



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE FORESTALI E AMBIENTALI (L-25)

DIFFUSIONE DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL
CASTAGNO NELL'ITALIA CENTRO-SETTENTRIONALE
*SPREAD OF THE CHESTNUT MOSAIC VIRUS IN CENTRAL-NORTHERN
ITALY*

TIPO TESI: (sperimentale)

Studente:
FRANCESCO MENGARELLI

Relatore:
PROF. SERGIO MUROLO

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

A mio padre Saverio.

Purtroppo non sei più con me ma tanta parte hai avuto nel
raggiungimento di questo mio traguardo.
Grazie per la forza e la determinazione che mi hai trasmesso e
per l'amore che hai saputo donarmi, ne farò tesoro per la vita.
Oggi saresti stato straordinariamente fiero di me.
Ti voglio bene papà.....tanto

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE	4
ELENCO DELLE FIGURE	5
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	6
ABSTRACT.....	7
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	8
1.1 Descrizione botanica del castagno	8
1.2 Distribuzione geografica	9
1.3 Problematiche socio-economiche legate al castagno	10
1.3.1 Spopolamento delle campagne e delle montagne e abbandono dei castagneti ...	11
1.3.2 Principali problematiche fitosanitarie	12
1.3.3 Mosaico e Giallume del castagno: due nuove problematiche da non sottovalutare	14
CAPITOLO 2: SCOPO DELLA RICERCA	17
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI	18
3.1 Descrizione dei siti.....	18
3.2 Valutazione visiva delle problematiche fitosanitarie	20
3.3 Diagnosi del virus del mosaico del castagno	20
3.3.1 Estrazione del DNA	20
3.3.2 Amplificazione genica (PCR)	22
3.3.3 Visualizzazione dei dati dell'amplificazione genica mediante elettroforesi	22
CAPITOLO 4: RISULTATI.....	24
4.1 Valutazione della situazione fitosanitaria	24
4.2 Diagnosi molecolare del virus del mosaico del castagno	29
CONCLUSIONI	33
BIBLIOGRAFIA	34

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Siti, ricadenti nelle regioni Marche, Emilia-Romagna, Toscana e Trentino-Alto Adige in cui sono stati prelevati i campioni di castagno.....	19
Tabella 2: Diffusione delle principali problematiche fitosanitarie riscontrate nei diversi siti	24
Tabella 3: Risultati della diagnosi molecolare.....	29
Tabella 4: Campioni di castagno analizzati in laboratorio.....	30

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Albero (A), foglie (B), frutto di castagno (C).....	8
Figura 2: Areale di distribuzione di <i>Castanea sativa</i> in Europa.....	10
Figura 3: Sintomi specifici di mal dell'inchiostro su piante adulte (A, B), imbrunimento dei tessuti a livello del colletto di giovani piante di castagno (C).....	11
Figura 4: Disseccamenti indotti da cancro corticale virulento (A), cancro di tipo virulento (B), cancro di tipo ipovirulento cicatrizzante (C) e cicatrizzato.....	13
Figura 5: Giallume del castagno (A), Mosaico del Castagno (B, C).....	14
Figura 6: Particelle virali del Badnavirus (A), rappresentazione schematica del genoma del virus del mosaico del castagno (B).....	15
Figura 7: Siti selezionati per l'indagine sulla diffusione del virus del mosaico del castagno.....	18
Figura 8: Schematizzazione delle principali fasi dell'estrazione del DNA da campioni di castagno.....	20
Figura 9: Termociclatore in cui avviene la reazione di PCR (sinistra), elettroforesi su gel di agarosio per verificare il risultato dell'amplificazione.....	23
Figura 10: Tipologie di cancro rinvenuti nei sopralluoghi: cancro cicatrizzante (A), cancro cicatrizzato (B), associato a isolati ipovirulenti di <i>C. parasitica</i>	25
Figura 11: Giovane pianta di castagno con evidenti necrosi a fiamma a livello del colletto (A); pianta secolare debilitata da attacchi di <i>Phytophthora</i> sp. (B).....	26
Figura 12: Tipico sintomo a mosaico ascrivibile a ChMV.....	27
Figura 13: Sintomi di mosaico del castagno riscontrati in un castagneto in Emilia-Romagna	28
Figura 14: Sintomi di carenza nutrizionale riscontrati su castagni in Trentino.....	28
Figura 15: Risultati dell'amplificazione genica utilizzando primer specifici per il ChMV.....	32

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

ChMV	Chestnut Mosaic Virus – Virus del mosaico del castagno
ChMD	Chestnut Mosaic Disease
PCR	Polymerase chain reaction – Reazione a catena della polimerasi

ABSTRACT

Il castagno, sin dall'antichità, è stato motivo di interesse da parte dell'uomo per i suoi molteplici utilizzi come la produzione del legname ma soprattutto per il frutto che in passato era un'importante risorsa alimentare per le popolazioni rurali degli ambienti forestali montani. Nel corso dei secoli, il castagno è stato colpito da malattie importanti come il cancro corticale e il mal dell'inchiostro, e recentemente sono divenute sempre più frequenti segnalazioni del mosaico del castagno, una malattia la cui eziologia è stata da solo da qualche anno conosciuta. Lo scopo di questa ricerca è stata quella di verificare la diffusione del mosaico del castagno in diverse aree castanicole nella regione Marche, Emilia-Romagna, Toscana e Trentino-Alto Adige. Oltre a un monitoraggio visivo, sono stati raccolti 70 campioni, di cui 25 che manifestavano il "mosaico", 19 che mostravano sintomi di carenze nutrizionali e 25 asintomatici. Dall'analisi PCR è stato possibile verificare che il ChMV è stato riscontrato nel 76% dei campioni che mostravano sintomi di mosaico (19/25), nel 31,6% dei campioni di quelli che mostravano sintomi di carenza (6/19) e nel 36% di quelli asintomatici (9/25) raccolti nei pressi di quelli sintomatici. In conclusione, possiamo affermare che il virus del mosaico del castagno è presente in diverse areali castanicoli dell'Italia Centro-Settentrionale, manifestandosi con maggior intensità e gravità soprattutto nelle Marche. Un aspetto che merita di essere approfondito è la presenza di ChMV anche in piante che apparentemente sono asintomatiche.

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 Descrizione botanica del castagno

Il castagno è una pianta arborea longeva, con altezza variabile fino ai 35 m circa e chioma espansa e rotondeggiante (Fig. 1A). Generalmente presenta un grosso fusto colonnare, con corteccia lucida, liscia, di colore grigio-brunastro mentre nei rami è di colore bianco e cosparsa di lenticelle trasverse. Con il passare degli anni, dai quarant'anni in poi circa, la corteccia inizia a fessurarsi longitudinalmente a partire dal colletto (Pignatti *et al.*, 1982).



Fig. 1: Albero (A), foglie (B), frutto di castagno (C).

Le foglie sono caduche, alterne e provviste di un breve picciolo; la lamina è larga fino a 10 cm e lunga fino a 20 cm, di forma lanceolata, segmentata ai margini ed acuminata all'apice (Fig. 1B). Le infiorescenze sono costituite da fiori unisessuali: quelli maschili riuniti in amenti lunghi 5-15 cm mentre quelli femminili sono isolati o riuniti in piccoli gruppi di 2-3.

Il frutto è rappresentato da un achenio (castagna) di forma più o meno globosa con pericarpo marrone, privo di peli, di consistenza cuoiosa e lucido all'esterno (Fig. 1C). E' formato da un lato appiattito, chiamato *pancia*, e da uno convesso, detto *dorso*; il polo apicale termina con un prolungamento detto *torcia* mentre il polo prossimale, chiamato *ilo*, si presenta appiattito.

E' una specie mesofila, quindi è esigente moderatamente in umidità, sopporta relativamente bene gli inverni freddi, subendo danni solo a temperature inferiori ai -25°C , ma diventa esigente durante la stagione vegetativa ed è per questo motivo che ha una ripresa vegetativa tardiva, con la schiusura delle gemme in tarda primavera e la fioritura all'inizio dell'estate. Il castagno necessita di esigenti condizioni pedologiche: infatti predilige terreni ricchi di elementi nutritivi come il potassio e il fosforo e di humus.

1.2 Distribuzione geografica

L'areale di distribuzione del castagno europeo (*Castanea sativa*) si estende dal sud Europa (penisola iberica, Italia, Balcani, isole del Mediterraneo) e nord Africa (Marocco) verso l'Europa nord-occidentale (Inghilterra, Belgio) e verso l'Asia occidentale (Turchia nord-orientale, Armenia, Georgia, Azerbaijan, Siria) con un range altitudinale compreso tra 200 e 1800 m, a seconda della latitudine (Fig. 2).

In Europa, il castagno copre una superficie di oltre 2,5 milioni di ettari (circa la dimensione della Sardegna). La maggior parte dell'area, più o meno l'89%, è concentrata in pochi paesi in particolare Francia e Italia, seguite da Spagna, Portogallo e Svizzera, che vantano una lunga tradizione di coltivazione del castagno (Conedera *et al.*, 2016).

In Italia si trova nella zona fitoclimatica del *Castanetum*, a cui dà il nome, estendendosi anche nelle zone più fresche del *Lauretum*, grazie all'intervento dell'uomo. Generalmente vegeta su quote variabili che vanno dai 200 m s.l.m. fino agli 800 m nelle zone alpine mentre nell'Appennino può spingersi anche ai 1000-1300 m.

La distribuzione non è uniforme perché il castagno necessita di determinate condizioni climatiche e geologiche. La maggior diffusione si concentra nel versante tirrenico della penisola, dalla Calabria fino alla Liguria, passando per la Toscana e nel settore occidentale dell'arco alpino piemontese. Nel versante adriatico invece la presenza del castagno è sporadica e nella pianura Padana è quasi assente mentre nelle isole è possibile trovarlo nei pressi delle stazioni più fresche.

L'ecosistema forestale tipico di *Castanea sativa* è la foresta decidua temperata mesofila, dove forma associazioni pure o miste, in particolare con farnia, roverella, frassino, carpino nero, noce, nocciolo, ecc.



Fig. 2: Areale di distribuzione di *Castanea sativa* in Europa.

1.3 Problematiche socio-economiche legate al castagno

Il castagno nei secoli si è scontrato con problematiche di diversa natura che hanno determinato nel tempo una contrazione delle superfici. Tra le principali problematiche si è verificato uno spopolamento delle campagne e delle montagne, con un conseguente abbandono di aree vocate alla castanicoltura. Ad aggravare il quadro hanno contribuito cause di natura essenzialmente economica, in particolare la sostenibilità economica della gestione di queste aree nonché problematiche fitosanitarie che hanno inciso anche sulla produzione sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo.

1.3.1 Spopolamento delle campagne e delle montagne e abbandono dei castagneti

Negli ultimi millenni, il castagno ha caratterizzato la storia sociale della montagna italiana, anche in condizioni di estrema povertà, sviluppando una civiltà perfettamente integrata nell'ambiente (Gabrielli, 1994; Arnaud *et al.*, 1997; Conedera *et al.*, 2004). Durante il XX

secolo, si è verificato un periodo di generale abbandono ma, nonostante ciò, il patrimonio castanicolo si dimostra ancora ricco in consistenza e potenzialità e quindi è molto importante il recupero dei castagneti abbandonati che fino ad ora è avvenuto tramite interventi poco sostenibili soprattutto dal punto di vista finanziario. Un altro problema legato all'abbandono riguarda le proprietà dei soprassuoli, di difficile determinazione poiché grandi superfici una volta appartenenti a singoli proprietari, si sono frammentati in piccoli appezzamenti con proprietari differenti, alcuni emigrati e non facilmente rintracciabili.

1.3.2 *Principali problematiche fitosanitarie*

Mal dell'inchiostro

È la malattia più antica che colpisce il castagno ed è causata dal patogeno chiamato *Phytophthora cambivora*, e inoltre risulta essere anche la più pericolosa perché è l'unica che può uccidere l'intera pianta, sopprimendone l'apparato radicale.



Fig. 3: Sintomi aspecifici di mal dell'inchiostro su piante adulte (A, B); imbrunimento dei tessuti a livello del colletto di giovani piante di castagno (C).

Gli attacchi hanno intensità variabile e possono colpire singole piante, piccoli gruppi o anche aree piuttosto estese causandone o la morte immediata in una sola stagione vegetativa

oppure lasciare le piante deperienti per diversi anni. I primi sintomi visibili sono la chioma diradata e l'ingiallimento delle foglie (Fig. 3A, B) e nel giro di pochi anni la pianta muore presentando un imbrunimento a forma di fiamma sotto la corteccia, all'altezza del colletto (Fig. 3C); inoltre possono comparire emissioni di essudati nerastri che danno il nome alla malattia. Il principale fattore della diffusione delle spore del patogeno è l'acqua circolante nel terreno ma non è l'unico in quanto incidono anche le condizioni edafiche e microbiologiche del suolo: il patogeno, grazie alla capacità di vivere a lungo nel suolo, può essere trovato anche in contesti sani. Altri fattori determinanti sono le condizioni climatiche, in particolare la siccità prolungata che indebolisce le piante mentre le precipitazioni abbondanti aiutano la diffusione del patogeno e le alte temperature invernali ne favoriscono la sopravvivenza (Maresi *et al.*, 2014).

Il cancro corticale del castagno

È una malattia causata da un agente patogeno di origine asiatica, *Cryphonectria parasitica*, che colpiva *Castanea crenata* e *Castanea mollissima*, diffusosi negli Stati Uniti, in particolare su *Castanea dentata*, all'inizio del XX secolo a causa dell'importazione di materiale di propagazione infetto e successivamente, negli anni '30. In Europa è giunto attraverso il legno di imballaggio dove nel giro di pochi anni ha causato gravi danni che hanno inciso sull'abbandono o sulla ceduzione dei castagneti da frutto. Negli anni '50, in Italia, è stata rilevata la guarigione spontanea di alcuni cancri mentre negli anni '60, in Francia, sono stati scoperti esemplari di castagno infetti da isolati ipovirulenti del fungo che sono in grado di trasmettere l'ipovirulenza agli isolati normali virulenti.

I sintomi sono visibili sui rami e sulla corteccia: nei primi stadi dell'infezione si possono vedere, in corrispondenza del punto di penetrazione, parti di corteccia arrossate dal contorno di forma ellittica, accompagnate da ipotrofia e col margine leggermente in rilievo. Le zone colpite sono interessate dalla necrosi dei tessuti floematici e cambiali con la conseguente interruzione del trasporto alle radici della linfa elaborata che causerà la fessurazione della corteccia, mettendo a nudo il legno sottostante. Con il passare del tempo la necrosi interesserà tutta la circonferenza del punto colpito bloccando anche il trasporto della linfa grezza alla chioma provocando un rapido avvizzimento delle foglie, senza che esse si stacchino dai rami. Al di sotto del punto di infezione si sviluppano dei rametti epicormici che con l'avanzamento del cancro verso il basso saranno devitalizzati. *C. parasitica* penetra attraverso le ferite che si

trovano sulla corteccia, ad esempio dopo una grandinata, mentre l'infezione si può trasmettere tramite le screpolature naturali della corteccia (Maresi *et al.*, 2014; Turchetti *et al.*, 2008). Nella regione Marche la presenza di cancri ipovirulenti è prevalente, e recentemente è stato possibile ricostruire il genoma di *Cryphonectria hypovirus 1*, virus responsabile dell'ipovirulenza nei castagneti della nostra regione (Murolo *et al.*, 2018).



Fig. 4: Disseccamenti indotti da cancro corticale virulento (A), cancro di tipo virulento (B), cancro di tipo ipovirulento cicatrizzante (C) e cicatrizzato (D).

1.3.3 Mosaico e Giallume del castagno: due nuove problematiche da non sottovalutare

Nel corso degli ultimi anni, in seguito alle segnalazioni dei castanicoltori, l'Università Politecnica delle Marche insieme alla Fondazione Edmund Mach sta portando avanti un monitoraggio fitosanitario in alcune regioni italiane (Marche, Emilia-Romagna, Toscana e Trentino-Alto Adige) per meglio comprendere le cause che determinano improvvisi alterazioni cromatiche della chioma di castagni giovani ma anche secolari. Sono stati definiti due quadri sintomatologici, descritti rispettivamente come mosaico e giallume del castagno.



Fig. 5: *Giallume del castagno (A), Mosaico del castagno (B, C).*

Il “**giallume**” del castagno, sembra causato da fattori abiotici. Nell’agosto 2014 in Trentino (nella zona di Pranzo, Campi e Tenno), si sono verificati degli ingiallimenti improvvisi, parziali o su tutta la chioma, di piante adulte e giovani (Bertoldi et al., 2020). All’ingiallimento internervale di tutta la foglia, seguiva anche la necrosi del bordo e l’accartocciamento della stessa. Dai dati raccolti nel corso della sperimentazione, è apparso evidente come il sintomo rilevato fosse associabile ad una forte carenza di Mn, aggravata in qualche caso anche dalla mancanza di Fe, verificatasi improvvisamente nell’estate assai piovosa del 2014. Questa carenza si è manifestata in particolare lungo i pendii, con evidenti strisciate di castagni sofferenti. Sulle piante campionate si è potuta escludere finora una correlazione fra i sintomi e la presenza di fitoplasmi, virus o altri agenti patogeni. Una possibile spiegazione della improvvisa carenza di minerali, pur sempre presenti nel suolo, potrebbe essere data dalle elevate precipitazioni e dall’indebolimento delle piante da parte degli attacchi della vespa cinese che probabilmente hanno anche ridotto la sostanza organica nei suoli, rendendo più difficile l’assorbimento del Mn. Dopo alcuni anni gran parte delle piante segnalate apparivano

in ripresa ed ormai asintomatiche, giustificando ulteriormente l'ipotesi di una carenza improvvisa e momentanea.

Il **'mosaico' del castagno** è caratterizzato da tessuti fogliari che alternano in modo irregolare aree gialle ad aree verdi dei tessuti internervali con l'arricciamento della foglia, e con la presenza di necrosi irregolari sui margini. La pianta negli anni va incontro a un graduale deperimento che, pur senza ucciderla, inevitabilmente ne compromette la produzione. Tale problematica è stata riscontrata con sintomi particolarmente gravi a partire dagli anni '90 nelle Marche ad Acquasanta Terme (fraz. Pozza), ma sembra anche diffusa in altre regioni con sintomi meno evidenti. E' stato dimostrato che la malattia è trasmissibile attraverso la comune tecnica dell'innesto. Recentemente sono stati effettuati studi specifici in Italia e Francia e, utilizzando metodiche classiche e innovative di diagnosi è stato possibile ricostruire il genoma completo di un badnavirus (Marais *et al.*, 2021) (Fig. 6), associato alla malattia che i ricercatori francesi avevano denominato "mosaico del castagno" (Desvignes, 1999).

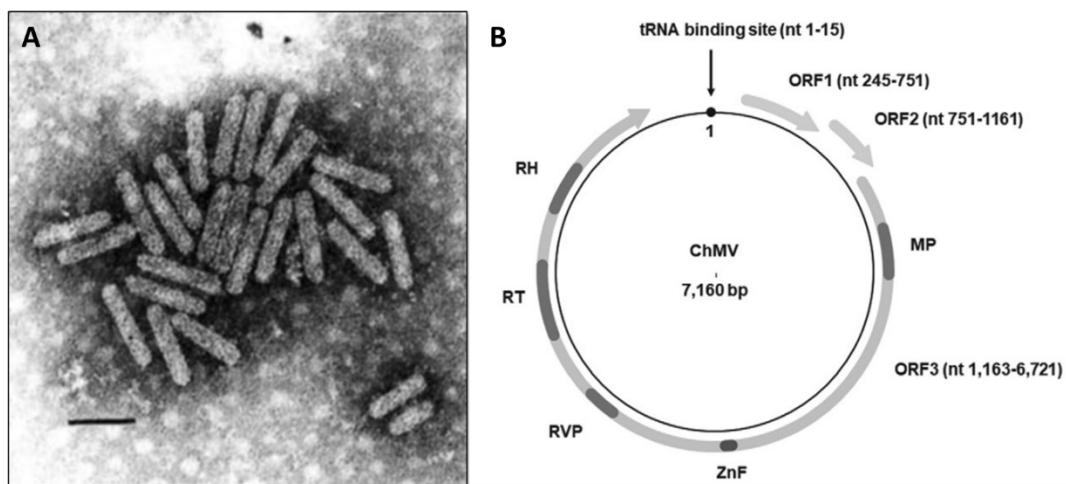


Fig. 6: Particelle virali del Badnavirus (A), rappresentazione schematica del genoma del virus del mosaico del castagno (B).

Il genere *Badnavirus* appartiene alla famiglia *Caulimoviridae*, e comprende 32 specie di pararetrovirus in grado di infettare un ampio range di piante coltivate in tutto il mondo (Borah *et al.*, 2013; Lockhart *et al.*, 1994; Medberry *et al.*, 1990), anche importanti a livello economico, causando perdite di raccolta variabili dal 10% al 90% in base alle specie coinvolte (Ishwara Bhat *et al.*, 2016).

Il genere *Badnavirus* comprende virus non-enveloped a DNA bacilliformi i cui virioni, dal diametro di circa 30 nm e una lunghezza compresa tra 120 e 150 nm a seconda della specie, sono stati osservati nel citoplasma oltre che nei vacuoli delle piante infette (Staginnus *et al.*, 2009). Il genoma è costituito da una molecola singola e circolare di open-circular DNA a doppio filamento, dalla lunghezza totale di 7200-9200 bp, con sovrapposizioni a filamento singolo, che include almeno tre sequenze open reading frames, ossia cornici di lettura aperta (ORFs), costituite da DNA codificante.

CAPITOLO 2: SCOPO DELLA RICERCA

Il castagno, nonostante le diverse problematiche socio-economiche e fitosanitarie, continua a rivestire una notevole importanza per le aree interne e per le comunità dell'Appennino.

Scopo principale della presente ricerca è stato quello di verificare la presenza di sintomi ascrivibili al mosaico del castagno in diversi areali ricadenti nelle regioni Marche, Emilia-Romagna, Toscana e Trentino-Alto Adige. Per tale problematica segnalata da diversi anni, non si conosceva l'agente causale fino a qualche anno fa e poteva essere mascherato da altre problematiche legate a carenze nutrizionali.

Attualmente, grazie alla conoscenza del genoma del virus del mosaico del castagno, sono disponibili set di primer, che permettono una diagnosi molecolare utilizzando la reazione a catena della polimerasi (PCR). Per cui secondo obiettivo è stato quello di analizzare i campioni (sintomatici e asintomatici), applicando la metodica di diagnosi molecolare, in modo da poter validare tale protocollo su un più ampio range di campioni.

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

3.1 Descrizione dei siti

Per individuare i popolamenti colpiti, sono state effettuate interviste preliminari informali ai responsabili delle associazioni dei produttori, ai proprietari/ gestori ed esperti locali. In base alle segnalazioni ricevute sono stati identificati 21 siti distribuiti lungo Appennini e Prealpi in quattro diverse regioni (Marche, Emilia-Romagna, Toscana e Trentino-Alto Adige) che sono stati scelti per l'indagine (Fig. 7).



Fig. 7: Siti selezionati per l'indagine sulla diffusione del virus del mosaico del castagno.

I diversi siti sono stati indicati nel testo secondo la lettera iniziale della regione seguita da un numero progressivo (Tab. 1). Tutti i siti selezionati sono caratterizzati dalla tradizionale coltivazione del castagno del Marrone, cultivar particolarmente apprezzata per il consumo fresco, e di molte altre cultivar con diversi usi (fresco, essiccato e candito). Per incentivare la produzione di castagne, in questi siti i proprietari, generalmente, pianificano la potatura, l'innesto e lo sfalcio della copertura erbacea per facilitare la raccolta. I residui di potatura e sfalcio sono stati lasciati in campo, arricchendo così il terreno di sostanza organica.

Tab. 1 – Siti, ricadenti nelle regioni Marche, Emilia-Romagna, Toscana e Trentino Alto-Adige in cui sono stati prelevati i campioni di castagno.

Sito ID	Località	Provincia/Regione	Coordinate geografiche
M1	Venamartello	AP - Marche	42.788.288; 13.410.888
M2	Acquasanta Terme - Umito	AP - Marche	42.729.622; 13.403.105
ER1	Selva la Maddalena	BO - Emilia-Romagna	44.240.029; 11.496.345
ER2	Loiano	BO - Emilia-Romagna	44.253.954; 11.333.899
ER3	Ca' di Balloni	BO - Emilia-Romagna	44.265.234; 11.339.537
ER4	Gagnano	BO - Emilia-Romagna	44.245.631; 11.345.321
ER5	Malarbergo 1	MO - Emilia-Romagna	44.223.022; 10.929.023
ER6	Malalbergo 2	MO - Emilia-Romagna	44.223.022; 10.929.023
ER7	Alberelli	MO - Emilia-Romagna	44.231.896; 10.926.836
ER8	Zocca 1	MO - Emilia-Romagna	44.384.805; 10.994.774
ER9	Zocca 2	MO - Emilia-Romagna	44.382.960; 11.007.369
TO1	Castagneto	FI - Toscana	43.937.377; 11.615.097
TN1	Mezzolombarbo	TN - Trentino-Alto Adige	46.226.333; 11.072.695
TN2	Drena	TN - Trentino-Alto Adige	45.962.994; 10.949.407
TN3	Pranzo	TN - Trentino-Alto Adige	45.919.926; 10.821.334
TR4	-	TN - Trentino-Alto Adige	45.925.029; 10.815.196
TR5	Lago	TN - Trentino-Alto Adige	45.927.132; 10.814.403
TR6	Campi	TN - Trentino-Alto Adige	45.911.697; 10.817.839
TR7	Valterigo	TN - Trentino-Alto Adige	46.160.358; 11.163.589
TR8	Mezzocorona	TN - Trentino-Alto Adige	46.203.289; 11.139.945
AD1	Bressanone	BZ - Trentino-Alto Adige	46.358.521; 11.284.808

3.2 Valutazione visiva delle problematiche fitosanitarie

A luglio 2021 è stato effettuato un sopralluogo nei 21 siti selezionati, ed è stata registrata la presenza di piante che presentavano anomalie nella colorazione delle foglie, di sintomi di mosaico e ingiallimento, ascrivibili a infezioni virali o virus simili, nonché malformazioni fogliari. Le piante che mostravano sintomi sono state annotate su una mappa bi-dimensionale e, partendo da queste sono stati raccolti sei rametti della lunghezza di circa 20 cm con 10 foglie. Sono stati prelevati anche campioni fogliari da piante asintomatiche limitrofe a quelle sintomatiche. Per ciascuna delle piante da cui è stato prelevato il campione, è stata effettuata una foto d'insieme e una più particolareggiata per registrare i sintomi. È stata anche fatta, per ciascun sito, una valutazione della diffusione del cinipide galligeno, del mal dell'inchiostro, del cancro corticale, della carenza nutrizionale e del mosaico del castagno, attribuendo al sito valori da 0 a 4: 0= non presente, 1= sporadica presenza (1-5 alberi colpiti), 2 = media presenza (6-10 alberi colpiti), alta (11-15 piante), molto alta (oltre 16 piante).

3.3 Diagnosi del virus del mosaico del castagno

3.3.1 Estrazione del DNA

I campioni sono stati sottoposti all'estrazione del DNA totale seguendo il protocollo proposto da Murolo et al. (2014), che essendo specifico per campioni di vite, ha subito piccole modificazioni per renderlo maggiormente efficiente per piante di castagno. Di seguito si riportano le principali fasi del processo di estrazione (Fig. 8).

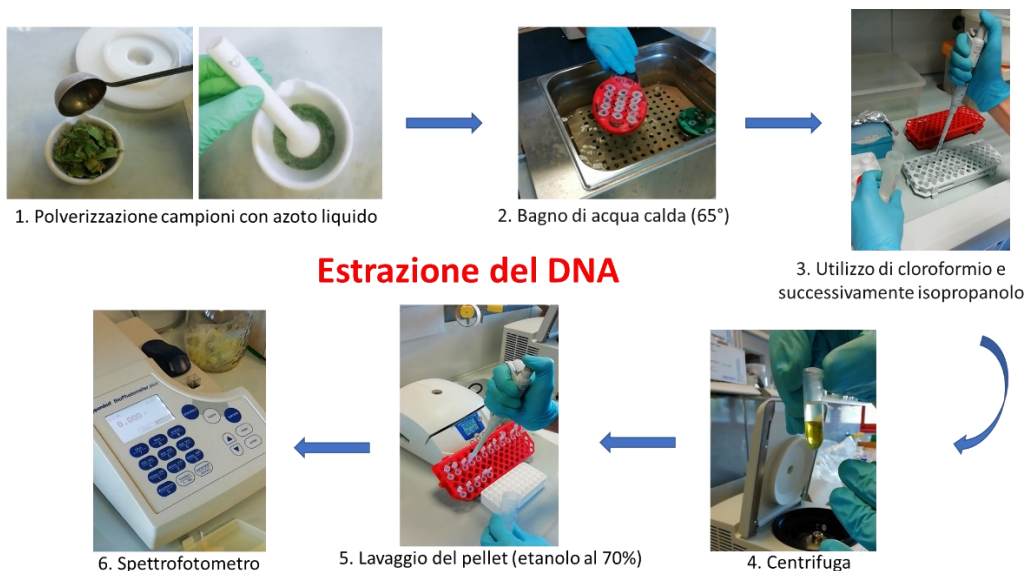


Fig. 8: Schematizzazione delle principali fasi dell'estrazione del DNA da campioni di castagno

- 1) All'interno di mortai sterili è stata aggiunta una spatola (50 mg) di metabisolfito di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) con funzione di antiossidante e 3 ml di CTAB al 3%.
Per ogni pianta campionata sono state selezionate le parti con sintomi del virus del mosico del castagno, quando presenti, sminuzzandone circa 0.5 g. Particolarmente importante la sterilizzazione degli arnesi e del piano di lavoro tra un campione e l'altro con ipoclorito di sodio al 5% ed alcool, per evitare le contaminazioni.
- 2) Le parti vegetali sminuzzate presenti nel mortaio, sono state omogenizzate e il succo verde è stato versato in due eppendorf da 2 ml, filtrando il composto con il pestello in modo da trattenere le parti vegetali più grossolane. Le provette riempite e siglate con nome abbreviato della pianta e numero di campione, finché non verrà iniziato il lavoro di estrazione vero e proprio, saranno conservate in congelatore alla temperatura di -20°C onde evitare la degradazione dell'estratto.
- 3) I campioni sono stati incubati tramite un bagno di acqua calda, sorretti da un porta-eppendorf galleggiante alla temperatura di 65°C per circa 30 min, capovolgendoli ogni 5 min, per facilitare il processo di estrazione. Successivamente, sono stati posti in frigorifero a 4°C per dieci minuti.
La sospensione nelle eppendorf, raffreddata, è stata agitata su vortex alla massima velocità per qualche minuto e in seguito posta in centrifuga per 10 minuti a 8.000 rpm, alla temperatura di 10°C .
- 4) Un'aliquota di 900 μL di surnatante è stata trasferita in provette da 2 mL (stando attenti a non toccare i sedimenti sottostanti) a cui è stato aggiunto un ugual volume di cloroformio, che ha la funzione di denaturare le proteine, che, in seguito, andranno incontro a precipitazione. Le provette sono state messe ad agitare energicamente per qualche minuto tramite l'utilizzo del vortex e per poi essere centrifugate a 12.000 rpm per dieci minuti a 10°C .
- 5) Sempre sotto cappa chimica, è stata prelevata un'aliquota di 700 μL del surnatante che è stato trasferito in provette da 1.5 mL, aggiungendo isopropanolo freddo nella proporzione di 1:1 (per 700 μL di surnatante, 700 μL di isopropanolo) per far avvenire la precipitazione degli acidi nucleici. Dopo aver agitato delicatamente le provette, queste sono state conservate in frigorifero alla temperatura di 4°C per dieci minuti e infine sono state messe in centrifuga per 25 minuti a 13.000 rpm.
- 6) Le provette sono state svuotate, e il pellet (acidi nucleici precipitati) depositato sul fondo è stato lavato con 400 μL di etanolo al 70%, per purificarlo da eventuali Sali residui. Le eppendorf, poste in centrifuga per dieci minuti alla velocità di 13.000 rpm, sono state

svuotate delicatamente, lasciate ad asciugare capovolte su della carta assorbente per eliminare gli eccessi di etanolo.

- 7) Il pellet presente in ciascuna delle provette è stato sospeso in 60 μL di H_2O sterile e conservate in frigo a 4°C in attesa di essere processato.
- 8) È stata valutata la qualità e la quantità degli acidi nucleici estratti. È stato utilizzato un biofotometro che ha permesso di verificare il rapporto 260/280, 260/230 per avere un'idea della qualità del DNA estratto, e la concentrazione per microlitro.

3.3.2 Amplificazione genica (PCR)

La reazione di PCR nota come amplificazione genica, è una tecnica molecolare che consente di rilevare la presenza del DNA target del patogeno all'interno del pool di DNA totale estratto dalla pianta ospite. In particolare, il DNA totale è stato diluito 1:40 e 1 μL è stato utilizzato come template nella reazione di amplificazione che è stata effettuata in 25 μL . La reazione di amplificazione era costituita di 12,5 μL di GT PCR Master Mix 2X (EmeraldAmp, Takara), a cui sono stati aggiunti 1,2 μL dei primer Ch5860F/Ch6093R alla concentrazione di 10 μM . La coppia di primer utilizzati è specifica per la diagnosi del virus del mosaico del castagno (ChMV), un badnavirus caratterizzato da un genoma a DNA. Il programma di amplificazione consisteva in un ciclo di denaturazione iniziale a 95°C per 3 min seguito da tre fasi: denaturazione (95°C per 30 sec), appaiamento dei primer (60°C per 30 sec) ed estensione (72°C per 30 sec), ripetute per 35 cicli, con un ciclo ulteriore di estensione a 72°C per 5 min.

L'amplificazione è stata effettuata in un termociclatore BIORAD T100 che ha permesso di automatizzare le diverse fasi della reazione.

3.3.3 Visualizzazione dei dati dell'amplificazione genica mediante elettroforesi

Al termine dell'amplificazione, è stato predisposto tutto il necessario per la corsa elettroforetica (Fig. 9):

- 1) il gel è stato preparato in un becher da 100 mL. Il TAE 1x è una soluzione composta da Tris base, acido acetico glaciale 100%, EDTA e H_2O . È stato aggiunto 1.5 g di agarosio, portato a ebollizione su di una piastra riscaldante per far sì che il polimero si scioglia, anche grazie all'aiuto di un'ancoretta magnetica in continua rotazione sul fondo del becher. Il tutto viene tolto dalla piastra quando la soluzione diventa trasparente. La soluzione è stata fatta raffreddare a temperatura ambiente;

- 2) Il composto è stato versato in un supporto predisposto facendo attenzione a non creare bolle d'aria (che potrebbero ostacolare la corsa del DNA). Prima che il gel si solidifichi è stato inserito un pettine che determinerà le dimensioni dei pozzetti nei quali saranno caricati i campioni.
- 3) Una volta che il gel si è solidificato, sono stati caricati i campioni precedentemente preparati con un opportuno colorante (il quale fungerà da indicatore di corsa), da sinistra verso destra. Il primo pozzetto è utilizzato per caricare il marker 100 bp, che presenta specifiche bande da 100 a 1000 bp, gli altri di seguito sono stati caricati 10 μ L per ciascun campione analizzato. Nella reazione di amplificazione e quindi anche nel gel sono stati caricati inoltre, il controllo positivo (DNA di ChMV) e un controllo negativo (acqua sterile).
- 4) la cella elettroforetica è stata chiusa, collegata al generatore di corrente. I campioni sono stati fatti correre in tampone TAE a 100 V per 30 minuti. Al termine della corsa, il gel è stato estratto dal supporto per osservarlo ai raggi UV tramite il transilluminatore BIO-RAD Gel Doc XR provvisto di sistema per l'acquisizione di immagini.

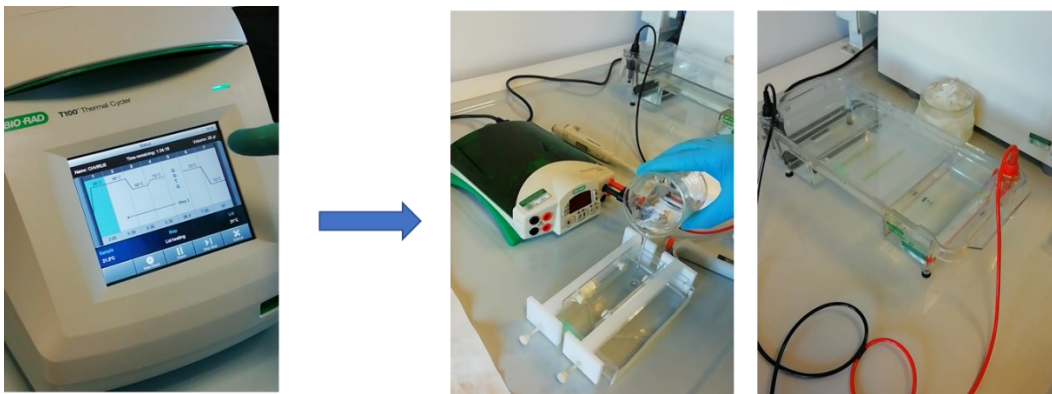


Fig. 9: Termociclatore in cui avviene la reazione di PCR (sinistra), elettroforesi su gel di agarosio per verificare il risultato dell'amplificazione.

CAPITOLO 4: RISULTATI

5.1 Valutazione della situazione fitosanitaria

Durante il rilievo effettuato a luglio 2021, periodo in cui sono particolarmente evidenti i sintomi ascrivibili a diverse problematiche fitosanitarie, è stato possibile verificare la loro diffusione nei diversi siti (Tab. 2).

Tab. 2: Diffusione delle principali problematiche fitosanitarie riscontrate nei diversi siti.

Site ID	Principali problematiche fitosanitarie				
	Mosaico	Carenza nutrizionale	Cancro corticale	Mal dell'inchiostro	Cinipide galligeno
M1	1	1	4	0	1
M2	4	0	4	3	1
ER1	2	2	4	1	1
ER2	1	1	4	0	1
ER3	0	0	4	2	1
ER4	2	0	4	0	1
ER5	1	0	4	0	1
ER6	1	0	4	0	1
ER7	1	0	4	0	1
ER8	2	2	4	0	1
ER9	1	1	4	0	1
ER10	0	1	4	0	1
TO1	3	3	4	0	1
TO2	0	0	4	0	1
TR1	0	0	4	0	1
TR2	0	1	4	1	1
TR3	1	2	4	1	1
TR4	0	2	4	0	1
TR5	1	3	4	0	1
TR6	1	0	0	0	0
AD1	0	1	0	0	0

In particolare, in tutti i siti è stata rinvenuta la presenza molto diffusa di cancro corticale. Dalle osservazioni effettuate nei castagneti è stato possibile distinguere tre tipologie di cancri: evolutivo, cicatrizzante e cicatrizzato (Turchetti e Maresi, 1990; Pennisi *et al.*, 1991; Turchetti *et al.*, 2008). Il cancro evolutivo, associato a isolati virulenti di *C. parasitica*, si manifesta con arrossamenti, imbrunimenti e depressioni della corteccia infetta, profonde fessurazioni e abbondante produzione di picnidi. Questa tipologia di cancro provoca il disseccamento della parte del fusto e i rami sovrastanti l'infezione, con conseguente emissioni di rami epicormici che si dipartono al di sotto del cancro. Il cancro cicatrizzante (Fig. 10 A) e cicatrizzato (Fig. 10 B), associato a isolati ipovirulenti di *C. parasitica*, non porta alla morte della pianta e non provoca l'emissione di rami epicormici.

La risposta della pianta all'infezione è data dalla cicatrizzazione dei tessuti corticali e quindi in questo modo la pianta cerca di liberarsi degli strati superficiali di corteccia morta. Nei cancri cicatrizzati il micelio del fungo è superficiale, presenta ridotta vitalità e assenza di picnidi (Fig. 10 B).



Fig. 10: Tipologie di cancri rinvenuti nei sopralluoghi: cancro cicatrizzante (A), e cancro cicatrizzato (B), associato a isolati ipovirulenti di *C. parasitica*.

Attualmente in Italia il cancro corticale ipovirulento è in genere prevalente nei castagneti e può raggiungere l'80% delle piante, rispetto a quello virulento presente nel 20% (Turchetti e Maresi, 2008; Turchetti *et al.*, 2008). La diffusione naturale dell'ipovirulenza ha permesso di creare un equilibrio, per cui al momento il cancro corticale pur essendo presente non desta particolari problemi.

Il mal dell'inchiostro del castagno è stato rinvenuto con una diffusione elevata soprattutto nel sito M3 nelle Marche, dove è in atto una recrudescenza della malattia che sta determinando la morte di piante secolari come anche di piante giovani (Fig. 11). Nel sito ER1 in Emilia-Romagna e nei siti TR2 e TR3 in Trentino, la diffusione del mal dell'inchiostro è risultata circoscritta a qualche individuo.



Fig. 11: Giovane pianta di castagno con evidenti necrosi a fiamma a livello del colletto (A); pianta secolare debilitata da attacchi di *Phytophthora* sp. (B).

La recrudescenza sia del mal dell'inchiostro in particolari areali, potrebbe dipendere sia da caratteristiche stazionali particolarmente predisponenti per la malattia, sia per il pesante attacco dovuto dal cinipide galligeno che oltre ad avere un impatto negativo sulla produzione, ha determinato un indebolimento delle piante stesse, aprendo la via ad altre problematiche.

Nell'ultimo anno dai rilievi effettuati è emersa sporadica la presenza di galle determinate dal cinipide in tutti i siti e in alcuni casi è stata verificata la loro parassitizzazione. Per cui i lanci effettuati con il parassitoide a partire dal 2014 in tutte le regioni italiane, comincia dare gli effetti desiderati.

Durante l'indagine, un particolare focus è stato riservato agli alberi che presentavano alterazioni cromatiche della chioma e anomalie della forma fogliare. Siamo stati in grado di distinguere due diversi quadri sintomatologici: sintomi a mosaico e ingiallimento.

Il sintomo del mosaico è descritto come macchie di colore verde chiaro e scuro sulle foglie, accompagnate da germogli con deformazione asimmetrica della lamina (Fig. 12).



Fig. 12: Tipico sintomo a mosaico ascrivibile a ChMV.

Questo sintomo è stato riscontrato in modo particolare nelle Marche sito M2, ma anche in Toscana nel sito To1, sporadicamente è stato poi rinvenuto anche nei siti dell'Emilia-Romagna ER1, ER4 e ER8 e in due siti del Trentino TR3 e TR6. Nelle Marche e in Emilia-Romagna, il sintomo era stato già descritto e segnalato in alcuni studi (Mittemberg *et al.*, 1998; Perna, 1999; Antonaroli *et al.*, 2000). In questi studi si ipotizzava che fosse dovuto a fitoplasmi o agenti virali, ma senza alcuna ufficiale conferma. Attualmente è noto che questi sintomi sono associati a un virus appartenente al genere *Badnavirus* (Marais *et al.*, 2021). La sintomatologia riscontrata, dapprima è lieve, poi con il trascorrere della stagione, la gravità aumenta ed è caratterizzato da mosaico brillante, arricciatura fogliare e disseccamento dei margini fogliari.

I sintomi possono coinvolgere pochi germogli o la maggior parte della chioma (Fig.13). La produttività degli alberi è stata drasticamente ridotta, così come il vigore, e raramente gli alberi muoiono.

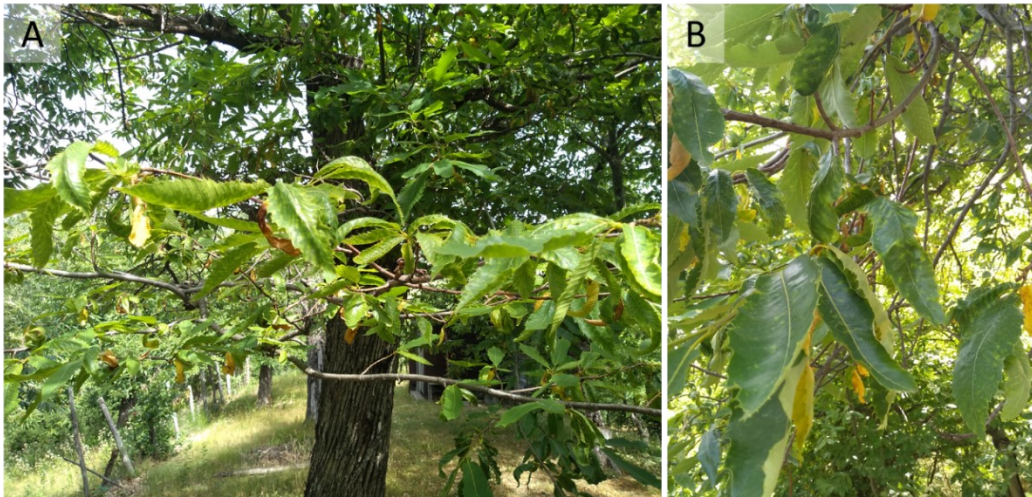


Fig. 13: Sintomi di mosaico del castagno riscontrati in un castagneto in Emilia-Romagna.

Complessivamente, durante le indagini è stato possibile verificare la presenza di sintomi di mosaico su 23 piante, ripartite nelle Marche (5/7), Emilia-Romagna (9/23), Toscana (2/6) e Trentino-Alto Adige (7/34). Mentre i sintomi di ingiallimento sono stati registrati principalmente in Trentino-Alto Adige (8/34) ed Emilia-Romagna (4/23).



Fig. 14: Sintomi di carenza nutrizionale riscontrati su castagni in Trentino.

Un sintomo simile, ma che sembra legato a una carenza nutrizionale, è stato riscontrato in modo particolare in Trentino-Alto Adige e in alcuni siti dell'Emilia-Romagna. Una possibile spiegazione della improvvisa carenza di minerali, pur sempre presenti nel suolo, potrebbe essere data dalle elevate precipitazioni e dall'indebolimento delle piante da parte degli attacchi della vespa cinese che probabilmente hanno anche ridotto la sostanza organica nei suoli, rendendo più difficile l'assorbimento del Mn. In uno studio condotto in Trentino, le stesse piante sintomatiche quando trattate con sostanze minerali di cui erano carenti riprendevano la normale attività vegetativa (Bertoldi *et al.*, 2020).

5.2 Diagnosi molecolare del virus del mosaico del castagno

I campioni raccolti in base alla diversa sintomatologia (mosaico, giallume e asintomatico) sono stati analizzati mediante l'utilizzo di primer disegnati su una corta sequenza target del genoma del virus del mosaico del castagno (ChMV).

Dall'analisi PCR è stato possibile verificare che il ChMV è stato riscontrato nel 76% dei campioni che mostravano sintomi di mosaico (19/25), nel 31,6% dei campioni di quelli che mostravano sintomi di carenza (6/20) e nel 36% di quelli asintomatici (9/25) raccolti nei pressi di quelli sintomatici (Tab. 3).

Tabella 3: Risultati della diagnosi molecolare

Tipologia campioni	Diagnosi molecolare ChMV (n. campioni)		
	positivi	negativi	totale
Asintomatico	9	15	24
Mosaico	19	6	25
Carenza di nutrienti	6	13	19
Carenza e mosaico	1	1	2
Totale	35	35	70

In totale sono stati analizzati 70 campioni di piante di castagno di cui 35 sono risultati positivi. In dettaglio:

- Marche: 7 campioni di cui 6 positivi e 1 negativo;
- Toscana 6 campioni di cui 5 positivi e 1 negativo;
- Emilia-Romagna 23 campioni di cui 15 positivi e 8 negativi;

- Trentino-Alto Adige 34 campioni di cui 9 positivi e 25 negativi.

Segue il dettaglio delle analisi effettuate mettendo per campione non solo il risultato PCR ma anche se era un campione asintomatico, sintomatico con “mosaico” o sintomatico “carenza nutrizionale” (Tab. 4).

Tabella 4: Campioni di castagno analizzati in laboratorio

Siti ID	Codice campione	Provincia	Sintomi	Diagnosi molecolare
M1	AP43	AP	Asintomatico	Neg
M1	AP44	AP	Mosaico	Pos
M2	AP49	AP	Asintomatico	Pos
M2	AP48	AP	Mosaico	Pos
M2	AP39	AP	Mosaico	Pos
M2	AP50	AP	Mosaico	Pos
M2	AP47	AP	Mosaico	Pos
TO1	AP35	FI	Carenza di nutrienti	Neg
TO1	AP42	FI	Mosaico	Pos
TO1	AP36	FI	Asintomatico	Pos
TO1	AP41	FI	Mosaico	Pos
TO1	AP27	FI	Mosaico e carenza di nutrienti	Pos
TO1	AP12	FI	Carenza di nutrienti	Pos
ER1	AP38	BO	Carenza di nutrienti	Neg
ER1	AP37	BO	Mosaico	Neg
ER1	AP28	BO	Asintomatico	Neg
ER5	AP29	MO	Mosaico	Pos
ER5	ND	MO	Asintomatico	Neg
ER7	AP34	MO	Mosaico	Pos
ER7	AP33	MO	Asintomatico	Neg
ER8	AP26	MO	Carenza di nutrienti	Neg
ER8	AP2	MO	Mosaico	Pos
ER8	AP9	MO	Asintomatico	Pos
ER8	AP7	MO	Carenza di nutrienti	Pos
ER8	ND	MO	Asintomatico	Neg
ER8	AP24	MO	Mosaico	Pos
ER8	AP10	MO	Mosaico	Pos
ER9	AP23	MO	Mosaico	Pos
ER9	AP20	MO	Asintomatico	Pos
ER2	AP25	BO	Carenza di nutrienti	Pos
ER2	AP21	BO	Asintomatico	Neg
ER3	ND	BO	Asintomatico	Pos
ER6	AP31	MO	Mosaico	Pos
ER6	AP32	MO	Asintomatico	Pos
ER4	AP13, AP15, AP18	BO	Mosaico	Pos
ER4	AP4	BO	Asintomatico	Pos

TR1	TR1	TN	Asintomatico	Neg
TR2	TR2	TN	Mosaico	Neg
TR2	TR3	TN	Carenza di nutrienti	Neg
TR2	TR4	TN	Asintomatico	Neg
TR2	TR5	TN	Mosaico e carenza di nutrienti	Neg
TR2	TR6	TN	Asintomatico (ex carenza)	Neg
TR3	TR7	TN	Recuperato carenza di nutrienti	Pos
TR3	TR8	TN	Asintomatico	Neg
TR3	TR9	TN	Carenza di nutrienti	Pos
TR3	TR10	TN	Carenza di nutrienti	Neg
TR4	TR11	TN	Asintomatico	Neg
TR4	TR12	TN	Carenza di nutrienti	Neg
TR3	TR13	TN	Carenza di nutrienti	Pos
TR5	TR14	TN	Asintomatico	Neg
TR5	TR15	TN	Carenza di nutrienti	Neg
TR6	TR16	TN	Carenza di nutrienti	Neg
TR6	TR17	TN	Carenza di nutrienti	Neg
TR6	TR18	TN	Asintomatico	Neg
TR7	TR26	TN	Carenza di nutrienti	Pos
TR7	TR27	TN	Mosaico	Pos
TR7	TR28	TN	Mosaico	Pos
TR7	TR29	TN	Carenza di nutrienti	Neg
TR7	TR30	TN	Asintomatico	Pos
TR8	TR31	TN	Mosaico	Pos
TR8	TR32	TN	Mosaico	Neg
TR8	TR33	TN	Mosaico	Pos
TR8	TR34	TN	Asintomatico	Neg
AD1	TR19	BZ	Asintomatico	Neg
AD1	TR20	BZ	Asintomatico	Neg
AD1	TR21	BZ	Carenza di nutrienti	Neg
AD1	TR22	BZ	Mosaico	Neg
AD1	TR23	BZ	Mosaico	Neg
AD1	TR24	BZ	Mosaico	Neg
AD1	TR25	BZ	Carenza di nutrienti	Neg

I campioni sono risultati positivi durante la rilevazione molecolare, hanno mostrato un amplicone specifico di 232 bp (Fig. 15). Questi primer sono stati disegnati nella regione ORF3 del genoma del virus del mosaico del castagno, particolarmente conservata che codifica per la *Ribonucleasi H* (Marais *et al.*, 2021).

Dall'analisi molecolare emerge che il virus è presente in diversi areali dell'Appennino, in cui in tempi passati era stato già segnalato. In Trentino e in Toscana la sua presenza non era stata mai registrata, per cui la presente ricerca costituisce la prima segnalazione in queste aree.

Un altro dato interessante è che l'analisi molecolare oltre a rilevare la presenza del virus in campioni sintomatici "mosaico", ha permesso di diagnosticare l'agente anche in piante apparentemente asintomatiche. In studi condotti in Francia è stato possibile verificare che il 50% dei campioni asintomatici sono risultati infetti da ChMV (Marais *et al.*, 2021). Questi dati sono in accordo con quanto evidenziato in precedenti esperimenti che dimostravano che non tutte le specie/cultivar di castagno sono suscettibili al mosaico del castagno nello stesso modo (Desvignes 1999, 1999; Desvignes e Lecocq, 1995). L'indexaggio biologico effettuato su l'indicatore Maraval, particolarmente suscettibili, rilevò la presenza di infezioni latenti in molte varietà asintomatiche di *C. sativa* o ibridi di *C. sativa* x *C. crenata* (Desvignes 1999, 1999; Desvignes e Lecocq, 1995).

Non tutti i campioni sintomatici "mosaico" sono risultati positivi durante la diagnosi molecolare. Questo dato potrebbe essere dovuto a diverse ragioni, dipendenti dal titolo di virus accumulato, ma anche per la diversità genetica che nelle sequenze virali si può riscontrare.

Il virus è stato trovato anche in campioni che presentavano una sintomatologia ascrivibile a carenza nutrizionale. In alcuni casi potrebbe essere che le due problematiche coesistano e che i sintomi di carenza possano mascherare quelli tipici determinati dal virus.

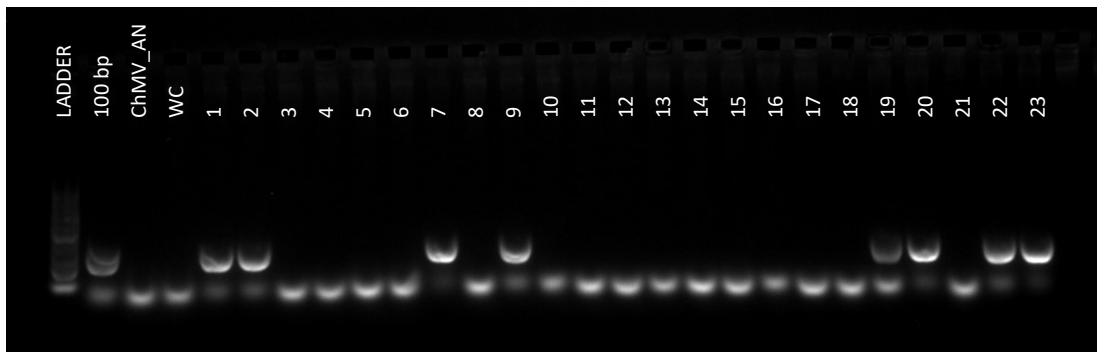


Fig. 15: Risultati dell'amplificazione genica utilizzando primer specifici per il ChMV.

CONCLUSIONI

La presente ricerca è stata focalizzata sulla diffusione del virus del mosaico del castagno (ChMV), in diversi areali castanicoli dell'Appennino nelle regioni Marche, Emilia-Romagna e Toscana) e pre-Alpi (Trentino-Alto Adige). E' stato possibile validare la tecnica molecolare PCR e i primer specifici su un ampio numero di campioni di castagno appartenenti a diverse varietà e con sintomatologie classificate come "mosaico", "carenza nutrizionale" e "asintomatici". Il virus è stato rinvenuto prevalentemente in campioni che mostravano il mosaico, ma è stato anche diagnosticato in campioni apparentemente sani. Questo dato è particolarmente importante ai fini della propagazione del materiale vivaistico. Per cui la possibilità di disporre di un metodo di diagnosi speditivo, basato sull'estrazione del DNA e utilizzo di primer specifici in PCR, potrebbe soprattutto a livello vivaistico di effettuare uno screening rapido andando a individuare "fonti primarie" donatrici sane.

Infine, la presenza del virus anche in piante asintomatiche, merita di essere approfondito nell'ottica di individuare all'interno del germoplasma castanicolo, varietà/accessioni che abbiano una tolleranza/resistenza al virus, che in alcuni contesti e su alcune varietà come quelle marchigiane determina gravi danni alla produzione sia su piante giovani che mature.

BIBLIOGRAFIA

- Antonaroli R., and Perna M. R., 2000. Una fitopatia ad eziologia ancora incerta: il giallume di castagno in Emilia-Romagna e nelle Marche. *Sherwood* 6:43-46.
- Arnaud M.T., Chassany J.P., Dejean R., Ribart J., Queno L., 1997. Economical and ecological disappearance of traditional practices related to chestnut groves. *Journal of Environmental Management* 49: 373-391.
- Bertoldi D., Morelli P., Pedrazzoli F., Delugan S., Deromedi M., Maresi G., 2020. Il giallume del castagno: alcune esperienze in Trentino. *Acta Italus Hortus* 25.
- Bhat A. I., Hohn T., Selvarajan R., 2016. Badnaviruses: The Current Global Scenario. *Viruses*, 8: 177. doi:10.3390/v8060177.
- Borah B.K., Sharma S., Kant R., Anthony-Johnson A.M., Saigopal D.V.R., Dasgupta I., 2013. Bacilliform DNA-containing plant viruses in the tropics: Commonalities within a genetically diverse group. *Mol. Plant Pathol.*, 14: 759-771.
- Conedera M., Krebs P., Tinner W., Pradella M., Torriani D., 2004. The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Veget. Hist. Archaeobot.* 13: 161-179.
- Conedera M., Tinner W., Krebs P., De Rigo D., Caudullo G., 2016. *Castanea sativa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. Pages 78-79 in: European Atlas of Forest Tree Species. J. San-Miguel-Ayanz, D. De Rigo, G. Caudullo, T. Houston Durrant, A. Mauri, eds. Publication Office of the European Union, Luxembourg.
- Desvignes, J. C. 1992. Characterization of the chestnut mosaic. *Acta Hortic.* 309:353-358.
- Desvignes, J. C. 1999a. Mosaique du chataignier. Pages 179-181 in: Maladies à Virus des Arbres Fruitières. CTIFL, France.
- Desvignes, J. C. 1999b. Sweet chestnut incompatibility and mosaics caused by the chestnut mosaic virus (ChMV). *Acta Hortic.* 494:451-454.

- Desvignes, J. C., and Cornaggia, D. 1996. Mosaique du chataignier: Transmission par le puceron *Myzocallis castanicola*. *Phytoma* 481:39-41.
- Desvignes, J. C., and Lecocq, G. 1995. New knowledges on the chestnut mosaic virus disease. *Acta Hortic.* 386:578-584.
- Gabrielli A., 1994. La civiltà del castagno. *Monti e boschi*, 65, 3.
- Gambino G., Perrone I., and Gribaudo I., 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem. Anal.* 19:520-525.
- Gualaccini G., 1958. Una virosi nuova del castagno. *Boll. Staz Patol. Veg. Roma* 16:67-75.
- Lockhart B.E.L., Olszewski N.E., 1994. Plant virus badnavirus group. In *The Encyclopedia of Virology*; Webster, R.G., Granoff, A., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA; 139-143.
- Marais A., Murolo S., Faure C., Brans Y., Laure C., Maclot F., Massart S., Chiumenti M., Minafra A., Romanazzi G., Lefebvre M., Barreneche T., Robin C., Petit R. J., Candresse T., 2021. Sixty years from the first disease description, a novel badnavirus associated with Chestnut Mosaic Disease. *Phytopathology*, 111: 1051-1058.
- Maresi G., Battisti A., Maltoni A., Turchetti T., 2014. Gestione dei boschi di castagno e problematiche fitosanitarie. *Atti del Secondo Congresso Internazionale di Selvicoltura*. Vol. 1, p. 148-154
- Mariotti B., Maresi G., Maltoni A., 2009. Tradizione, innovazione e sostenibilità: una selvicoltura per il castagno da frutto. *Atti del Terzo Congresso Nazionale di selvicoltura: per il miglioramento e la conservazione dei boschi italiani*. Pp. 851-857.
- Medberry S.L., Lockhart B.E.L., Olszewski N.E., 1990. Properties of *Commelina* yellow mottle virus's complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest that it is a pararetrovirus. *Nucleic Acids Research*, 18(18): 5505–5513
- Mittempergher L., Sfalanga A., 1998. Chestnut yellows: a new disease for Europe. *Phytopathologia Mediterranea*, 37: 143-145.
- Murolo S., De Miccolis Angelini R.M., Faretra F., Romanazzi G., 2018. Phenotypic and Molecular Investigations on Hypovirulent *Cryphonectria parasitica* in Italy. *Plant Dis.* 102: 540-545.

- Murolo S., Mancini V., Romanazzi G., 2014. Spatial and temporal stolbur population structure in a cv. Chardonnay vineyard according to *tom1* gene characterization. *Plant Pathology* 63: 700-707.
- Pennisi A.M., Granata G., Sidoti A., 1991. Diffusione ed aspetti micologici di *Cryphonectria parasitica* in Calabria e Sicilia. *Micologia Italiana*, 3: 21-26.
- Perna M.R., 1999. Malattia del castagno non conosciuta. Regione Marche Agricoltura, 1: 24-25.
- Pignatti S., 1982. Flora d'Italia. Volume primo, Edagricole, Bologna: 113.
- Staginnus C., Iskra-Caruana M. L., Lockhart B., Hohn T., and Richert-Pöggeler K. R. 2009. Suggestions for a nomenclature of endogenous pararetroviral sequences in plants. *Arch. Virol.* 154:1189-1193.
- Turchetti T., Ferretti F., Maresi G., 2008. Natural spread of *Cryphonectria parasitica* and persistence of hypovirulence in three Italian coppiced chestnut stands. *Forest path.* 38 (4):227-243.
- Turchetti T., Maresi G., 1990. Indagini sulla diffusione naturale degli isolati ipovirulenti di *Cryphonectria parasitica* in alcuni cedui di castagno. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2: 89-98.
- Turchetti T., Maresi G., 2006. Management of disease in chestnut orchards and stands: a significant prospect. *Adv. Hort Sci.* 20 (1): 33-39.
- Vettraino, M., Vannini, A., Flamini, L., Lagnese, R., Pizzichini, L., Talevi, S., and Fulbright, D. W., 2005. A new transmissible symptomatology on sweet chestnut in Italy. *Acta Hort.* 693: 547-550.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare lo voglio rivolgere al Dott. Maresi (Fondazione E. Mach, San Michele all'Adige), grande conoscitore del castagno e delle problematiche fitosanitarie, per la sua estrema disponibilità e per aver condiviso le sue conoscenze, guidandoci alla scoperta dell'Appennino.

Inoltre, ringrazio tutti i responsabili delle Aziende coinvolte Santini (Agriturismo Laga Nord, Umito-Acquasanta Terme), Fogacci Stefano (Azienda Tizzano. Zocca, MO), Elmi (Centro Frutta. Castiglione dei Pepoli, BO), che hanno collaborato durante le fasi di segnalazione e raccolta dei campioni.