

## Indagini sulla capacità di *Gnomoniopsis castaneae* di trasmettersi da seme a semenzale

Guglielmo Lione<sup>1,2</sup>, Luana Giordano<sup>1,2</sup>, Paolo Gonthier<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte, Chiusa Pesio (CN)

### Introduzione

Il castagno (*Castanea sativa* Mill.) è una specie soggetta ad avversità fitosanitarie quali malattie infettive, attacchi di insetti nocivi e deperimenti generalizzati ad eziologia complessa. Tra le principali malattie del castagno si annoverano il cancro corticale, ad opera del fungo ascomicete *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr, e il mal dell'inchiostro associato ai cromisti *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman e *P. cinnamomi* Rands. Anche i marciumi del frutto possono rappresentare una minaccia rilevante in relazione alle perdite di prodotto e ai danni economici che ne conseguono. Sebbene numerose specie fungine siano associate ai marciumi del frutto, fino ai primi anni 2000 quelle più diffusamente riportate in letteratura erano state *Ciboria batschiana* (Zopf) N.F., *Phoma* spp. e *Phomopsis* spp. (Washington *et al.* 1997, Visentin *et al.* 2012, Lione *et al.* 2019).

A partire dalla metà degli anni 2000, il fungo ascomicete *Gnomoniopsis castaneae* G. Tamietti, descritto per la prima volta nel 2012 (Visentin *et al.* 2012), si è affermato come il principale agente causale di marciume della castagna. Inoltre, *G. castaneae* può provocare l'insorgenza di cancri corticali e necrosi fogliari su castagno. Tuttavia, non necessariamente il fungo determina sintomi poiché è in grado di colonizzare i tessuti verdi del castagno anche come endofita. Diffuso in Europa, Asia, Australasia e Nord America (Lione *et al.* 2019, Sakalidis *et al.* 2019), *G. castaneae* è considerato una minaccia emergente e particolarmente temibile per la castanicoltura.

Il ciclo biologico di *G. castaneae* comprende una fase teleomorfa con produzione di ascospore da periteci che si differenziano principalmente sui ricci delle castagne o su frutti marcescenti, mentre la fase anamorfa si riscontra sotto forma di strutture moltiplicative presenti su galle di *Dryocosmus kuriphilus*

Yasumatsu (i.e. insetto invasivo noto come cinipide galligeno del castagno) o sulla superficie di cancri corticali. Le spore e i conidi costituiscono l'inoculo responsabile delle infezioni che avverrebbero prevalentemente a livello florale durante l'antesi (Shuttleworth & Guest 2019). Sembra invece improbabile la trasmissione di *G. castaneae* per mezzo potenziali insetti vettori, come recentemente dimostrato per *D. kuriphilus* (Lione *et al.* 2016). Nonostante le ipotesi avanzate fino ad ora siano supportate da evidenze scientifiche e ricostruiscono alcuni tra i principali meccanismi di infezione, alcuni aspetti del ciclo biologico di *G. castaneae* sono ancora poco noti, quali ad esempio la possibilità di trasmissione da seme infetto a semenzale. Pertanto, gli obiettivi di questo studio sono stati: I) saggiare la possibilità che *G. castaneae* possa trasmettersi da seme infetto a semenzale, II) stimare la probabilità associata a tale evento e III) indagare gli effetti dell'infezione del seme sulla sua germinabilità.

### Materiali e metodi

Nell'autunno 2012 sono state prelevate presso il Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte (lat. 44,307626°, long. 7,682592°) circa 200 castagne mature da 20 piante di *C. sativa*. Dopo la raccolta sono state preselezionate le castagne prive di alterazioni morfologiche e di consistenza, che sono state successivamente sottoposte a prova di galleggiamento in un volume di acqua pari a 0,5 l. Le castagne non depositatesi sul fondo sono state scartate, mentre le altre sono state prelevate e disposte sotto cappa biologica. Dopo una fase di disinfezione superficiale in soluzione acquosa di NaClO (5%<sub>vol</sub> per 5 s), queste sono state risciacquate in acqua sterile ed asciugate. Successivamente, incidendo ciascuna castagna con un bisturi sterile, è stata ricavata una cavità a lato del pericarpo dove è stato inserito un tassello di substrato MEA (Malt Extract Agar), del diametro di 6 mm, pre-

\* paolo.gonthier@unito.it

cedentemente colonizzato dal micelio di *G. castaneae*. Le colonie fungine inoculate erano state precedentemente isolate da castagne originarie di Biasca (CH), Donnaz (I) e Sisteron (F), come descritto in Sillo *et al.* 2017. Le inoculazioni con micelio hanno interessato il 75% delle castagne (inoculate in egual numero per ciascuna provenienza geografica delle colonie utilizzate), mentre nel restante 25% sono stati inoculati tasselli di substrato sterile. La ferita è stata protetta avvolgendo la porzione di pericarpo incisa con una striscia di Parafilm® di 1 cm di larghezza. Dopo l'inoculazione le castagne sono state interrate singolarmente ad una profondità di 0,5 cm in una miscela di torba e perlite all'interno di vasi del volume di 1 l. I vasi sono stati disposti in cella climatica impostata a 22°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) con fotoperiodo di 12 h, somministrando regolarmente una quantità di acqua sufficiente a mantenere l'idratazione della matrice. Le frequenze di germinazione delle castagne inoculate con le diverse colonie di *G. castaneae* e con substrato sterile sono state confrontate con test  $\chi^2$ . Dopo circa 10 mesi dalla data di germinazione, i semenzali sono stati ispezionati per verificare la presenza di cancri del fusto e necrosi fogliari ascrivibili a *G. castaneae*. Successivamente, i semenzali sono stati suddivisi in 4 porzioni pari al 25% della loro altezza, prelevando da ciascuna: 4 frammenti di tessuto dalla porzione esterna del fusto, 2 frammenti da gemme, 2 da picciolo e 4 da lamina fogliare. Sono inoltre stati prelevati 6 frammenti di radici per ciascun semenzale. I frammenti di tessuto prelevati, della dimensione massima di  $5 \times 3 \times 2$  mm, sono stati posti in coltura come descritto in Visentin *et al.* 2012 per re-isolare *G. castaneae*, la cui identificazione è stata condotta come riportato in Lione *et al.* 2015. Infine, per stimare probabilità di trasmissione del fungo da seme infetto a semenzale è stata calcolata la frequenza di re-isolamento di *G. castaneae* (in %) con il relativo intervallo di confidenza di Blaker al 95% (Blaker 2000).

## Risultati e discussione

Verificare se, e con quale probabilità, *G. castaneae* possa trasmettersi da seme infetto a semenzale in *C. sativa* rappresenta un passo ulteriore verso il completamento del quadro conoscitivo relativo al ciclo biologico di questo fungo. Il disegno sperimentale adottato in questo lavoro ha permesso di preselezionare del materiale di propagazione idoneo a saggiare la suddetta possibilità di trasmissione in assenza di fattori di disturbo biotici e abiotici. I primi sono stati esclusi attraverso la preselezione del seme. Infatti, una percentuale pari al 14% delle 200 castagne prelevate in

campo è stata scartata a causa della presenza di alterazioni morfologiche e di consistenza, mentre il saggio di galleggiamento ha consentito di individuare 112 castagne verosimilmente non colonizzate da funghi patogeni o da insetti nocivi. Potenziali fattori di disturbo abiotici sono invece stati esclusi mantenendo le castagne inoculate in un ambiente artificiale con substrato, temperatura, input idrico e fotoperiodo controllati.

Il tasso di germinazione complessivo dei semi si è attestato al 54%, permettendo di ottenere 60 semenzali, di cui 15 provenienti da castagne inoculate col solo substrato sterile e 45 da castagne inoculate con micelio di *G. castaneae*. Di questi ultimi 45 semenzali 15, 12 e 18 sono germinati da castagne inoculate rispettivamente con gli isolati provenienti da Biasca, Donnaz e Sisteron. Non sono emerse differenze significative tra le frequenze di germinazione delle castagne, che si sono attestate al 53,6% per quelle inoculate con substrato sterile, ed al 53,6%, 42,8% e 64,3% per quelle inoculate con micelio di *G. castaneae* relativamente ai siti di Biasca, Donnaz e Sisteron ( $\chi^2 = 2,585$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0,460$ ). Questi risultati suggeriscono che la capacità di germinazione del seme non sia sensibilmente influenzata dall'infezione di *G. castaneae* o dalla provenienza geografica degli isolati. Tuttavia, il disegno sperimentale adottato non è in grado di discriminare gli effetti della progressione sintomatologica sulla germinabilità delle castagne, poiché il loro interrimento è avvenuto subito dopo l'inoculazione.

Dai semenzali germinati da castagne inoculate con substrato sterile non sono state isolate colonie di *G. castaneae*, mentre dal 5% dei semenzali inoculati con micelio è stato re-isolato il fungo. L'intervallo di confidenza di Blaker indica che la probabilità di trasmissione di *G. castaneae* da seme infetto a semenzale si colloca tra il 7,9% ed il 14,9%. La trasmissione del fungo secondo le modalità saggiate in questo lavoro è pertanto un evento possibile, ancorché raro o perlomeno poco frequente in termini probabilistici. Al termine della prova, nessun semenzale ha manifestato sintomi visibili di cancro su fusto o rametti, né alterazioni necrotiche a carico delle foglie. Presumibilmente, questo risultato è in parte associato alla bassa frequenza di trasmissione da seme, ed in parte dovuto al fatto che il micelio di *G. castaneae* ha colonizzato esclusivamente la porzione caulinare limitrofa al colletto. Tuttavia, sembra lecito ipotizzare che il passaggio di *G. castaneae* da endofita ad agente di cancro richieda il verificarsi di determinate condizioni. Per confermare la validità di questa ipotesi e per identificare quali siano queste condizioni occorrerà effettuare ulteriori indagini, come peraltro già

suggerito in letteratura (Lione *et al.* 2019).

## Conclusioni

Su castagno la trasmissione di *G. castaneae* da seme infetto a semenzale rappresenta una possibile modalità attraverso la quale il fungo può penetrare nell'ospite, sebbene tale evento sia poco probabile. Questo studio fornisce un ulteriore tassello che contribuisce a colmare alcune delle lacune conoscitive in merito al ciclo biologico di *G. castaneae*. In prospettiva, la probabilità di trasmissione da seme a semenzale potrebbe essere integrata in modelli epidemiologici e previsionali a supporto dell'agricoltura e della gestione forestale nelle aree castanicole.

## Ringraziamenti

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

## Riferimenti bibliografici

- BLAKER H., 2000. *Confidence curves and improved exact confidence intervals for discrete distributions*. Canadian Journal of Statistics, 28(4): 783-798.
- LIONE G., DANTI R., FERNANDEZ-CONRADI P., FERREIRA-CARDOSO J.V., LEFORT F., MARQUES G., *et al.*, 2019. *The emerging pathogen of chestnut Gnomoniopsis castaneae: the challenge posed by a versatile fungus*. European Journal of Plant Pathology, 153(3): 671-685.
- LIONE G., GIORDANO L., FERRACINI C., ALMA A., GONTHIER P., 2016. *Testing ecological interactions between Gnomoniopsis castaneae and Dryocosmus kuriphilus*. Acta Oecologica, 77: 10-17.
- 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.
- SAKALIDIS M.L., MEDINA-MORA C., KOLP M., FULBRIGHT D.W., 2019. *First report of Gnomoniopsis smithogilvyi causing chestnut brown rot on chestnut fruit in Michigan*. Plant Disease, doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0562-PDN>
- SHUTTLEWORTH L.A., GUEST D.I., 2017. *The infection process of chestnut rot, an important disease caused by Gnomoniopsis smithogilvyi (Gnomoniaceae, Diaporthales) in Oceania and Europe*. Australasian Plant Pathology, 46(5): 397-405.
- SILLO F., GIORDANO L., ZAMPIERI E., LIONE G., DE CESARE S., GONTHIER, P., 2017. *HRM analysis provides insights on the reproduction mode and the population structure of Gnomoniopsis castaneae in Europe*. Plant pathology, 66(2): 293-303.
- 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.
- WASHINGTON W.S., ALLEN A.D., DOOLEY L.B., 1997. *Preliminary studies on Phomopsis castanea and other organisms associated with healthy and rotted chestnut fruit in storage*. Australasian Plant Pathology, 26(1): 37-43.