitica* finora genotipizzati, 19 diversi tipi di vc sono stati trovati in Alto Adige (fig. 1A). Il tipo di vc EU-2 era più frequente in questo studio con una percentuale di 50,3%. Era presente in quasi tutti i castagneti e tutte le aree dell'Alto Adige. EU-1 e EU-6 erano rispettivamente il secondo e il terzo tipo di vc più diffuso in Alto Adige. L'EU-1 è stato trovato nel 15,2% degli isolati, mentre l'EU-6 è stato trovato nel 7,3% degli isolati. Le frequenze alle-

liche variavano da un locus all'altro, ad eccezione di vic3, dove solo l'allele 1 è stato trovato in tutti gli isolati di tutte le sottopopolazioni (fig. 1B).

In un precedente studio condotto negli anni '90 in Alto Adige, otto diversi tipi di vc sono stati identificati osservando la formazione di anastomosi ifali tra i diversi isolati sul terreno di coltura (Windegger, 1994). Il presente studio indica che la diversità genetica dei tipi di compatibilità vegetativa è più che raddoppiata negli ultimi 25 anni. Questo potrebbe essersi verificato a causa dell'introduzione di nuovi ceppi di *C. parasitica* da processi naturali o a causa delle attività umane. Tuttavia, si deve anche considerare che il presente studio ha incluso un numero di campioni più elevato e ha impiegato tecniche molecolari, che potrebbero anche avere un impatto sulla risoluzione dei risultati ottenuti. Ulteriori lavori sono necessari per conoscere meglio la persistenza dell'agente di biocontrollo nei castagneti dell'Alto Adige e per studiare la variabilità genetica delle popolazioni fungine, dell'ipovirus e della pianta ospite, al fine di adattare e ottimizzare le strategie di biocontrollo di *C. parasitica*.

### Ringraziamenti

Si ringrazia la Libera Università di Bolzano per aver concesso il finanziamento del progetto Start up "ChestnutBlight" (TN2809) a SB e la borsa di dottorato a FA. Le attività di campionamento sono state supportate da collaboratori dell'Assessorato alle Foreste della Provincia Autonoma di Bolzano e dai membri delle Associazioni dei Castanicoltori dell'Alto Adige.

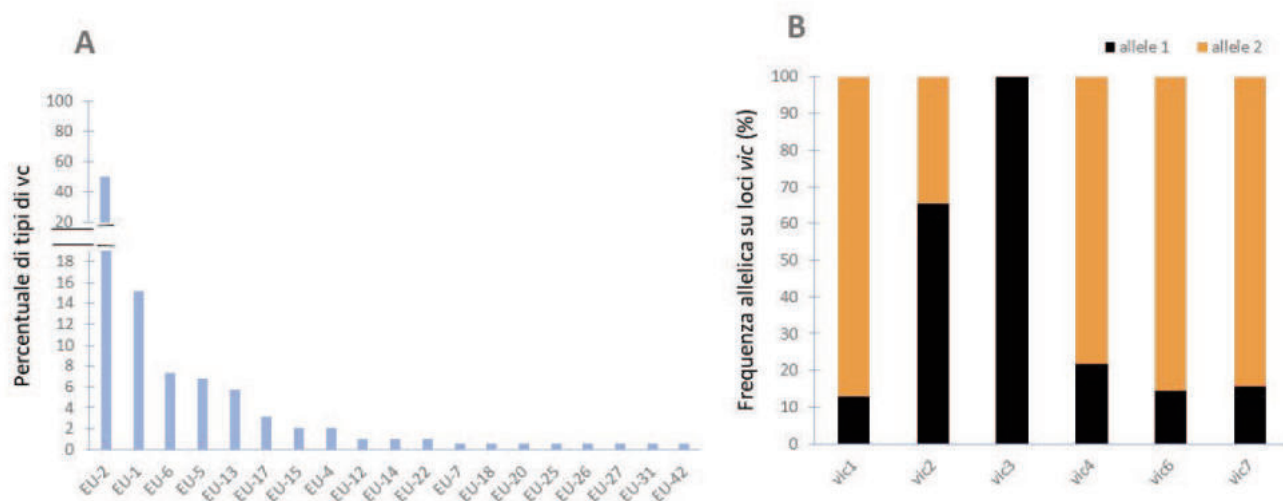


Fig. 1 - Incidenza e distribuzione percentuale dei diversi tipi di vc presenti in Alto Adige (A) e frequenza degli alleli 1 e 2 in ognuno dei sei loci vic di *C. parasitica* in Alto Adige (B).

## Bibliografia

- ANAGNOSTAKIS S.L., 1977. *Vegetative incompatibility in Endothia parasitica*. Experimental Mycology 12(4), 306-316.
- ASTAT, 2016. *Allgemeine Landwirtschaftszählung 2010*. Statistisches Jahrbuch 2016, 332.
- BELLINI E., 2004. *The chestnut and its resources: images and considerations*. Proceedings of the III International Chestnut Congress 693, 85-96.
- BENDER O., 2002. *Die Edelkastanie – Regionalentwicklung mit einer traditionellen Kulturart in den südlichen Alpen*. Patermanns Geographische Mitteilungen 146, 28-37.
- BIRAGHI A., 1950. *La distribuzione del cancro del castagno in Italia*. L'Italia Forestale e Montana 5, 18-21.
- BRYNER S.F., RIGLING D., 2012. *Hypovirus virulence and vegetative incompatibility in populations of the chestnut blight fungus*. Phytopathology 102(12), 1161-1167.
- CASTELLOTTI T., DORIA P. (eds.), 2016. *La castanicoltura da frutto in Italia. Caratteristiche strutturali, risultati economici e politiche pubbliche*. Rapporto di ricerca, CREA; [http://antares.crea.gov.it:8080/documents/10179/235687/Rica\\_Castanicoltura03\\_DEF.pdf](http://antares.crea.gov.it:8080/documents/10179/235687/Rica_Castanicoltura03_DEF.pdf)
- CASSAGO A., PANEPUCCI R.A., TORTELLA BAIÃO A.M., HENRIQUE-SILVA F., 2002. *Cellophane based mini-prep method for DNA extraction from the filamentous fungus Trichoderma reesei*. BMC Microbiology 2(1), 14.
- CORTESI P., MILGROOM M.G., BISIACH M., 1996. *Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of Cryphonectria parasitica in Italy*. Mycological Research 100, 1087–93.
- CORTESI P., MILGROOM M.G., 1998. *Genetics of vegetative incompatibility in Cryphonectria parasitica*. Applied Environmental Microbiology 64(8), 2988-2994.
- CORTESI P., RIGLING D., HEINIGER M.G., 1998. *Comparison of vegetative compatibility types in Italian and Swiss subpopulations of Cryphonectria parasitica*. European Journal of Forest Pathology 28, 167-176.
- EU Science Hub (The European Commission's Science and Knowledge Service) <https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/forestry/qr-tree-project/sweet-chestnut>. Last updated on 23.03.2017 and visited on 31.05.2019.
- HEINIGER U., RIGLING D., 1994. *Biological control of chestnut blight in Europe*. Annual Review of Phytopathology 32, 581-599.
- HEINIGER U., RIGLING D., 2007. *Application of the Cryphonectria hypovirus (CHV-1) to control the chestnut blight, experience from Switzerland*. Proceedings of the International Workshop on Chestnut Management in Mediterranean Countries-Problems and Prospects 815, 233-246.
- MILGROOM M.G., CORTESI P., 2004. *Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis*. Annual Review of Phytopathology 42, 311-338.
- MLINAREC J., JEŽIĆ M., ČOŠIĆ J., ČURKOVIĆ-PERICA M., 2018. *Multilocus PCR assay reveals high diversity of vegetative compatibility types in populations of Cryphonectria parasitica in Croatia*. Plant Pathology 67(3), 741-749.
- MYTEBERI I.F., LUSHAJ A.B., KEČA N., LUSHAJ B., LUSHAJ B.M., 2013. *Diversity of Cryphonectria parasitica, hypovirulence, and possibilities for biocontrol of chestnut canker in Albania*. International Journal of Microbiology Research and Reviews 1, 11–21.
- PENNISI A.M., SAMMARCO G., SPICA D., CACCIOLA S.O., 2005. *Characterization of Cryphonectria parasitica populations in southern Italy*. Proceedings of the Third International Chestnut Congress, 535-542.
- RIGLING D., PROSPERO S., 2018. *Cryphonectria parasitica, the causal agent of chestnut blight: Invasion history, population biology and disease control*. Molecular Plant Pathology 19, 7-20
- ROBIN C., CAPDEVIELLE X., MARTIN M., TRAVER C., COLINAS C., 2009. *Cryphonectria parasitica vegetative compatibility type analysis of populations in south-western France and northern Spain*. Plant Pathology 58(3), 527-535.
- SHORT D.P.G., DOUBLE M., NUSS D.L., STAUDER C.M., MACDONALD W., KASSON M.T., 2015. *Multilocus PCR assays elucidate vegetative incompatibility gene profiles of Cryphonectria parasitica in the United States*. Applied and Environmental Microbiology 81, 5736-5742.
- TRESTIC T., USCUPIC M., COLINAS C., ROLLAND G., GIRAUD A., ROBIN C., 2001. *Vegetative compatibility type diversity of Cryphonectria parasitica populations in Bosnia-Herzegovina, Spain and France*. Forest, Snow and Landscape Research 76, 391–396.
- WINDEGGER A., 1994. *La lotta biologica contro il cancro del castagno in Alto Adige*. Tesi di laurea, Università degli Studi di Firenze.
- ZAMORA P., MARTÍN A.B., RIGLING D., DIEZ J.J., 2012. *Diversity of Cryphonectria parasitica in western Spain and identification of hypovirus-infected isolates*. Forest Pathology 42(5), 412-419.