



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE FORESTALI E AMBIENTALI

**MAL DELL'INCHIOSTRO DEL CASTAGNO
NELLE MARCHE: PRIME PROVE DI
CONTROLLO**

Chestnut Ink Disease in Marche Region: first control trials

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
ALESSANDRO FABI

Relatore:
PROF. SERGIO MUROLO

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Dedico la tesi alla mia famiglia,
ai miei amici;
alle persone che mi vogliono bene,
e nonno Nando che mi ha passato la passione.

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE	6
RIASSUNTO	8
1 INTRODUZIONE	9
1.1 Il castagno: inquadramento sistematico	9
1.2 La castanicoltura in Italia e nella regione Marche	10
1.2.1 Gestione Selvicolturale	13
1.2.2 Patrimonio varietale del castagno nel Piceno (aggiungere le nuove varietà ..	14
1.3 Principali malattie del castagno	14
2 MAL DELL'INCHIOSTRO DEL CASTAGNO	19
2.1 Cenni storici.....	19
2.2 Ciclo Biologico di <i>Phytophthora</i>	20
2.3 Sintomatologia.....	22
2.4 Ambiente di diffusione	24
3 METODI DI LOTTA	27
4 OBIETTIVI	29
5 MATERIALI E METODI	30
5.1 Siti d'indagine.....	30
5.2 Rilievo fitosanitario nell'area studio.....	31
5.3 Raccolta dei campioni di suolo e radici	32
5.4 Analisi di laboratorio	33
5.4.1 Setacciamento del suolo e recupero dei campioni radicali.....	33
5.4.2 Estrazione del DNA e amplificazione genica.....	33
5.4.3 Sequenziamento e analisi metagenomica	34
5.4.4 Test di antagonismo in vitro.....	34
5.5 Prove di controllo del mal dell'inchiostro mediante apporto di sostanza organica al suolo.....	36

6	RISULTATI	38
6.1	Rilievo fitosanitario all'interno dell'area studio	38
6.2	Risultati analisi di laboratorio e prove di antagonismo in vitro.....	41
6.3	Prova preliminare di controllo del mal dell'inchiostro del castagno	46
7	CONCLUSIONI	47
8	BIBLIOGRAFIA	48

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1-1: Principali malattie fungine.....	15
Tabella 6-1: Indice di inibizione che i formulati biologici hanno espresso nel contenimento dello sviluppo di <i>P. cambivora</i>	42
Tabella 6-2: Indice di inibizione che i formulati biologici hanno espresso nel contenimento dello sviluppo di <i>P. plurivora</i>	44

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Infiorescenza (A), Fruto e seme di castagno (B), Foglia (C)	10
Figura 1-2: Areale di distribuzione del castagno in Italia	11
Figura 1-3: Percentuale di superficie destinata a castagneti da frutto e da legno in Italia.	12
Figura 1-4: Marciume gessoso delle castagne, determinato da <i>Gnomoniopsis</i> (foto Maresi).	16
Figura 1-5: Sintomi delle principali malattie di origine fungina che possono essere rinvenute nei castagneti: carie del legno (A, B), fersa (C), oidio (D), cancro (E) e mal dell'inchiostro (F)	17
Figura 2-1: Ciclo biologico degli Oomiceti.	20
Figura 2-2: Micelio (A), anteridio e oogonio (B) e sporangi di <i>Phytophthora cambivora</i> (D).	21
Figura 2-3: Sintomi determinati da mal dell'inchiostro su piante di castagno.	22
Figura 2-4: Morte di piante di castagno secolari per mal dell'inchiostro (A), sintomo specifico rappresentato da imbrunimento alla base del tronco (B)	23
Figura 2-5: Linee di scorrimento di acqua e fango	25
Figura 5-1: Mappa con confini dell'area di studio presso Acquisanta Terme fraz. Pozza.	30
Figura 5-2: Immagini area di studio nel periodo del sopralluogo (01.06.2022).	31
Figura 5-3: Operazioni di scavo e raccolta dei campioni di suolo.	32
Figura 5-4: Caratteristiche dei formulati biologici utilizzati nella presente ricerca.....	35
Figura 6-1: Rilievo area 1/06/22	38
Figura 6-2: Pianta morta in piedi (A), pianta fortemente colpita con chioma disseccata tra il 30% e il 50% (B), Pianta sana (C)	39
Figura 6-3: Piante morte per mal dell'inchiostro e capitozzate, raggruppate all'interno dell'area studio	40
Figura 6-4: Sintomi specifici di necrosi a livello del colletto, riscontrati durante il sopralluogo all'interno dell'area studio.....	41

Figura 6-5: Colonie di <i>P. plurivora</i> e <i>P. cambivora</i> , allevate alla temperatura di 22°C su substrato a base di estratto di patate	42
Figura 6-6: Test di antagonismo <i>in vitro</i> , in cui è stata allevata in piastra <i>Phytophthora cambivora</i> in presenza dei quattro formulati commerciali (Pikalín, Serenade, Bion e LAL Stop).....	43
Figura 6-7: Test di antagonismo <i>in vitro</i> , in cui è stata allevata in piastra <i>Phytophthora plurivora</i> in presenza dei quattro formulati commerciali (Pikalín, Serenade, Bion e LAL Stop)	45
Figura 6-8: Rilievo fitosanitario effettuato il 21/07/2022 all'interno dell'area studio.	46

RIASSUNTO

*Nelle Marche la diffusione del castagno è concentrata nel Piceno, soprattutto nei comuni di Acquasanta Terme, Arquata del Tronto, Montegallo, Montemonaco e Roccafluvione. Il castagno è soggetto ad attacchi da parte di numerosi patogeni, per lo più di origine fungina, in grado di causare danni gravi in tutti gli organi della pianta sia ipogei che epigei. Il mal dell'inchiostro è la seconda malattia più diffusa e pericolosa a carico del castagno, è originaria del Nord America. Scopo della presente tesi è stato quello di verificare in prove preliminari la possibilità di contenere il mal dell'inchiostro del castagno. Le ricerche sono state effettuate nella regione Marche in un castagneto da frutto, ubicato nella provincia di Ascoli Piceno nel comune di Umito, una frazione di Acquasanta Terme. Il rilievo è avvenuto durante il periodo primaverile-estivo in due date differenti, andando a geo-referenziare le piante e riportando su una scheda lo stato di salute. Da piante sintomatiche e asintomatiche sono stati raccolti campioni di suolo e radici su cui mediante analisi di laboratorio è stata riscontrata la presenza di *Phytophthora*. In laboratorio è stata poi allestita una prova di antagonismo in vitro mettendo a crescere *P. cambivora* e *P. plurivora* in presenza di quattro diversi formulati commerciali a base di antagonisti microbici (*Bacillus* e *Streptomices*) e composti naturali che stimolano le difese della pianta (BTH, fosfito). Tutti i formulati utilizzati a tre diverse dosi hanno efficacemente rallentato e bloccato la crescita del micelio di *Phytophthora*. È stata anche avviata una prova di controllo del mal dell'inchiostro andando a somministrare alle piante di castagno presenti nell'area studio un concime a base di sostanza organica pellettata (pollina). Dal rilievo effettuato a distanza di 58 giorni dalla somministrazioni non sono state rilevate differenze significative, ma una stabilità dello stato sanitario che non è peggiorato.*

1 INTRODUZIONE

1.1 Il castagno: inquadramento sistematico

Il castagno europeo è un albero longevo che appartiene alla famiglia delle *Fagaceae*, alto in media dai 15 ai 20 metri, capace di raggiungere altezze di 30–35 metri e 6–8 metri di circonferenza. Il fusto e i rami presentano, nei primi anni, una corteccia liscia, brillante, che presenta lenticelle trasversali allungate. Il colore alla nascita è bruno-rossastro, poi col tempo diventa grigio olivaceo. Dopo 10-15 anni la corteccia si presenta di colore grigio-bruno con profonde screpolature in senso longitudinale (Bounous *et al.*, 2002).

Le foglie sono caduche e disposte alternativamente, la forma è ellittico-lanceolata, sono dentate ai bordi, con apice acuminato e base leggermente cuneata, misurano da 8 a 10 cm in lunghezza e da 3 a 6 cm in larghezza. La loro consistenza è piuttosto tenace, quasi coriacea. La pagina superiore è lucida di colore verde scuro, quella inferiore è opaca di colore verde più chiaro (Fig. 1-1 c).

Le infiorescenze (Fig. 1-1 a) sono formate da fiori unisessuali, monoici e poligami, portati sulla vegetazione dell'anno che quindi si evolvono solo a foliazione completa: i fiori maschili o staminiferi sono portati in infiorescenze lunghe da 10 a 20 cm; i fiori femminili o pistilliferi, meno numerosi, solitari o aggregati in numero di 2 o 3 fino a 7, sono localizzati alla base delle infiorescenze staminifere e sono protetti da un involucre verde, squamoso, destinato a costruire la cupola, comunemente detta riccio, di colore verde dapprima, giallo-marrone a maturità. Il riccio, contrariamente a quanto si pensa è il frutto mentre la castagna è il seme. Nelle cultivar da frutto, i singoli fiori inseriti sugli amenti sono sterili, non producono cioè polline. Le piante di queste cultivar sono femminili per aborto dell'androceo, per allegare il frutto esse hanno quindi bisogno dell'apporto di polline da parte di altre piante con fiori maschili, altrimenti non si avrà una efficiente impollinazione e i ricci risulteranno vuoti. Non tutti i fiori allegano, per cui ogni infiorescenza può portare alla formazione di una o due castagne, raramente tre (Bounous *et al.*, 2002).

Il frutto è un achenio incluso in una cupola spinescente, il riccio. La forma delle castagne è determinata, oltre che da caratteri genetici anche dalla posizione all'interno del riccio: è emisferica per i frutti laterali invece è appiattita per quelli centrali. Le castagne hanno un

pericarpo liscio e resistente di un colore che va dal marrone chiaro al bruno con presenza di striature longitudinali. Sulla parte distale della castagna è posta la torcia costituita dai resti pelosi degli stili del fiore, mentre sulla parte basale si trova l'ilo o cicatrice ilare, un'area di colore più chiaro dal resto del frutto. All'interno del frutto si trova la parte edule, cioè il seme, caratterizzato da una polpa chiara e consistente, divisa in porzioni irregolari da setti membranacei costituenti l'episperma, una pellicola rosso-bruna detta pula, che riveste l'intero seme (Fig. 1-1 b). La causa della maggior o minor aderenza dell'episperma al seme è correlata alla presenza di polifenoli accumulati nell'episperma medesimo (Tanaka *et al.*, 1998).

Le piante di castagno innestate, ovvero quelle che produrranno i marroni, sono le ultime ad entrare in vegetazione, a perdere le foglie e a portare a termine la maturazione dei frutti. E' una pianta molto vulnerabile alle anomalie climatiche stagionali, mentre presenta una buona resistenza alle malattie crittogamiche che colpiscono le foglie. Il frutto è caratterizzato da sapore dolce e profumato, dimensioni di media grandezza, con peso attorno ai 60 grammi, forma arrotondata, buccia rossastra con strie longitudinali più scure. La cicatrice dell'ilo è piccola e presenta margini sinuosi provvisti di peli. Ciò distingue il frutto del marrone da quello delle altre castagne che, invece presentano un ilo largo a margini lisci.

Una pianta di castagno adulta in condizioni ottimali di suolo e di clima, può dare un prodotto medio annuo di 40-50 kg di prodotto fresco. La produzione inizia verso il quindicesimo anno ed è pari a 20-30 kg per anno. Per ettaro in media può produrre da una a due tonnellate e la massima produzione si ottiene a 80-100 anni di età.



Figura 1-1: Infiorescenza (A), Fruto e seme di castagno (B), Foglia (C).

1.2 La castanicoltura in Italia e nella regione Marche

In Italia, il castagno vegeta nel piano medio montano dell'Appennino e delle Isole e nel piano basale delle Prealpi e delle Alpi. In particolare, il castagno cresce nelle regioni montuose temperate ed è coltivato fra i 500 e i 1000 m s.l.m. a seconda della latitudine delle zone di impianto. Vegeta bene in zone con esposizione nord o nord-est poiché meno esposte ai periodi

siccitosi estivi e con minor escursioni termiche. È una pianta con temperamento mesofilo e si adatta a temperature medie annue comprese tra gli 8°C e i 15°C e resiste bene alle basse temperature invernali fino ai -20°C, i danni si verificano con temperature inferiori ai -25°C.

Per quanto riguarda la natura fisico-chimica del suolo predilige terreni a reazione acida con un pH non superiore a 6,5. I suoli devono essere sciolti, profondi e ricchi in potassio e fosforo. Il castagno viene considerato una specie calcifuga in quanto vive lontano da suoli ricchi di calcio disponibile. Esige terreni fertili per una buona crescita e una buona produzione di frutti.



Figura 1-2: Areale di distribuzione del castagno in Italia.

Il castagno è inserito in un contesto di boschi misti di caducifoglie, insieme a querceti, cerrete ed orno-ostrieti. L'ultimo Inventario Nazionale delle Foreste (2005) riporta che in Italia il castagno è presente su 788.000 ha, pari al 7,5% della superficie forestale e al 2,6% di quella territoriale (Fig. 1-2). La superficie castanicola è costituita per circa il 24% da castagneti da frutto e selve castanili, per il 76% da cedui da legno (Fig. 1-3).

La castanicoltura da frutto italiana vive una lenta ma costante crisi sia sul mercato interno che sui mercati internazionali. I fattori principali sono stati, la diffusione di gravi malattie

fungine (cancro corticale e mal dell'inchiostro), l'abbandono delle campagne e delle montagne verso i centri urbani e, infine, anche il cambiamento dei gusti conseguente alle nuove opportunità alimentari. Da un censimento sull'agricoltura fatto nel 2007 risulta che dal 1970 al 2007 le aziende si sono ridotte del 51,3% e la superficie investita a castagneto da frutto si è di conseguenza contratta del 47,5%.

L'Italia con una produzione di 35000 tonnellate (Stima Coldiretti 2020) rimane tra i più importanti attori sul mercato internazionale insieme alla Cina, la quale produce 1.8 milioni di tonnellate oltre $\frac{3}{4}$ del raccolto globale. Dal punto di vista Europeo l'Italia è la seconda nazione per produzione di castagne circa il 16%.

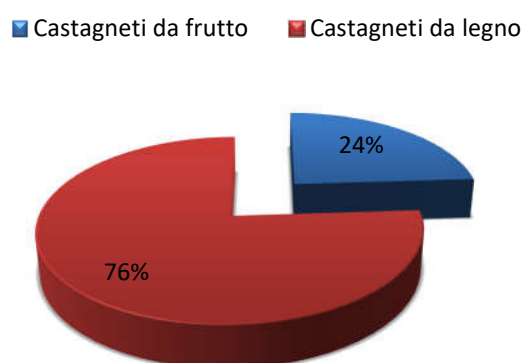


Figura 1-3: Percentuale di superficie destinata a castagneti da frutto e da legno in Italia.

Nel 2020 l'Italia ha importato 24.576 tonnellate di castagne, volumi in netto calo (-25,3%) rispetto alle quasi 33.000 tonnellate del 2019, per un controvalore di circa 59 milioni di € (-28,4% su base annua). Come anticipato, la dinamica è da ascrivere principalmente al graduale aumento nelle ultime campagne del raccolto nazionale, che ha ridotto la necessità di importare prodotto estero per soddisfare le esigenze dell'industria dolciaria e dei confezionatori. Negli ultimi anni la Turchia è diventata il principale fornitore di castagne dell'Italia, soppiantando il Portogallo. Nel 2020 sono arrivate quasi 6.500 tonnellate di castagne turche (-42,3% in rapporto al 2019), mentre il Portogallo ha fornito all'Italia circa 5.500 tonnellate di prodotto (-27,2%). Il terzo paese in classifica è la Grecia con 4.800 tonnellate (+20,6%), seguita dalla Spagna (3.000 tonnellate, -42,4%) e dal Cile, che rifornisce l'Italia in contro-stagione (1.750 tonnellate, -2,9%). Insieme queste cinque nazioni rappresentano l'88% dell'import nazionale di castagne in volume (Elaborazioni EF su dati Comtrade).

Le esportazioni nazionali di castagne nel 2020 ammontano a 16.220 tonnellate, quantitativo nettamente superiore (+15,4%) rispetto a quello registrato nel 2019. Relativamente alla tipologia di prodotto, le castagne in guscio hanno una quota dell'83% (13.401 tonnellate) e le sgusciate il restante 17% (2.819 tonnellate). Da sottolineare la maggiore incidenza dello sgusciato nelle spedizioni italiane rispetto alla media mondiale (9%), che evidenzia la capacità delle imprese nazionali di creare valore aggiunto importando materia prima per poi esportare un prodotto lavorato. Il valore 2020 dell'export italiano è stato di circa 68,5 milioni di €, con un +14,6% su base annua. I principali mercati di sbocco sono in Europa (Germania, Francia, Svizzera, Austria) e Nord America (Stati Uniti e Canada), anche se negli ultimi anni sta gradualmente crescendo il peso dell'Estremo Oriente (Giappone e Malesia) nonostante la concorrenza del prodotto di origine cinese e coreano (Elaborazioni EF su dati Comtrade).

I dati ISTAT del 2021, evidenziano che la superficie coltivata a castagneti è concentrata principalmente in cinque regioni: Campania (15.000 ha), Calabria (6.830 ha), Lazio (4.040 ha), Toscana (2.900 ha) e l'Emilia-Romagna (2.200).

Nelle Marche la diffusione del castagno è concentrata nel Piceno, in particolare nell'Alta Valle del Tronto, il quale si va a svilupparsi su substrati arenacei e pelitico-arenacei e possono essere associati, a seconda delle stazioni e delle zone, a querceti decidui (roverella, cerro, rovere), orno-ostrieti, aceri e faggete. Nella parte centro-meridionale della regione i castagneti costituiscono un'associazione legata all'ord. *Quercetalia robori - petraeae* denominata *Melampyro italici - Castaneetum sativae* e un'associazione legata all'ambito dell'ord. *Fagetalia sylvaticae* denominata *Cardamino heptaphyllae - Castaneetum sativae*. Anche nella regione Marche i castagneti hanno subito una forte contrazione soprattutto a causa di problemi fitosanitari, ma anche a prezzi non remunerativi del prodotto.

In base all'Inventario Regionale, i castagneti contribuiscono con 4600 ettari alla superficie forestale delle Marche pari all'1,8% del totale. In particolare, il castagneto da frutto privato con superficie di circa 1150 ha rappresenta lo 0,4% della superficie boscata regionale. La distribuzione è concentrata, per il 90% nei comuni di Acquasanta Terme, Arquata del Tronto, Montegallo, Montemonaco e Roccafluvione e un piccolo nucleo è presente in provincia di Pesaro-Urbino, nell'Alto Montefeltro (Inventario e Carta Forestale della Regione Marche – I.P.L.A.).

1.2.1 *Gestione Selvicolturale*

La maggior parte delle superfici castanicole da frutto nel Piceno sono interessate da cure colturali ricorrenti e sono oggetto della preparazione alla raccolta. Castagneti da frutto gestiti con grande dedizione si trovano soprattutto nelle località di Pozza e Umito di Acquasanta

Terme, Faete e Spelonga di Arquata del Tronto, e nei comuni di Roccafluvione e Montegallo. Nonostante i danni causati dai problemi fitosanitari, i soprassuoli produttivi, in cui sono presenti anche esemplari maestosi, sono oggetto di potature di rimonda e ringiovanimento, capitozzature, taglio di ceppaia, innesto generalmente a zufolo, uso di mastici cicatrizzanti sui tagli, ripulitura del sottobosco.

Oltre ai castagneti da frutto, in funzione delle caratteristiche edafiche, in modo particolare per quanto concerne il pH del suolo, sono stati individuati due tipologie: (a) Castagneto neutrofilo ceduo a struttura irregolare e (b) Castagneto acidofilo ceduo a struttura irregolare. Il primo è il più diffuso e costituisce estesi nuclei in tutta la vallata del Tronto e nel Fermano (Comunità montana dei Sibillini). Il Castagneto acidofilo è, invece, localizzato nell'alta Valle del Tronto e del Fluvione (Montegallo, Rigo, Pizzo Cerqueto), a quote comprese fra 1100 e 1400 m, su versanti con esposizione settentrionale e suoli mediamente evoluti. Spesso si dispone in nuclei di modeste dimensioni inseriti in una matrice a prevalenza di faggio. Questi castagneti si caratterizzano per l'abbondante presenza di specie acidofile e mesofile come *Erica arborea*, *Luzula sieberi sicula*, *Vaccinium myrtillus*, *Avenella flexuosa*, *Pyrola rotundifolia*.

1.2.2 *Patrimonio varietale del castagno nel Piceno (aggiungere le nuove varietà*

Le cultivar ancora coltivate nel Piceno risultano essere “Zita”, “Tallacano”, “Pallante”, “Primutica”. Tra le cultivar di castagno, la cultivar Primutica conserva il vantaggio della precocità di maturazione. Da un'indagine condotta nella metà del secolo, i marroni di Ascoli Piceno, Acquasanta Terme, Arquata del Tronto, come anche “Zita gentile” e “Tallacano” (Breviglieri *et al.*, 1955) risultano tra le cultivar più apprezzate in Italia. Recentemente sono state censite nell'albo regionale alcune accessioni di marrone (Marrone classico, Marrone gentile, Marrone di Pievebovigliana, Marroncino dell'Ascensione), riconosciute su base morfologica e su base genetica (Urbinati e Micheletti, 2021; Alessandri *et al.*, 2022)

1.3 **Principali malattie del castagno**

Il castagno è soggetto ad attacchi da parte di numerosi patogeni, per lo più di origine fungina, in grado di arrecare danni anche molto gravi su tutti gli organi della pianta sia ipogei che epigei (Tabella 1-1).

I funghi che interessano il frutto sono diversi (*Phomopsis endogena*, agente della mummificazione delle castagne; *Ciboria batschiana*, agente del marciume nero;

Colletotrichum acutatum, agente del marciume rosa; *Penicillium* spp., agente della muffa verde; *Aspergillus* spp. agente della muffa giallastra). Negli ultimi anni si è scoperto un nuovo patogeno fungino responsabile del “marciume bruno” o “marciume gessoso” delle castagne (*Gnomoniopsis castaneae*).

Tabella 1-1: Principali malattie fungine.

Malattie	Agenti causali	Parti colpite
Marciume nero delle castagne	<i>Ciboria batschiana</i>	Frutti
Mummificazione delle castagne	<i>Phomopsis endogena</i>	
Marciume gessoso delle castagne	<i>Gnomoniopsis castanea</i>	
Fersa del castagno	<i>Mycosphaerella maculiformis</i>	Foglie
Mal bianco Cancro corticale	<i>Microsphaera alphitoides</i> <i>Cryphonectria parasitica</i>	
Carie del legno	<i>Fomes fomentarius</i> <i>Hypholoma fasciculare</i> <i>Stereum</i> <i>Trametes versicolor</i>	Fusto/tronco
Mal dell'inchiostro	<i>Phytophthora</i> spp	Apparato radicale
Marciume radicale fibroso	<i>Armillaria mellea</i>	

I sintomi del marciume gessoso sono rilevabili alla raccolta, solo all'interno dei frutti. Esternamente le castagne colpite, infatti, non mostrano alcuna anomalia ma appaiono morbide al tatto. Al taglio, il colore dell'endosperma vira al bruno e la polpa infetta risulta molle e spugnosa (Fig. 1-4). Con il progredire dei sintomi l'endosperma diventa duro, bianco e gessoso. I sintomi appaiono inizialmente al margine dell'endosperma e si estendono successivamente ai cotiledoni, con conseguente aspetto mummificato delle castagne. I frutti acquistano un sapore sgradevole e non sono più commercializzabili. La sintomatologia descritta può manifestarsi anche in post-raccolta, nonostante i trattamenti effettuati ai fini della conservazione (curatura, termoterapia, ecc.). Le castagne, infatti possono essere già infette internamente dal fungo al momento della raccolta senza manifestare alterazioni dell'endosperma.



Figura 1-4: Marciume gessoso delle castagne, determinato da *Gnomoniopsis* (foto Maresi).

In annate particolarmente umide la vegetazione può essere attaccata dalla fersa (Fig. 1-5 C) (*Mycosphaerella maculiformis*), caratterizzata da macchioline necrotiche sulle foglie e sui piccioli che vanno incontro a filloptosi anticipata. I giovani ricacci si possono ricoprire con il caratteristico micelio bianco del fungo *Microsphaera alphitoides*, agente dell'oidio (Fig. 1-5 D).

I patogeni che attaccano il tronco, determinando la “carie del legno” (Fig. 1-5 A e B), in gran parte funghi basidiomiceti in grado di degradare per via enzimatica la lignina e la cellulosa dei tessuti legnosi che vengono così ridotti in ammassi spugnosi o polverulenti. Tali agenti compromettono la funzione meccanica di sostegno della pianta, rendendola più suscettibile allo schianto.

Il tronco come anche le branche e i rami legnosi sono attaccati frequentemente dal cancro corticale del castagno (Fig 1-5 E) causato da *Cryphonectria parasitica* (sin. *Endothia parasitica*), endemico su *Castanea crenata* e *C. mollissima* in Giappone e in Cina, ma che è stato introdotto accidentalmente negli Stati Uniti con l'importazione di materiale infetto, dove ha distrutto castagni centenari. In corrispondenza del punto di penetrazione del patogeno, si producono delle aree color rosso ruggine leggermente depresse (ipertrofia) con un contorno ellittico più o meno irregolare e leggermente rilevato. Il disseccamento dei rami e del tronco procede verso il basso e provoca una perdita di vitalità che induce la pianta a rispondere, data la soppressione della dominanza apicale, con la produzione di rami avventizi, soggetti anch'essi ad un successivo disseccamento. Anche in Europa tale problematica è arrivata negli anni '40, ma l'impatto è stato meno grave in quanto *C. sativa* è meno suscettibile alla *C. parasitica* e soprattutto alla presenza di ceppi di *C. parasitica* ipovirulenti, iperparassitizzati da *Cryphonectria hipovirus 1* (CHV-1). Studi successivi hanno dimostrato che il virus è trasmissibile da ceppi ipovirulenti a virulenti con lo scambio di materiale citoplasmatico

durante l'anastomosi ifale, e proprio su questa caratteristica si sono basate negli anni le sperimentazioni sulla *C. parasitica* e le sue strategie di lotta e contenimento (Maresi et al., 2008; Murolo et al., 2018; Rigling e Prospero, 2018). Più recentemente sono stati effettuati in condizioni controllate nelle Marche anche tentativi di controllo del cancro corticale mediante l'utilizzo di potenziali microrganismi antagonisti in alcuni casi già commercializzati sottoforma di formulati anche se non autorizzati per il castagno (Murolo *et al.*, 2019).

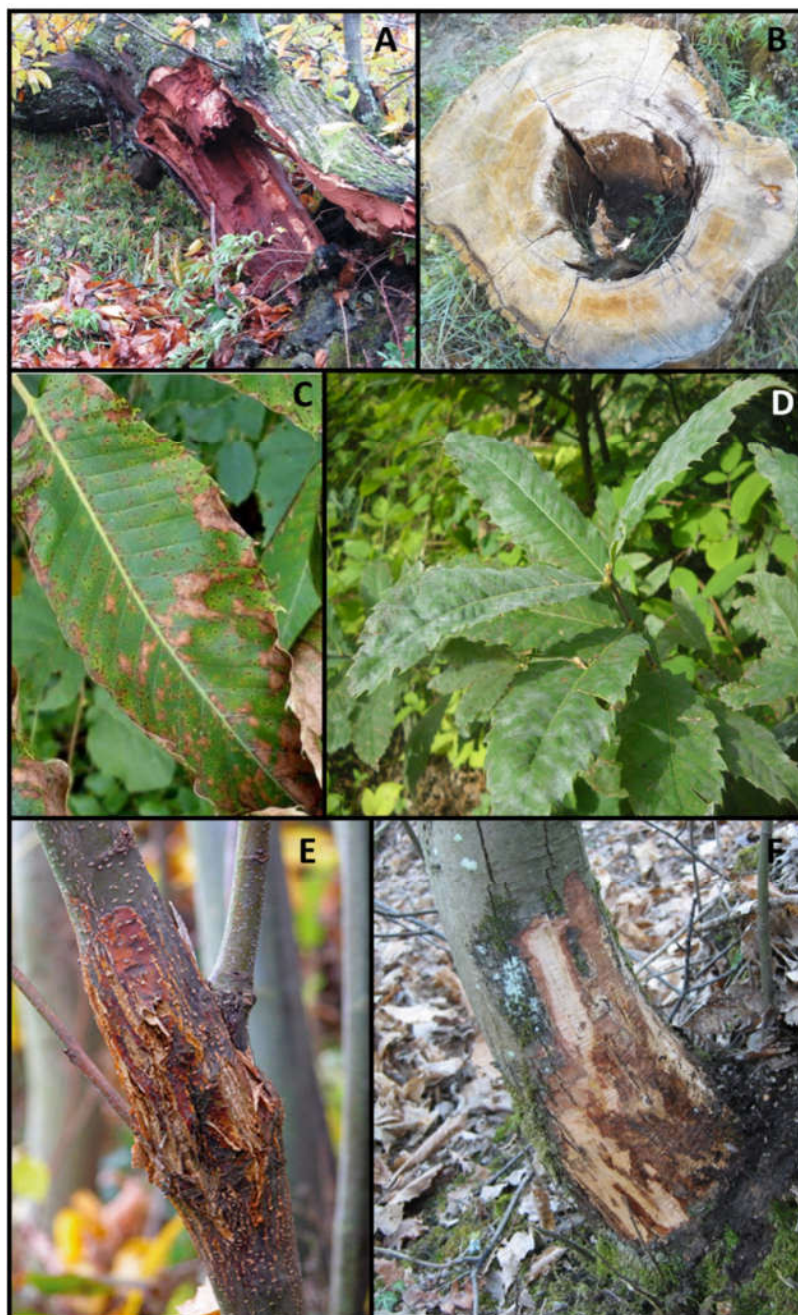


Figura 1-5: Sintomi delle principali malattie di origine fungina che possono essere rinvenute nei castagneti: carie del legno (A, B), fersa (C), oidio (D), cancro (E) e mal dell'inchiostro (F).

Un ruolo sicuramente importante sulla vitalità delle piante sia giovani che centenarie è determinato dagli agenti di marciume radicale, in particolare del mal dell'inchiostro del castagno (Fig 1-5 F). La malattia ha causato all'inizio del XX secolo gravi danni e ingenti perdite di produzione in tutte le aree castanicole, per poi riassorbirsi progressivamente. Si è infatti constatato che provoca danni non costanti nel tempo ma cicli in cui gli individui colpiti possono attraversare negli anni fasi alterne di attenuazione e recrudescenza della sintomatologia (Turchetti *et al.*, 2008). Negli ultimi anni, per la segnalazione di numerosi nuovi focolai in tutto il territorio, si sta assistendo ad una ripresa della malattia, che sembrerebbe essere favorita da inverni miti, primavere piovose ed estati asciutte e siccitose. Sono infatti queste le condizioni che debilitano maggiormente il castagno e al contempo sono ideali per germinazione delle oospore del patogeno. Per tale ragione nel successivo capitolo si tratterà in maniera più estesa e specifica la problematica del mal dell'inchiostro.

2 MAL DELL'INCHIOSTRO DEL CASTAGNO

2.1 Cenni storici

Il mal dell'inchiostro è la seconda malattia più diffusa e pericolosa a carico del castagno. L'origine di questa fitopatologia non è certa ma si presume che sia arrivata dal Nord-America, comparando in Europa nel XVIII secolo, determinando la scomparsa del castagno in molte. Devastanti epidemie a carico del castagno si verificarono nel secolo successivo e fino ai primi del '900 (MacDonald *et al.*, 1993). La denominazione "mal dell'inchiostro" deriva dalla colorazione scura che assumono i tessuti sottocorticali della pianta infetta e dall'emissione di un essudato blu-inchiostro / nero che macchia il terreno a contatto con la parte basale dell'albero. Nonostante le numerose ricerche effettuate, per molto tempo l'eziologia della malattia rimase ignota e solo nel 1917 venne identificato nella *Blepharospora cambivora* Petri l'agente specifico del mal dell'inchiostro del castagno. Successivamente, il nome scientifico divenne *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis e nel 1938 fu descritta in Inghilterra un'altra specie in grado di provocare la malattia sul castagno, la *Phytophthora cinnamomi* Rand.

Quest'ultima in Italia, dove già era presente *Phytophthora cambivora*, venne isolata nel 1986 a opera di Cristinzio e destò maggiori preoccupazione a causa della sua maggiore aggressività e polifagia: più di 200 generi di piante sono suscettibili ad attacchi di *Phytophthora cinnamomi*, mentre *Phytophthora cambivora* è ospitata solo da poche altre specie forestali (generi *Malus*, *Prunus*, *Fagus* e *Juglans*). Le due specie si differenziano, oltre che per l'aggressività e la velocità di decorso della malattia anche per alcune caratteristiche fisiologiche quali la capacità di utilizzare alcuni carboidrati specifici e di degradare la lignina (Cristinzio e Grassi, 1993). La rinnovata presenza di mal dell'inchiostro in Italia può spiegarsi in seguito alle variazioni climatiche avvenute negli ultimi 10-15 anni in cui si sono verificati ripetuti periodi siccitosi: le siccità estive hanno indebolito gli apparati radicali rendendo le radici fini più suscettibili alle infezioni durante i successivi mesi piovosi favorevoli al patogeno (Turchetti e Maresi, 2005).

2.2 Ciclo Biologico di *Phytophthora spp.*

Phytophthora è stata per molto tempo considerata come un organismo fungino appartenente alla categoria dei Ficomiceti. È stato invece dimostrato che appartenga al regno dei protisti (Fig. 2-1) in quanto, mentre la parete cellulare dei funghi è composta principalmente di chitina, quella di *Phytophthora spp.* è formata da cellulosa come tutti i protozoi. Viene riportato di seguito il profilo sistematico del patogeno:

- Regno: Protista
- Classe Oomycota
- Ordine Peronosporales
- Genere *Phytophthora*

Lo strano comportamento di questo parassita è un tipico esempio di evoluzione convergente: *Phytophthora* è morfologicamente e strutturalmente più simile ad un fungo vero e proprio, producendo anch'essa il micelio e le spore, ma differisce dagli organismi fungini nella sua evoluzione biologica.

Sia *Phytophthora cambivora* che *Phytophthora cinnamoni* hanno micelio eterotallici, cioè dimostrano polarità sessuale ben distinta e possono riprodursi sia sessualmente che agamicamente.

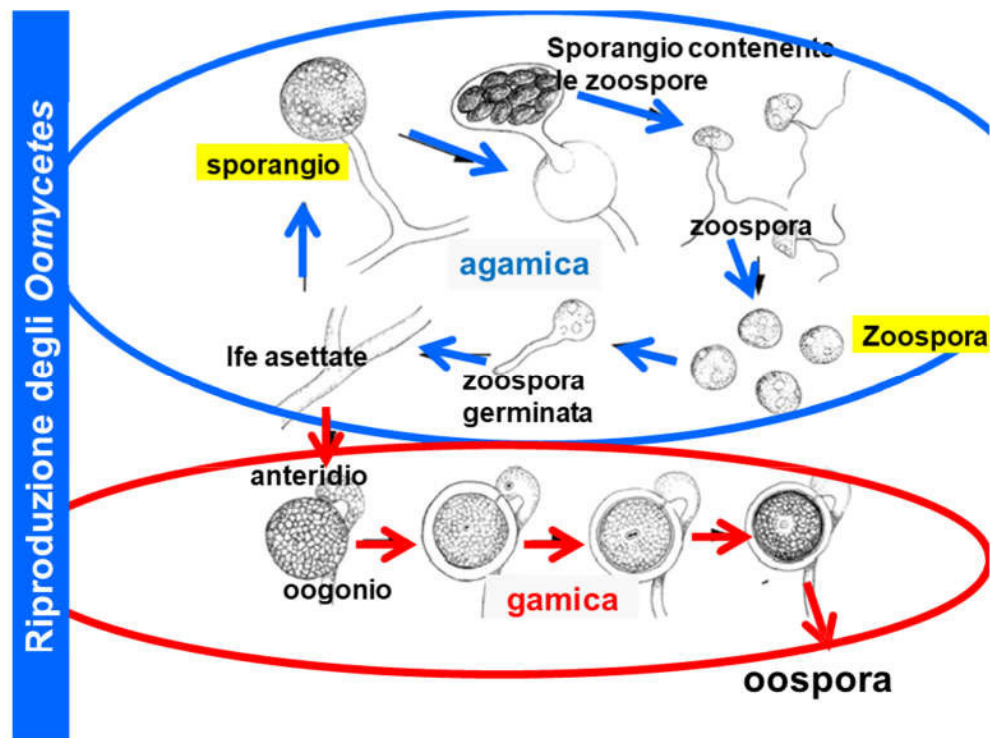


Figura 2-1: Ciclo biologico degli Oomiceti.

Le oospore sono il risultato della riproduzione sessuata, derivano cioè dall'unione di due gametangi di polarità opposta: anteridio e ascogonio, che formano l'oogonio il quale contiene le oospore (i nuclei somatici sono diploidi perché sono il risultato della meiosi gamica) (Fig. 2-2 B). Le due specie si distinguono perché in *Phytophthora cinnamoni* gli oogoni sono lisci, mentre in *Phytophthora cambivora* la loro superficie è verrucosa (Bounous *et al.*, 2002). Le oospore sono state ottenute quasi esclusivamente in prove in laboratorio, dal momento che la loro osservazione in natura risulta molto difficile. Gli organi di riproduzione agamica (per mitosi) sono gli sporangi, le zoospore e le clamidospore.

Le clamidospore sono anch'esse strutture di sopravvivenza caratterizzate da una parete cellulare molto spessa all'interno della quale sono concentrate le sostanze nutritive; si formano a partire dal micelio e vengono rilasciate nel terreno dove, non appena le condizioni stazionali (temperatura e umidità del suolo) tornano ad essere favorevoli, possono germinare.

Gli sporangi (Fig. 2-2 D), invece, sono organi particolari che si originano dalle oospore o dal micelio. Possono fungere da strutture di diffusione attraverso il vento e l'acqua se vengono rilasciati nel terreno, germinando poi indipendentemente, oppure rimanere nel micelio (Fig. 2-2 A) producendo le zoospore. Quest'ultime sono particolari spore dotate di due flagelli che permettono loro di muoversi nell'acqua del terreno e di propagare l'infezione penetrando nell'ospite attraverso gli apparati radicali, direttamente oppure attraverso piccole lesioni. All'interno dei tessuti della pianta verrà prodotto del nuovo micelio e il ciclo avrà di nuovo inizio.

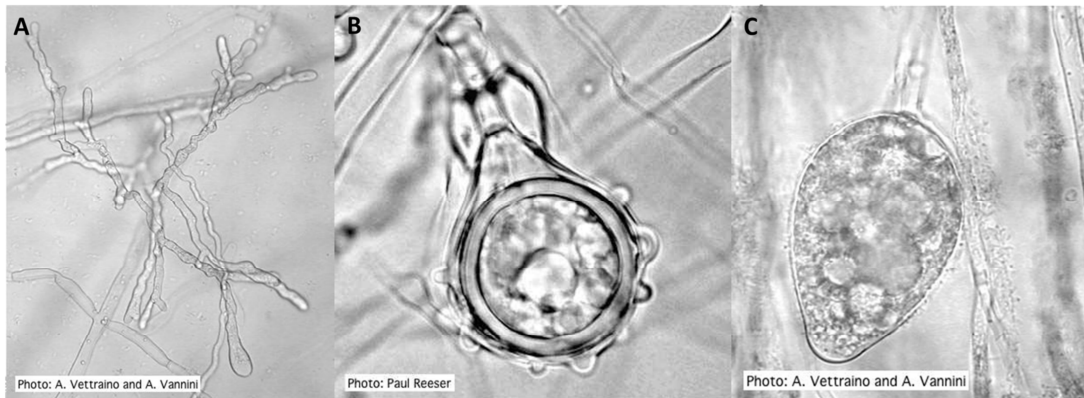


Figura 2-2: Micelio (A), anteridio e oogonio (B) e sporangi di *Phytophthora cambivora* (D).

Il micelio in genere è poco resistente alle basse temperature, sotto l'influsso delle quali tende ad arrestare la crescita fino a perdere di vitalità (con temperature inferiori a 0 C). La produzione di clamidospore è una prerogativa di *Phytophthora cinnamoni* che infatti resiste più a lungo alle condizioni avverse di temperatura e umidità nel terreno mentre *Phytophthora*

cambivora, che non è dotata di queste strutture, probabilmente risiede nelle grosse radici durante i mesi più freddi (Bounous *et al.*, 2002). Proprio per questo motivo il patogeno si trova con più facilità nel terreno dalla primavera all'autunno, periodo in cui le precipitazioni sono abbondanti e le temperature più miti.

Nello studio che seguirà però, dato che la presenza di *Phytophthora cinnamoni* in Italia è stata rilevata più che altro in vivaio e vista la difficoltà di distinguere le due specie, si considererà il mal dell'inchiostro in termini generici, senza attribuire all'una o all'altra specie i sintomi ed i risultati della ricerca ma trattando solamente del genere *Phytophthora* spp.

2.3 Sintomatologia

I sintomi (Fig. 2-3) d'infezione sono visibili sulla parte epigea delle piante in piena stagione vegetativa, ma solitamente compaiono ad uno stadio avanzato della malattia. La chioma inizialmente manifesta sintomi di sofferenza, come microfilla e leggera clorosi (le foglie diventano di un verde più chiaro), poi tendono ad ingiallirsi fino al completo disseccamento delle sommità fogliari. I ricci, inoltre, non raggiungono la maturazione e nel periodo invernale restano appesi ai rami insieme alle foglie secche.



Figura 2-3: Sintomi determinati da mal dell'inchiostro su piante di castagno.

Al colletto i sintomi sono il disseccamento dei polloni basali, o il loro mancato riscoppio, e la necrosi corticale causata dalla morte del cambio (Fig. 2-4 B). In genere gli effetti esterni della malattia possono essere confusi con i sintomi causati da *Cryphonectria parasitica* (Cancro Corticale), ma la morte dei polloni alla base è un chiaro segno che l'apparato radicale si trova in uno stato di sofferenza o che è poco vitale. Scortecciando il colletto, in corrispondenza delle necrosi, si rivela l'alterazione dei colori dei tessuti cambiali e dell'alburno causata dall'ossidazione dei tannini ad opera degli enzimi prodotti dal micelio del patogeno. Questa macchia scura con margine ben definito è più larga alla base e si attenua in alto salendo fino ad 1 m di altezza lungo l'asse del fusto ed assume la forma tipica di una fiamma. La porzione necrotizzata è superficiale ed interessa la corteccia, il cambio e gli strati del legno più superficiali. In stadi avanzati della malattia questi sintomi si possono notare anche al di sopra della corteccia con cambiamenti cromatici della stessa (Cristinzio *et al.*, 2005).

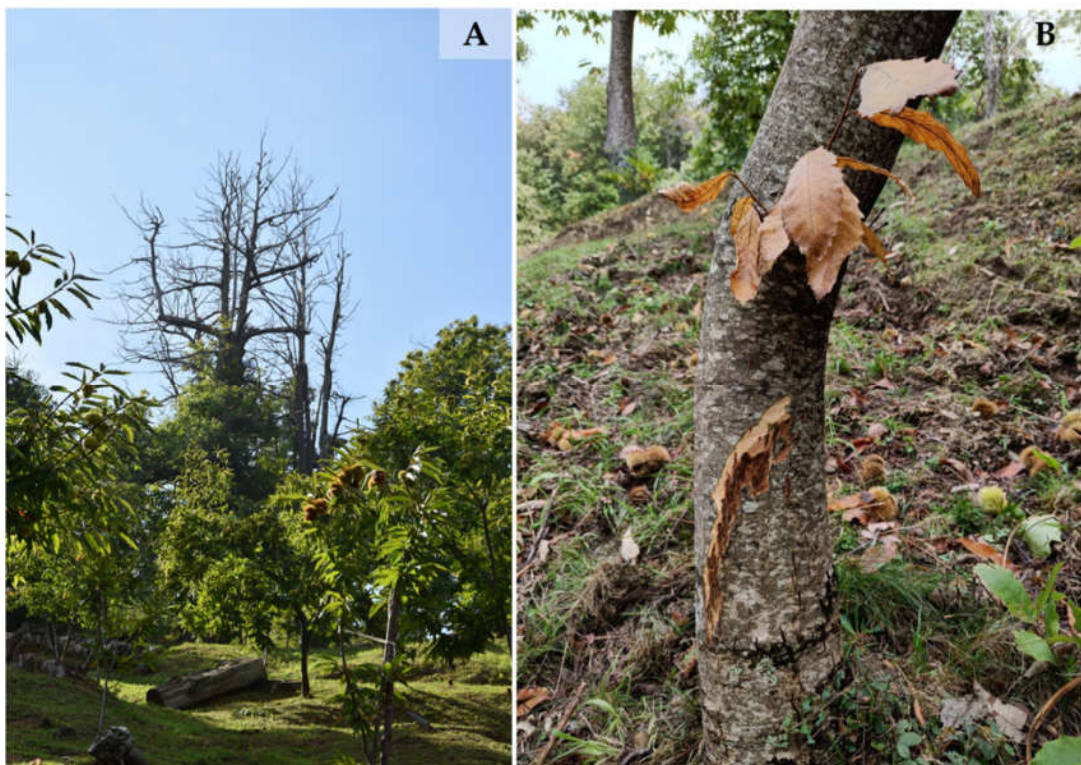


Figura 2-4: Morte di piante di castagno secolari per mal dell'inchiostro (A), sintomo specifico rappresentato da imbrunimento alla base del tronco (B).

Recenti studi, però, hanno dimostrato come *Phytophthora* spp. non si limiti a colonizzare tessuti cambiali e floematici, ma come sia invece in grado di colonizzare anche parte dello

xilema più interno il quale reagisce emanando polifenoli che formano una macchia scura omogenea in profondità (Brown e Brasier *et al.*, 2007). Le piante colpite dall'infezione fungina reagiscono formando dei tessuti suberosi che tendono a localizzare e/o contenere lo sviluppo del parassita, ma queste reazioni hanno esito variabile e per lo più sono efficaci nelle piante adulte (Fenaroli *et al.*, 1945). Nei soggetti giovani e nei semenzali, la malattia porta alla morte nel giro di 1 o 2 anni. I soggetti adulti invece possono resistere per 3-4 anni prima del collasso (Fig. 2-4 A). Questa diversa suscettibilità dipende dallo stato di salute dell'apparato radicale: radici vigorose sono meno soggette a colonizzazioni da parte di patogeni rispetto a radici sottoposte a stress e indebolite. L'azione del fungo avviene anche in profondità in relazione alle condizioni pedologiche alterando l'equilibrio della rizosfera (secondo meccanismi ancora poco conosciuti) e manifestandosi attraverso la scomparsa dei carpofori dei funghi eduli in prossimità delle piante colpite (Turchetti e Maresi *et al.*, 2000). Inoltre il fungo si può muovere da pianta a pianta attraverso le anastomosi che si generano tra piante sane e piante infette.

2.4 Ambiente di diffusione

La diffusione della malattia è molto influenzata da fattori stazionali e dall'andamento meteorologico, che possono favorirne la progressione senza però conferirle un andamento epidemico di vaste proporzioni (Turchetti *et al.*, 2004). Il mal dell'inchiostro è favorito da inverni miti e dalla successione di stagioni secche e umide: inverni più caldi e meno piovosi del normale sottopongono le piante a stress idrici che si manifestano durante la ripresa vegetativa in primavera (Turchetti e Maresi *et al.*, 2005). Forti precipitazioni primaverili ed autunnali creano condizioni ideali per la diffusione del patogeno tramite le zoospore, che trovano negli impluvi naturali, nei fossi e nelle strade infra-boschive dei luoghi di scorrimento incontrollato delle acque (Fig. 2-5). Negli impianti abbandonati dove il castagno deve competere con specie più frugali (quercia, orniello, robinia e nocciolo), che evidenziano un cambiamento nella composizione della vegetazione forestale, le piante sono maggiormente stressate e più suscettibili. Quando le condizioni ambientali ed edafiche sono favorevoli allo sviluppo radicale, si crea invece uno stato di equilibrio tra l'ospite e il parassita dovuto alla presenza dei miceli dei funghi simbiotici micorrizici e antagonisti della *Phytophthora* (Turchetti e Parini *et al.*, 1993). In queste particolari situazioni gli effetti della malattia si manifesterebbero più lentamente; il castagno infatti è una delle specie forestali dotata del maggior numero di endo-micorrize e quando inizia a scomparire dalle formazioni tutta la popolazione micotica ne risente.

Phytophthora si diffonde con più facilità nei suoli poveri di sostanza organica e di azoto, come i castagneti coltivati, dove il terreno viene continuamente ripulito dal fogliame e dalla vegetazione sottoposta attraverso le continue lavorazioni. Suoli superficiali inoltre provocano una maggiore concentrazione di radici, che in questo modo possono essere infettate più rapidamente dal patogeno. In questi suoli gli effetti di periodi siccitosi risultano più marcati; inoltre, la presenza di argilla e di strati rocciosi impermeabili facilitano la saturazione del suolo in seguito alle piogge, rendendo il terreno asfittico. In condizioni di anaerobiosi gli altri funghi, in particolare gli antagonisti di *Phytophthora*, risultano sfavoriti perciò le radici fini vengono infettate più facilmente (Turchetti e Maresi *et al.*, 2005).



Figura 2-5: Linee di scorrimento di acqua e fango

Oltre alle condizioni edafiche e climatiche della stazione però, un'altra via di diffusione dell'inoculo è il trasporto di fanghi infetti per mezzo dell'uomo (pneumatici di mezzi meccanici, suola delle scarpe) e degli animali che transitano nei boschi. È molto frequente infatti il caso in cui l'infezione parta proprio dalle piante limitrofe alla viabilità silvo-pastorale percorsa dall'uno o dall'altro vettore e che poi si diffonda all'interno del popolamento. In

vivaio invece il patogeno è trasportato dall'acqua di irrigazione e da movimenti di terreno infetto.

Il mal dell'inchiostro all'interno di un castagneto può manifestarsi sia in soggetti isolati sia in gruppi di piante, caratterizzati da giacitura ed esposizione variabili a seconda della stazione. A discapito di quanto era stato rilevato finora, studi più approfonditi hanno evidenziato come l'andamento spaziale della malattia non rispecchi gli schemi predefiniti che la confinavano lungo le vie preferenziali dell'acqua (fondovalle, impluvi...) ma di come sia in grado di espandersi anche lungo i versanti e le creste. "Generalmente l'infezione iniziata nel fondovalle o a mezza costa si diffonde a macchia d'olio, cioè in tutte le direzioni; quando la malattia si manifesta in prossimità di un crinale vengono colpiti i castagni localizzati lungo le linee di massima pendenza, cioè secondo le linee di scorrimento delle acque superficiali e profonde, fino ad arrivare a zone pianeggianti dove poi si espande" (Turchetti *et al.*, 2000). Generalmente le aree castanicole maggiormente a rischio di attacchi di *Phytophthora* sono quelle caratterizzate da precipitazioni superiori ai 1000 mm annui, periodi di siccità inferiori a 3 mesi e temperature medie primaverili e autunnali del suolo intorno ai 15°C (Vannini e Vettrano, *et al.*, 2004). Inverni troppo freddi, invece, sono di ostacolo alla fisiologia del fungo. Per quanto riguarda le caratteristiche stazionali dei focolai, risultati di ricerche effettuate da Turchetti *et al.* (2000) hanno confermato che questi sono situati prevalentemente su terreni con una pendenza del 10-20%, con ubicazione a mezzacosta ed esposizione a Nord.

3 METODI DI LOTTA

Dopo che in Italia venne identificato l'agente patogeno del mal dell'inchiostro ad opera di Petri e che ne fu stabilita la pericolosità, nel 1923 fu emanato un Decreto Ministeriale di lotta obbligatoria (D.M. 2 ottobre 1923) contro questa malattia. Tra le tecniche agronomiche da adottare era prevista l'eliminazione dal campo delle piante morte, infette o sospette asportando, quando possibile, anche le ceppaie per eliminare i centri di infezione. La buca generata dall'asportazione della ceppaia doveva essere tratta con poltiglia bordolese ottenuta unendo calce idrata con acqua e una soluzione acquosa di solfato di rame. Oppure si interveniva mettendo a nudo il colletto e le radici più grosse (sconciamento) in modo da devitalizzare il fungo con il freddo ("metodo Gandolfi") e irrorando le parti scoperte con anticrittogamici. Nel 1998 è stato approvato un decreto che abroga la lotta obbligatoria al mal dell'inchiostro in quanto, secondo il MiPAAF, sono venute a cadere le motivazioni scientifiche e tecniche che determinano l'adozione di questi provvedimenti (D.M. 17 aprile 1988).

Studi più recenti invece, condotti da Turchetti et al. tra il 2000 e il 2003 nella provincia di Firenze, hanno dimostrato come la lotta al mal dell'inchiostro possa essere condotta su base biologica. Al momento della ripresa vegetativa (aprile-maggio) è stato distribuito un ammendante organico (composto da letame maturo, pollina commerciale e concime organico NP+K pellettato) attorno alle piante infette e nelle aree di incidenza delle chiome, senza alcuna lavorazione preliminare o postuma del terreno. Tale concimazione ha comportato il miglioramento della struttura del terreno, l'attivazione dell'attività microbiologica e antagonista ed un maggior apporto di nutrienti ed elementi minerali, che nel complesso hanno rinvigorito gli apparati radicali. Dopo 3 anni di applicazione questa pratica ha comportato la ripresa vegetativa del 75% delle piante deperenti su cui è stata effettuata la sperimentazione, fornendo un'ottima alternativa di lotta, efficace e non invasiva.

Molto importante restano in ogni caso gli interventi di regimazione delle acque attraverso le opportune opere di drenaggio, per evitare fenomeni di ristagno e le potature per ridimensionare le chiome ed eliminare il seccume. L'irrigazione nei vivai non deve mai essere effettuata per scorrimento, ma se possibile utilizzare l'acqua proveniente da pozzi profondi,

perché quella superficiale ha molte probabilità di contenere propaguli di *Phytophthora* (Vannini e Vettrano *et al.*, 2004).

La lotta chimica invece, attraverso la somministrazione di anticrittogamici e fungicidi chimici (sali di alluminio o di potassio), è consentita solamente in vivaio, perché in bosco o nei castagneti questi prodotti comporterebbero un forte impatto ambientale e un esito incerto, compromettendo la naturalità del prodotto alimentare e la salubrità dell'ambiente.

Un altro metodo di controllo è la lotta genetica, attraverso l'utilizzo di specie di *Castanea* di origine asiatica tolleranti alla malattia (*Castanea crenata* e *Castanea mollissima*) che però possono creare problemi di disaffinità con le varianti italiane ed europee. In particolare, come appurato da prove di laboratorio da Cristinzio e Grassi (1993), *Castanea crenata* in Giappone è la specie più resistente al mal dell'inchiostro, ma non immune a esso. Questo fatto può essere spiegato perché il castagno giapponese vive in un'ambiente più continentale, dove i rigidi e lunghi inverni non hanno permesso al parassita di svilupparsi. Più conveniente resta dunque l'utilizzo delle cultivars di *Castanea sativa* meno suscettibili, che essendo sopravvissute in ambienti infetti hanno esaltato caratteri ereditari di resistenza all'agente patogeno (Cristinzio *et al.*, 2004).

4 OBIETTIVI

Nella regione Marche la castanicoltura è concentrata nel Piceno, al confine con l'Abruzzo. In base all'Inventario Regionale, i castagneti contribuiscono con 4600 ettari alla superficie forestale delle Marche pari all'1,8% del totale. In particolare, i castagneti da frutto ricoprono circa 800 ha e coinvolgono circa 530 aziende, la restante parte è costituita da castagneti da legno. La castagna rappresenta un prodotto agroalimentare molto ricercato, utilizzato sia per il consumo diretto che nella trasformazione dolciaria.

Negli anni si è assistito a un progressivo declino delle produzioni regionali a causa del graduale abbandono e all'impatto di diverse avversità fitosanitarie, prime tra tutte l'infestazione del cinipide, che ha ridotto drasticamente le produzioni. Solo recentemente, in seguito ai lanci ripetuti del parassitoide, le piante stanno recuperando livelli produttivi accettabili, anche se risultano essere ancora stressate e più facilmente attaccabili da malattie come cancro corticale e mal dell'inchiostro.

Il mal dell'inchiostro rappresenta una delle poche malattie in grado di determinare la morte delle piante di castagno, particolarmente grave nei castagneti da frutto, sta purtroppo attaccando sia aree abbandonate che aree coltivate, su cui insistono esemplari monumentali e soprattutto varietà di castagno autoctone che oggi rischiano di estinguersi riducendo ulteriormente il patrimonio culturale regionale e la biodiversità.

Scopo della presente tesi è stato quello di

- i) verificare lo stato sanitario di un castagneto da frutto, in cui è acclarata la presenza di mal dell'inchiostro, prima e dopo due mesi dalla somministrazione di sostanza organica sottoforma di pollina;
- ii) verificare in laboratorio l'attività fungistatica di alcuni formulati commerciali a base di microrganismi antagonisti (*Streptomyces* spp., *Bacillus*) e molecole chimiche naturali (fosfiti, BTH).

5 MATERIALI E METODI

5.1 Siti d'indagine

Le ricerche sono state effettuate nella regione Marche in un castagneto da frutto, ubicato nella provincia di Ascoli Piceno. Il sito è stato scelto in questo areale, dove è maggiormente diffuso il castagno nella regione. L'area di studio è stata georeferita, utilizzando un GPS Garmin eTrex30 (Garmin Ltd.), e il sito è stato localizzato su una mappa geografica creata ed elaborata mediante il software Google Earth (Fig.5-1).



Figura 5-1: Mappa con confini dell'area di studio presso Acquasanta Terme fraz. Pozza.

L'area di studio è situata a Pozza che è una frazione del comune di Acquasanta Terme in provincia di Ascoli Piceno. Ci troviamo ad un'altezza di 1027m s.l.m., presenta una pendenza del 26.7% e le coordinate geografiche sono 42°43' 54.89"N 13° 25' 15.18"E. All'interno del sito sono state rilevate 77 piante, le quali presentano per la maggioranza un'età superiore ai 30 anni ma sono anche presenti individui secolari e alcuni nuovi individui.

Pozza è situato all'interno dei Monti della Laga i quali presentano un suolo di tipo arenaceo con la presenza anche di argilla (ISPRA *et al.*, 2017).

Nel castagneto di Pozza (Fig. 5-2) non vengono effettuate operazioni di ripulitura del sottobosco anche se è un castagneto governato per la produzione di castagne, sono state rinvenute Felci, Rosa canina e Rovi.



Figura 5-2: Immagini dell'area di studio nel periodo del sopralluogo (01.06.2022).

5.2 Rilievo fitosanitario nell'area studio

Il primo rilievo dell'area è stato eseguito il 01.06.22 andando a georeferenziare la posizione delle piante tramite l'utilizzo di un GPS. Per ciascuna pianta è stata misurata la circonferenza a 1,30 m ed è stata effettuata una valutazione dello stato fitosanitario delle singole piante. In particolare, su una scheda predisposta è stato possibile registrare presenza/assenza di sintomi

di cancro corticale, mosaico del castagno, oidio. I sintomi di deperimento delle piante di castagne è stato descritto attraverso defogliazione, ingiallimento e disseccamento/morte dei tessuti e valutato attraverso l'applicazione di classi patometriche di intensità (0 = pianta sana; 1 = 1-30% chioma sintomatica, 2 = 31-50% chioma sintomatica; 3 > 50% chioma sintomatica; 4 = pianta morta), nonché presenza di necrosi al colletto ed essudati, che rappresentano sintomi specifici del mal dell'inchiostro determinati da infezioni di *Phytophthora*.

5.3 Raccolta dei campioni di suolo e radici

La raccolta dei campioni di suolo e radici è stata effettuata, contestualmente al monitoraggio effettuato presso l'area di studio su piante rappresentative dello stato sanitario con sintomi di deperimento. L'operazione di scavo (Fig. 5-3) è stata eseguita tramite l'utilizzo di una zappetta portatile, è stato rimosso uno strato di circa 10 cm, corrispondente alla lettiera, per poi approfondire lo scavo fino alla profondità di circa 30 cm in modo da scoprire il colletto e le radici principali.



Figura 5-3: Operazioni di scavo e raccolta dei campioni di suolo.

Raggiunte le radici è stato raccolto circa 1 Kg di suolo corrispondente alla rizosfera. Per ogni pianta sono stati effettuati 2-3 saggi ed è stato ottenuto un campione “pool” di rizosfera e un corrispondente campione “pool” di radici, in modo tale che il suolo e le radici raccolte fossero rappresentative della situazione fitosanitaria della pianta. Ogni campione è stato poi riposto all’interno di sacchetti di plastica sterili, identificati con un’etichetta che riportava il numero della pianta da cui era stato prelevato.

5.4 **Analisi di laboratorio**

5.4.1 *Setacciamento del suolo e recupero dei campioni radicali*

I campioni di suolo sono stati sottoposti a setacciamento mediante setaccio con maglie della dimensione di 710 µm. La terra fina ottenuta è stata riposta in tre provette Falcon da 50 ml, la terra grossolana è stata allontanata, mentre sono state raccolte in altrettante provette Falcon le radici sia assorbenti che principali, avendo cura che fossero effettivamente appartenenti alle piante di castagno e non ad altre specie ad *habitus* arbustivo presenti nel sito di campionamento.

Su ogni provetta è stata indicata l’identità del campione, corrispondente al numero della pianta attribuita durante in monitoraggio e l’aggiunta di “R”, se si trattava di campioni di radice, una “S” se erano campioni di suolo.

I campioni di suolo (S) e radici (R) sono poi stati conservati in cella fredda a 4°C in attesa che potessero essere sottoposti ad ulteriori analisi di laboratorio.

5.4.2 *Estrazione del DNA e amplificazione genica*

L’estrazione del DNA è stata effettuata partendo da 250 mg di radici e di suolo, utilizzando il kit di estrazione DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen). In particolare, a una fase di omogenizzazione dei campioni che avviene in presenza di 800 µl del buffer CD1 in provette Eppendorf da 2 ml su vortex alla massima velocità per 10 min, è seguita una breve centrifugazione (15000 x g per 1 min). Circa 500-600 µl del sovrinatante sono stati recuperati e aggiunti a 200 µl di buffer CD2, in grado di rendere insolubili composti organici e inorganici, incluse sostanze umiche, residui vegetali e proteine mediante una centrifugazione a 15000 × per 1 min. Successivamente è stato recuperato il sovrinatante circa 700 µl a cui sono stati aggiunti 600 µl di buffer CD3. Il lisato è stato caricato all’interno di colonnine e filtrato mediante centrifugazione a 15000 × g per 1 min. Il filtro della colonnina è stata ripetutamente ripulita facendola attraversare da 500 µl di buffer C5 e infine asciugato mediante

centrifugazione a $15000 \times g$ per 1 min. Infine, il DNA totale è stato eluito aggiungendo al centro del filtro della colonnina 50-100 μ l di buffer C6. Gli acidi nucleici sono stati conservati a -20°C o direttamente utilizzati nella reazione a catena della polimerasi (PCR).

La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume di 25 μ l contenenti: 10 mM di Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 0,1% Triton 100X, 2 mM MgCl_2 , 75 nM di ciascun nucleotide (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Promega Corporation), 0,5 μ M di ciascun primer e circa 50 ng di DNA estratto. Sono stati utilizzati i primer universali ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990), disegnati nella regione genica *Internal Transcribed Spacer Sequence*. L'amplificazione è stata realizzata in un termociclatore DNA Icyler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizzando un programma di amplificazione che prevedeva un ciclo iniziale di denaturazione di 2 minuti a 95°C ; successivamente 40 cicli di 30 sec a 95°C , 50 sec a 50°C e 60 sec a 72°C ; per concludere una fase di estensione finale di 10 min a 72°C .

5.4.3 Sequenziamento e analisi metagenomica

Il prodotto PCR è stato inviato alla NOVOGENE (UK) che ha provveduto alla purificazione, alla preparazione della libreria e al sequenziamento che avvenuto su piattaforma illumina che ha consentito di ottenere reads da 250 bp. Queste, dopo essere state ripulite da sequenze chimeriche, sono state utilizzate per ottenere gli OTU (unità operativa tassonomica) consentendo l'identificazione dei microrganismi fungini presenti nel suolo e nelle radici.

5.4.4 Test di antagonismo *in vitro*

Per il test di antagonismo *in vitro*, è stato scelto un ceppo di *Phytophthora cambivora* e di *P. plurivora*, isolati all'interno dell'area studio da piante che mostravano necrosi a fiamma a livello del colletto.

Sono stati saggiati *in vitro* **Serenade Aso**, a base di *Bacillus subtilis* e **LAL Stop**, a base di *Streptomyces*, **Bion**, a base di BTH e **Pikalim**, a base di fosfiti (Fig. 5-4). I formulati commerciali sono stati preparati alla **dose 1** (100 μ l/2000 μ l = 10L/200L), **dose 2** (100 μ l/5000 μ l = 10L/500L) e **dose 3** (100 μ l/10000 μ l = 10L/1000L).

I saggi sono stati effettuati in capsule Petri di 4,5 cm di diametro, nelle quali, ad una distanza di 35 mm, sono stati inseriti 1 dischetto (4 mm di diametro) di micelio prelevati da una giovane colonia di *Phytophthora spp.* e 100 μ l per ogni formulato commerciale alle tre

diverse dosi. Per ciascuna coltura duale (antagonista/*Phytophthora*) sono state previste tre repliche.





Formulato commerciale	Serenade Aso	
Ditta	Bayer	
Composizione	Bacillus subtilis ceppo QST 712	
Modalità d'azione	Interferisce con lo sviluppo dei patogeni andando a compere per le risorse nutritive e induce un meccanismo di resistenza della pianta	
Formulato commerciale	Bion 50 wg	
Ditta	Syngenta	
Composizione	Acibenzikar-S-Methyl puro e dibutilnaftalensolfonato di sodio	
Modalità d'azione	Attivatore delle autodifese della pianta	
Formulato commerciale	Pikalín	
Ditta	Aifar	
Composizione	Anidride fosforica (P2O5) e Ossido di potassio (K2O)	
Modalità d'azione	Fornisce alla pianta una forma di fosforo che è utilizzabile solo dalla pianta.	
Formulato commerciale	LALSTOP K 61	
Ditta	Lallemand	
Composizione	Streptomyces (ceppo k 61), Inerti q.b. a	
Modalità d'azione	Biofungicida per il controllo di funghi patogeni del terreno e delle sementi.	

Figura 5-4: Caratteristiche dei formulati biologici utilizzati nella presente ricerca.

Inoltre, in tre piastre è stata inoculata solo la colonia di *Phytophthora cambivora* e in altre rispettive tre *P. plurivora*, come testimone. Le capsule così preparate sono state poi incubate in un termostato a 22°C. Ogni giorno sono state registrate le misure del raggio (mm) della colonia di *Phytophthora*, in coltura singola (testimone) e in presenza dell'antagonista. La prova si è considerata conclusa dopo nove giorni, quando la colonia testimone ha colonizzato l'intera piastra. La percentuale di inibizione (Pi) è stata valutata in base alla seguente formula:

$$Pi = [(R-r)/R] \times 100$$

dove:

R: raggio medio del patogeno cresciuto in presenza di acqua;

r: raggio medio del patogeno in presenza dell'antagonista.

5.5 Prove di controllo del mal dell'inchiostro mediante apporto di sostanza organica al suolo

Nell'area di studio sottoposta a monitoraggio fitosanitario il giorno 01 giugno 2022, è stato distribuito un concime organico NP (2,5% azoto organico, 2,5% fosforo organico, UNIMER), a base di pollina maturata per almeno cinque mesi, neutralizzata, disidratata e compressa, non proveniente da allevamenti industriali. Dopo un lungo processo di maturazione, il prodotto viene sottoposto a trattamento termico di sanificazione, previsto per legge di un'ora a 70°C per l'eliminazione di eventuali organismi patogeni. Questo trattamento permette di ottenere un prodotto finale sicuro e con un contenuto di umidità basso e costante. La notevole presenza di acidi fulvici, prevalenti su quelli umici, determina un'efficace azione sequestrante sugli elementi nutritivi contenuti nel suolo che mantengono una elevata biodisponibilità grazie alla formazione di complessi umici a basso peso molecolare facilmente assimilabili dalle piante.

In particolare, il concime è stato distribuito il giorno 07.06.2022 sotto la proiezione della chioma delle 66 piante prese in oggetto indipendentemente dallo stato sanitario delle stesse. Per ognuna delle piante è stato distribuito a mano un quantitativo pari a circa 25 kg per le piante che presentavano una circonferenza superiore ai 120 cm e un quantitativo di circa 10 kg per quelle che mostravano dimensioni minori.

La scelta della data di somministrazione del concime è stata concordata con l'azienda Santini, proprietaria dell'area di studio, consultando le previsioni meteo, in modo che non

fosse tanto distante da un possibile evento piovoso che effettivamente si è verificato in data 10.06.2022.

Dopo 58 giorni dalla somministrazione è stato ripetuto un rilievo (28.07.2022) per verificare se fosse cambiato lo stato fitosanitario in seguito a somministrazione di concimazione organica.

6 RISULTATI

6.1 Rilievo fitosanitario all'interno dell'area studio

Durante il rilievo effettuato il 01.06.2022 all'interno dell'area studio, è stato possibile verificare che il mal dell'inchiostro era particolarmente presente. Per poter fare una valutazione dell'incidenza della malattia, sono stati presi in esame ingiallimento, defogliazione e disseccamento della chioma, nonché presenza di essudati e necrosi al colletto che rappresentano sintomi tipici di tale malattia.

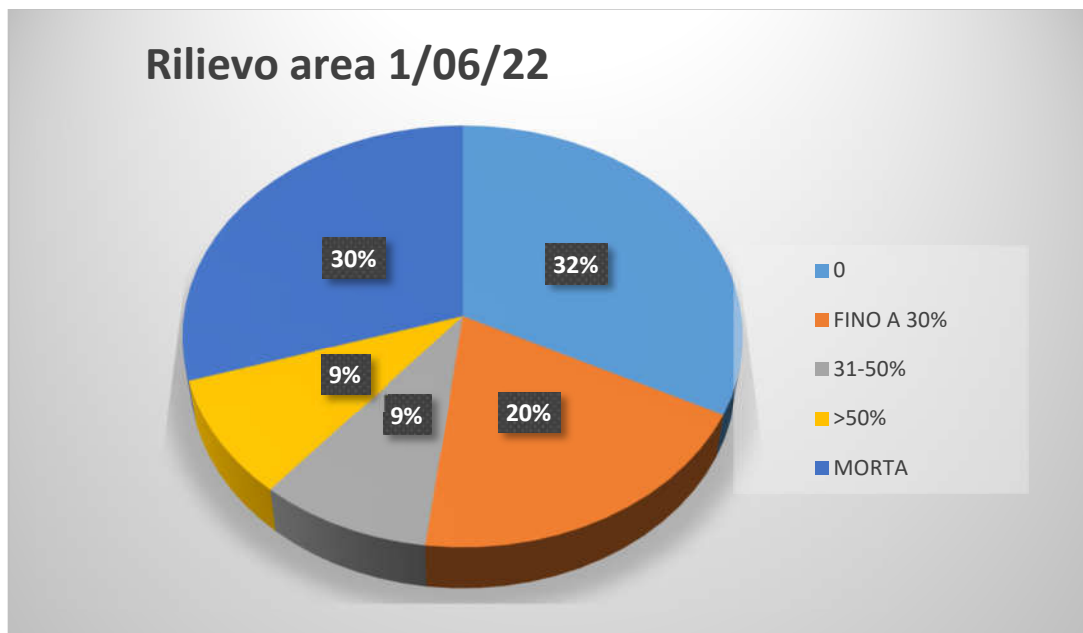


Figura 6-1: Rilievo area 1/06/22

In particolare, su 77 piante monitorate solo 25 sono risultate sane, vigorose e prive di sintomi di disseccamento, mentre 15 piante presentavano disseccamenti fino al 30%, 7 esemplari avevano una chioma compromessa tra 30-50 %, 7 piante presentavano una chioma compromessa per più del 50% e ben 23 piante erano morte (Fig. 6-1; Fig. 6-2).



Figura 6-2: Pianta morta in piedi (A), pianta fortemente colpita con chioma disseccata tra il 30% e il 50% (B), Pianta sana (C)

In genere le piante morte non erano isolate, ma costituivano piccoli aggregati, mettendo in evidenza che tale malattia ha una diffusione centripeta, ossia parte da una pianta infetta e successivamente pian piano interessa le piante limitrofe, con una diffusione a macchia d'olio (Fig. 6-3).



Figura 6-3: Piante morte per mal dell'inchiostro e capitozzate, raggruppate all'interno dell'area studio.

Nella diffusione della malattia, oltre alle condizioni stazionali, conformazionali dell'area studio, nonché le caratteristiche del suolo e la regimentazione delle acque piovane, un ruolo importante è svolto anche dalla fauna selvatica, rappresentata da branchi di cinghiali che frequentano la zona creando danni alle piante, portando alla luce le radici e trasportando a chilometri di distanza particelle di suolo che potrebbero contenere i propaguli degli oomiceti.

Su alcuni esemplari è stata riscontrata presenza di necrosi a fiamma ed essudati, che rappresentano anche l'espressione sintomatologica più specifica e la più grave della malattia. (Fig. 6-4).



Figura 6-4: Sintomi specifici di necrosi a livello del colletto, riscontrati durante il sopralluogo all'interno dell'area studio.

6.2 Risultati analisi di laboratorio e prove di antagonismo in vitro

L'analisi di laboratorio e in particolare l'estrazione del DNA, relativa amplificazione, sequenziamento su piattaforma Illumina e analisi metagenomica ha permesso di confermare, quanto già isolato *in vitro* mediante analisi micologiche. In particolare, nel suolo dell'area studio sono presenti *Phytophthora cambivora* e *Phytophthora plurivora* (Fig. 6-5) che, in studi precedenti condotti in collaborazione con l'Università di Padova, sono stati anche isolati da radici e dalle necrosi del colletto.



Figura 6-5: Colonie di *P. plurivora* e *P. cambivora*, allevate alla temperatura di 22°C su substrato a base di estratto di patate (foto: B. Linnaldeddu).

Per queste due specie di *Phytophthora* è stata valutata l'attività antagonistica *in vitro* di quattro formulati biologici commerciali (**Serenade**, **Lal STOP**, **Pikalín** e **Bion 50**), non registrati per il controllo del mal dell'inchiostro del castagno, a tre diverse concentrazioni **dose 1** (100 µl/2000 µl), **dose 2** (100 µl/5000 µl) e **dose 3** (100 µl/10000 µl).

Tutti i formulati utilizzati alle tre dosi hanno fornito una più o meno interferenza con la crescita di *P. cambivora* (Tab. 6-1).

Tabella 6-1: Indice di inibizione che i formulati biologici hanno espresso nel contenimento dello sviluppo di *P. cambivora*.

	Percentuale inibizione					
	16/09/22	17/09/22	19/09/22	20/09/22	21/09/22	22/09/22
CA BI 1	-6,98%	20,97%	20,27%	19,75%	22,47%	26,26%
CA BI 2	-13,95%	4,84%	-6,76%	-3,70%	-8,99%	-4,04%
CA BI 3	-9,30%	3,23%	-16,22%	-19,75%	-21,35%	-20,20%
CA SE 1	30,23%	50,00%	33,78%	40,74%	46,07%	51,52%
CA SE 2	5,81%	43,55%	33,11%	37,04%	41,01%	46,97%
CA SE 3	11,63%	33,87%	33,78%	38,27%	42,70%	48,48%
CA LA 1	0,00%	27,42%	39,19%	43,21%	48,31%	53,54%
CA LA 2	-4,65%	16,13%	24,32%	29,63%	37,08%	42,42%
CA LA 2	0,00%	12,90%	27,03%	30,86%	34,83%	40,40%
CA PIK 1	62,79%	67,74%	71,62%	74,07%	76,40%	78,79%
CA PIK 2	51,16%	62,90%	68,92%	72,84%	74,16%	76,77%
CA PIK 3	34,88%	46,77%	55,41%	58,02%	61,24%	65,15%

Dall'analisi dei dati, è stato possibile calcolare l'indice di inibizione, cioè la capacità che i formulati biologici hanno avuto nei confronti della crescita di *Phytophthora cambivora*. Nel rilievo del 22.09.22 il formulato che aveva maggiormente inibito la crescita è stato il **Pikalín** alla dose 1 (78,79%), dose 2 (76,77%) e dose 3 (65,15%) (Tabella 6-1, Fig. 6-6).

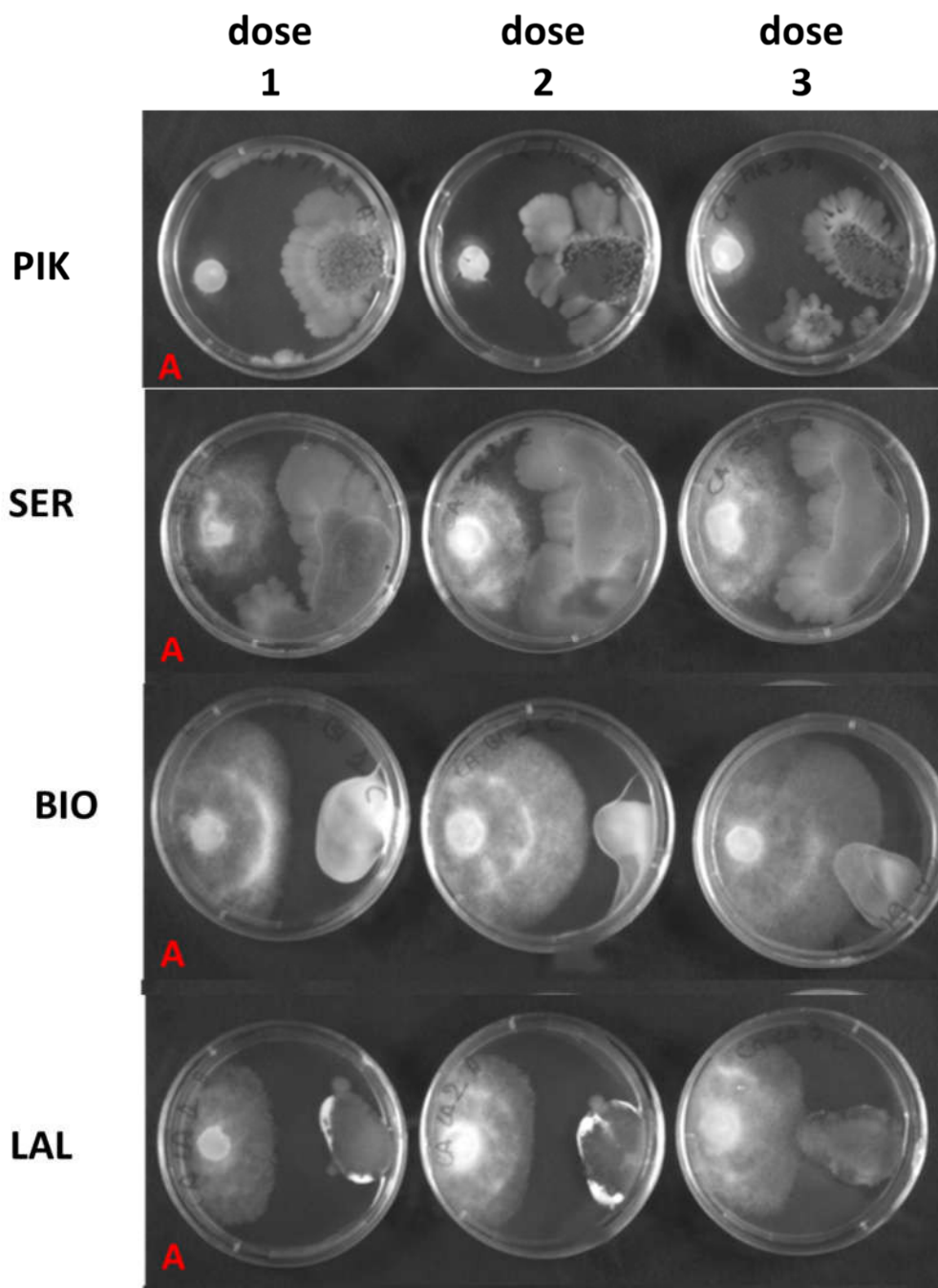


Figura 6-6: Test di antagonismo *in vitro*, in cui è stata allevata in piastra *Phytophthora cambivora* in presenza dei quattro formulati commerciali (Pikalín, Serenade, Bion e LAL Stop).

Oltre al Pikalin, anche il Serenade alle tre diverse dosi è riuscito a inibire la crescita di *P. cambivora* del 51,52% con la dose 1, del 46,97% con la dose 2 e del 48,48% con la dose 3. Risultati simili al Serenade sono stati ottenuti utilizzando le tre dosi di LAL Stop. Il Bion non ha avuto alcun effetto negativo sulla crescita delle colonie di *P. cambivora* in piastra.

Per quanto riguarda la percentuali di inibizione espressa dai formulati commerciali nei confronti di *Phytophthora plurivora*, il cui tasso di crescita è maggiore rispetto alla *P. cambivora*, anche in questo caso tutti i formulati hanno avuto un impatto negativo sulla crescita del patogeno.

Tabella 6-2: Indice di inibizione che i formulati biologici hanno espresso nel contenimento dello sviluppo di *P. plurivora*.

	Percentuale inibizione					
	16/09/22	17/09/22	19/09/22	20/09/22	21/09/22	22/09/22
PL BI 1	-2,00%	-10,00%	26,13%	31,75%	27,34%	25,78%
PL BI 2	-22,00%	-20,00%	16,22%	21,43%	19,53%	19,53%
PL BI 3	-22,00%	-26,67%	9,91%	13,49%	9,38%	8,59%
PL SE 1	36,00%	45,00%	70,27%	73,81%	74,22%	74,22%
PL SE 2	12,00%	26,67%	60,36%	65,08%	65,63%	66,41%
PL SE 3	18,00%	30,00%	62,16%	65,87%	67,19%	67,19%
PL LA 1	0,00%	10,00%	50,45%	56,35%	57,03%	57,03%
PL LA 2	-6,00%	3,33%	45,05%	50,79%	53,13%	51,56%
PL LA 2	-6,00%	3,33%	45,05%	50,79%	53,13%	51,56%
PL PIK 1	68,00%	73,33%	85,59%	86,51%	86,72%	86,72%
PL PIK 2	54,00%	61,67%	77,48%	81,75%	82,03%	82,03%
PL PIK 3	48,00%	55,00%	72,07%	78,57%	78,91%	78,91%

Il Pikalin si conferma il più efficace con una capacità di inibire lo sviluppo del patogeno compreso tra 78,91% (dose 3) all'86,72% (dose 1), seguito da Serenade con inibizione compresa tra 67,19% (dose 3) e il 74,22% (dose 1). Livelli di inibizione elevati sono stati anche raggiunti dal formulato LAL stop con valori compresi tra 51,56% (dose 3) e 57,06%

(dose 1). Nel caso della *P. plurivora* anche il Bion ha avuto una azione blanda di inibizione della crescita attestandosi tra 8,59% (dose 3) e 25,78% (dose 1) (Tab. 6-2; Fig. 6-7).

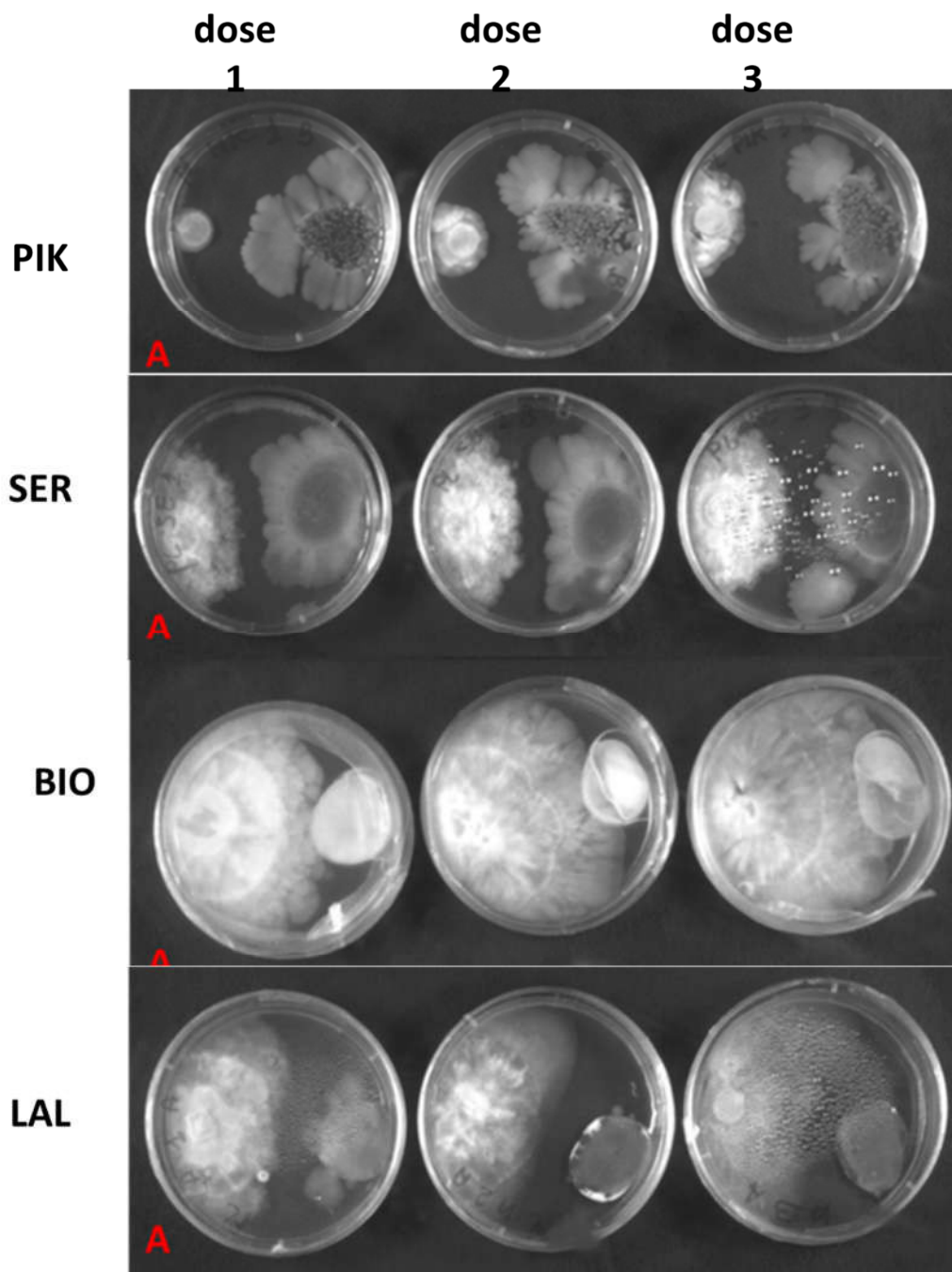


Figura 6-7: Test di antagonismo *in vitro*, in cui è stata allevata in piastra *Phytophthora plurivora* in presenza dei quattro formulati commerciali (Pikalin, Serenade, Bion e LAL Stop).

6.3 Prova preliminare di controllo del mal dell'inchiostro del castagno

È stata effettuata una prova preliminare di contenimento del mal dell'inchiostro all'interno dell'area di studio, andando a somministrare un concime organico a base di pollina pellettata. Dopo 58 gg dalla somministrazione è stato effettuato un rilievo per verificare se avesse avuto qualche effetto sulla vigoria delle piante e soprattutto sull'attenuazione dei sintomidi mal dell'inchiostro.

Nel secondo rilievo su 70 piante monitorate solo 19 sono risultate sane, vigorose e prive di sintomi di disseccamento, mentre 20 presentavano disseccamenti fino al 30%, 4 30-50 %, 4 presentavano una chioma compromessa >50% e 23 erano morte (Fig. 6-8).

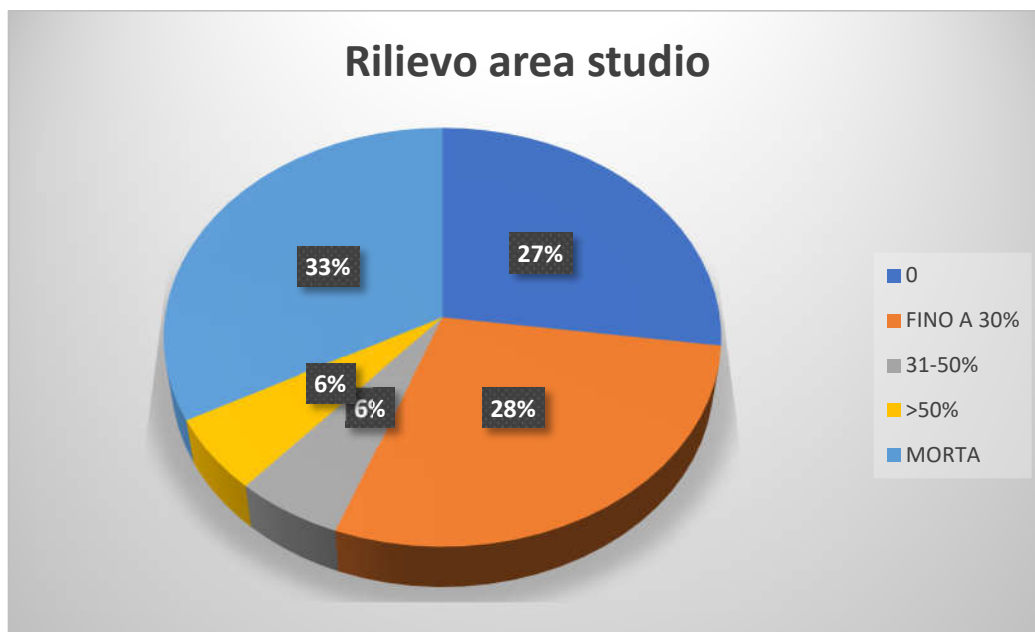


Figura 6-8: Rilievo fitosanitario effettuato il 21/07/2022 all'interno dell'area studio.

I dati registrati non sono significativamente diversi rispetto al primo rilievo, per cui lo stato sanitario è rimasto al momento stabile. Ulteriori rilievi saranno effettuati prima della raccolta, come anche si pensa di attuare ulteriori somministrazioni durante il riposo vegetativo, in modo modo tale che la pianta possa disporre di elementi nutritivi nel terreno durante la fase di ripresa.

7 CONCLUSIONI

La presente ricerca ha permesso di fare il punto della situazione sullo stato fitosanitario di un castagneto a Pozza frazione di Acquasanta Terme in provincia di Ascoli Piceno. Il mal dell'inchiostro è diffuso in tutti gli individui del sito indagato e pur essendo considerata ormai una malattia endemica, non va trascurata perché le piante, indebolite dai ripetuti attacchi del cinipide, e dalle alte e prolungate temperature estive legate alle limitate precipitazioni, risultano particolarmente suscettibili alla *Phytophthora*.

Nella presente tesi sono state valutate possibili applicazioni di formulati biologici nel contenimento della *Phytophthora* e di concimi organici NP. I formulati biologici commerciali utilizzati in vitro sono **Pikalin**, a base di anidride fosforico (P₂O₅) e ossido di potassio (K₂O), **Serenade** a base di *Bacillus subtilis*, ceppo QST 712, LALSTOP a base di *Streptomyces* ceppo K61 e Bion a base di BTH. Si tratta di formulati commerciali applicati nel controllo biologico di diverse malattie, che non erano stati utilizzati per il contenimento della *Phytophthora*. I formulati utilizzati in vitro, sono riusciti a inibire e a rallentare l'accrescimento del fungo in piastra. Quindi si potrebbero ipotizzare di allestire piccole prove in vivo in condizioni di campo.

Il concime organico utilizzato è a base di pollina maturata per almeno cinque mesi, neutralizzata, disidratata e compressa e non proveniente da allevamenti industriali. L'uso del concime dopo 58 gg dalla somministrazione ha mantenuto stabile in quadro fitosanitario dell'area. Ulteriori apporti di sostanza organica durante il riposo vegetativo o ancor meglio all'inizio della ripresa vegetativa potrebbero dare un maggiore vigore alle piante consentendo di superare o almeno mitigare lo stress biotico causato da infezioni multiple di *Phytophthora*.

8 BIBLIOGRAFIA

- Bounous G. 2002. Patologia. In Il castagno: coltura: ambiente ed utilizzazioni in Italia e nel Mondo
Mondo
- Inventario e Carta Forestale della Regione Marche – I.P.L.A.
- Cristinzio G. e Grassi G. 1993. Valutazione di resistenza a *Phytophthora cambivora* e *Phytophthora cinnamomi* in cultivar di *Castanea Sativa*.
- Turchetti T. e Maressi G. 2005 Phytosanitary criteria for the protection of chestnut orchards and stands against chestnut blight and inh disease.
https://italiawiki.com/pages/protisti/phytophthora_infestans.html
- Cristinzio G., Testa A., Severino E., De Vivo A. 2005. Suscettibilità di 12 cultivar di *Castanea sativa* a *Phytophthora cinnamomi*.
- Brown A. V. e Brasier C. M. 2007 Colonisation of tree xylem by *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae* and other *Phytophthora* species.
- Fenaroli L. 1945. Patologia: In Il castagno.
- Turchetti T., Maresi G., Nitti D., Guidotti A. e Miccinesi G. 2003. Il mal dell'inchiostro Mugello (Fi): danni e approcci di difesa. X
- Turchetti T. e Parrini C. 1993: indagini preliminari sul mal dell'inchiostro del castagno.
- Turchetti T., Maresi G., Nitti D., Guidotti A. e Miccinesi G. e Ratanadaro G. 2000. La diffusione del mal dell'inchiostro nei castagneti del Mugello (Fi).
- Vannini A. e Vettriano A. M. 2004. Aspetti di epidemiologia e difesa relativi alle principali avversità patologiche del castagno.
- Pignani C., Tamietti G., Eccher T., Gribaudo I., Schubert A e Bounous G. 1997. La coltura dei tessuti nello studio delle interazioni *Castanea spp./Phytophthora spp.*
- Il mal dell'inchiostro nel Veneto. Indagine preliminare nel primo focolaio di rinvenimento.
Anna Simonetto.

- ISPRA, Carta della Natura del Parco Nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga. 2017.
- MacDonald W.L. 1993: Disease of chestnut. In Proceedings International Congress on Chestnut. Ed E. Antognozzi. 451-455. Spoleto. Comunità Montana Monti Martani e Serano di Spoleto ed Istituto di Coltivazioni Arboree dell'Università di Perugia. 20-23 Ottobre
- D.M. 17 aprile 1998. Abrogazione di lotte obbligatorie prive di motivazioni scientifiche e tecniche nell'ambito del Servizio Fitosanitario nazionale. Gazzetta ufficiale n. 126, 2 giugno
- Turchetti T., Ferretti F., Maresi G. 2008. Natural spread of *Cryphonectria parasitica* and persistence of hypovirulence in three Italian coppiced chestnut stands. *Forest Pathology*, 38: 227 – 243
- CASTAGNE. Report di Filiera. Maggio. Ettore Fieramosca, Advisory Company
- COLDIRETTI. Articolo /Consumi, Economia. Arrivano le castagne italiane con 35 mln di kg 17 ottobre 2020
- Cristinzio G., Scalise A., Scalzi T., Manna P., Garcea A., Grassi G. 2002. Prove di lotta chimica e biologica al “mal dell'inchiostro del castagno”.Atti del Convegno, “Il Castagno in Calabria: Stato attuale, ricerca scientifica e prospettive”.Camigliatello Silano (CS), 24-25 ottobre 2002.
- Turchetti, T.; Maresi, G., 2004. Phytosanitary criteria for the management of chestnut orchards and stands. In: Proceedings of the IIIrd International Chestnut Congress (Ed. by Abreu, C. G.; Rosa, E.; Monteiro, A. A.) *Acta Hort.* 693, 521– 528.
- Breviglieri, N., 1955. Indagini ed osservazioni sulle migliori varietà italiane di castagno (*Castanea sativa* Mill.). Publ. n. 2. Centro di Studi sul Castagno, Florence, pp. 27–166.
- Urbinati e Micheletti, 2021. Repertorio biodiversità regionale Castagno
- Alessandri S., Dondini L., Urbinati C., Murolo S., 2022. Diversità genetica del castagno degli Appennini Emiliani e Marchigiani. VIII Convegno Nazionale SOI Castagno, 46.
- Maresi et al., 2008 modificato con Turchetti e Maresi, 2008 =
- Turchetti T. e Maresi G., 2008. Biological Control and Management of Chestnut Diseases, Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria, 10.1007/978-1-4020-8571-0, (85-118).

- Murolo S., Concas J., Romanazzi G., 2019. Use of biocontrol agents as potential tools in the management of chestnut blight. *Biological Control*, 132: 102-109,
- 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 (3), 540-545
- Rigling e Prospero, 2018 = Rigling D., Prospero S., 2018. *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Mol Plant Pathol.* 2018 Jan;19(1):7-20.