



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE FORESTALI E AMBIENTALI

**IL MARCIUME GESSOSO DELLE CASTAGNE:  
UNA PROBLEMATICHE EMERGENTE PER LA  
CASTANICOLTURA**

**BROWN CHESTNUT ROT: AN EMERGENT PROBLEM  
FOR CHESTNUT PRODUCTION**

TIPO TESI: SPERIMENTALE

Studente:  
RICCARDO FALAPPA

Relatore:  
PROF. SERGIO MUROLO

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	5
------------------------	---

<b>ABSTRACT</b> .....	6
-----------------------	---

*In recent years in agricultural crops as well as in forestry systems, there has been an increase of phytosanitary emergencies due to the entry of new pathogens from other continents or the recrudescence of diseases that were already endemic favoured by global warming. The spread of new pathogens favoured by globalisation with transport of infected material, combined with the climate change, has led to the presence of susceptible hosts. Recently, attention has been growing towards a fungus, which is able to infect Castanea causing brown rot on the fruits. In November 2023, at the D3A, 117 samples of chestnuts fruits were collected, coming from ‘Campi Catalogo Castagno del Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte di Chiusa Pesio’ (CN), ‘Centro Studi e Documentazione per il Castagno Marradi’, ‘Centro Regionale di Castanicoltura di Chiusa Pesio’ (CN), ‘Centro Studi e Documentazione sul Castagno di Marradi’ (FI), ‘CREA OFA Caserta’, ‘Consorzio Agro silvo castanicolo dell'Appennino Modenese’, ‘AGRIS Sardegna’ and ‘Azienda Agraria Sperimentale "Santa Paolina" at IBE CNR of Follonica. The samples were subsequently dissected and subjected to visual analysis to evaluate diffusion and severity parameters. G. castaneae was isolated in Petri plates and finally DNA extraction, gene amplification and sequencing of the ITS region and beta-tubulin were carried out for the identification and molecular characterization of the pathogen. From the data acquired, it emerged that the main alterations of the fruit are caused by brown rot, black rot, pink rot and green mould. Insect damage was also recorded. Chestnut brown rot is a particularly widespread problem in various areas and can have a serious impact on production. The genetic analysis of G. castaneae allowed on one hand to confirm the morphological identification and on the other to highlight that at least two haplotypes exist based on the beta-tubulin sequence. The geographical distribution and molecular characterization of the pathogen will be useful for setting containment plans for the spread of the pathogen in pre- and post-harvest. ....*

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	8
------------------------------	---

<b>1.1 Storia del castagno</b> .....	8
--------------------------------------	---

<b>1.2 Inquadramento biologico ed ecologico del castagno</b> .....	9
--	---

<b>1.3 Distribuzione del castagno in Europa, in Italia e nella regione Marche.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Problematiche fitosanitarie causate da insetti .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.2. Le cidie del castagno .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4.3. Il balanino del castagno .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Problematiche fitosanitarie causate da funghi e oomiceti .....</b>	<b>15</b>
<b>1.5.1 Cancro corticale del castagno .....</b>	<b>15</b>
<b>1.5.2 Mal dell'inchiostro del castagno .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5.3 I marciumi delle castagne .....</b>	<b>18</b>
<b>2. SCOPO DELLA TESI .....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Osservazione dei sintomi su campioni di castagne .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Isolamento di <i>G. castaneae</i> in piastre Petri e identificazione morfologica ....</b>	<b>28</b>
<b>4.RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>31</b>
<b>Fig. 25 - Risultati dell'analisi BlastN effettuata interrogando .....</b>	<b>38</b>
<b>il database NCBI per la regione ITS. ....</b>	<b>38</b>

BLAST® » blastn suite » results for RID-8FHDHURJ013

Home Recent Results Saved Strategies Help

[Edit Search](#) Save Search Search Summary ▾

How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title 2B-ITS\_KYO2\_C01.ab1

RID 8FHDHURJ013 Search expires on 07-06 18:06 pm [Download All](#) ▾

Program BLASTN Citation ▾

Database nt See details ▾

Query ID lcl|Query\_2683861

Description 2B-ITS\_KYO2\_C01.ab1

Molecule type dna

Query Length 585

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ⓘ

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show 100 ⓘ

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Gnomoniosis smithogilvi CBS 130190 ITS region from TYPE material	Gnomoniosis s...	1081	1081	100%	0.0	100.00%	624	NR_168040
<input checked="" type="checkbox"/> Gnomoniosis castaneae strain Behrend small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribe...	Gnomoniosis c...	1081	1081	100%	0.0	100.00%	1695	FP808767.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gnomoniosis smithogilvi isolate 14 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed s...	Gnomoniosis s...	1074	1074	99%	0.0	100.00%	637	OK661048.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gnomoniosis smithogilvi culture-collection ICMP-14079 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tr...	Gnomoniosis s...	1074	1074	99%	0.0	100.00%	635	KC145860.1

<b>Fig. 26 - Risultati dell'analisi BlastN effettuata interrogando il database NCBI.....</b>	<b>39</b>
<b>per la regione genica della Beta-tubulina. ....</b>	<b>39</b>
<b>5. CONCLUSIONI .....</b>	<b>40</b>

<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>41</b>
<b>7.SITOGRAFIA.....</b>	<b>49</b>
<b>8. RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>50</b>

## RIASSUNTO

*Negli ultimi anni si è assistito a un incremento delle emergenze fitosanitarie per le colture agrarie per i sistemi forestali, dovuto all'introduzione di patogeni provenienti da altri continenti o alla recrudescenza di malattie già presenti, ma non considerate pericolose, che a seguito del riscaldamento globale hanno trovato delle condizioni climatiche e un ambiente favorevoli. La diffusione dei nuovi patogeni favorita dalla globalizzazione con trasporto di materiale infetto, abbinato al cambiamento climatico a cui si sta assistendo, ha portato alla presenza di ospiti suscettibili. Recentemente, è andata crescendo l'attenzione verso un fungo, che si sviluppa a spese delle piante del genere Castanea e, in particolare, del frutto determinando il marciume gessoso delle castagne. Nel mese di Novembre 2023, presso il D3A, sono pervenuti 117 campioni di Castagne e Marroni coltivati e conservati presso i Campi Catalogo Castagno del Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte di Chiusa Pesio (CN), Centro Studi e Documentazione per il Castagno Marradi, Centro regionale di castanicoltura di Chiusa Pesio (CN), Centro Studi e Documentazione sul Castagno di Marradi (FI), CREA OFA Caserta, Consorzio Agro Silvo Castanicolo dell'Appennino Modenese, AGRIS Sardegna e Azienda Agraria Sperimentale "Santa Paolina" presso IBE CNR sede Follonica. I campioni sono stati successivamente sezionati e sottoposti all'analisi visiva per valutare i parametri di diffusione e gravità. Si è proceduto all'isolamento di *G. castaneae* in piastra Petri e infine è stata effettuata l'estrazione del DNA, l'amplificazione genica e il sequenziamento della regione ITS e della beta-tubulina per l'identificazione e la caratterizzazione molecolare del patogeno. Dai dati acquisiti è emerso che le principali alterazioni del frutto sono determinate dal marciume bruno, marciume nero, marciume rosa e muffa verde. Sono stati anche riscontrati danni da insetti. Il marciume gessoso è una problematica particolarmente diffusa in diversi areali e può incidere pesantemente sulle produzioni. L'analisi genetica di *G. castaneae* ha permesso da una parte di confermare l'identificazione morfologica e dall'altra di evidenziare che esistono almeno due aplotipi sulla base della sequenza della beta-tubulina. I dati di distribuzione geografica e di caratterizzazione molecolare saranno utili per impostare piani di contenimento per la diffusione del patogeno in pre- e post-raccolta.*

## ABSTRACT

*In recent years in agricultural crops as well as in forestry systems, there has been an increase of phytosanitary emergencies due to the entry of new pathogens from other continents or the recrudescence of diseases that were already endemic favoured by global warming. The spread of new pathogens favoured by globalisation with transport of infected material, combined with the climate change, has led to the presence of susceptible hosts. Recently, attention has been growing towards a fungus, which is able to infect *Castanea* causing brown rot on the fruits. In November 2023, at the D3A, 117 samples of chestnuts fruits were collected, coming from 'Campi Catalogo Castagno del Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte di Chiusa Pesio' (CN), 'Centro Studi e Documentazione per il Castagno Marradi', 'Centro Regionale di Castanicoltura di Chiusa Pesio' (CN), 'Centro Studi e Documentazione sul Castagno di Marradi' (FI), 'CREA OFA Caserta', 'Consorzio Agro silvo castanicolo dell'Appennino Modenese', 'AGRIS Sardegna' and 'Azienda Agraria Sperimentale "Santa Paolina" at IBE CNR of Follonica. The samples were subsequently dissected and subjected to visual analysis to evaluate diffusion and severity parameters. *G. castaneae* was isolated in Petri plates and finally DNA extraction, gene amplification and sequencing of the ITS region and beta-tubulin were carried out for the identification and molecular characterization of the pathogen. From the data acquired, it emerged that the main alterations of the fruit are caused by brown rot, black rot, pink rot and green mould. Insect damage was also recorded. Chestnut brown rot is a particularly widespread problem in various areas and can have a serious impact on production. The genetic analysis of *G. castaneae* allowed on one hand to confirm the morphological identification and on the other to highlight that at least two haplotypes exist based on the beta-tubulin sequence. The geographical distribution and molecular characterization of the pathogen will be useful for setting containment plans for the spread of the pathogen in pre- and post-harvest.*



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Storia del castagno

Il castagno (*Castanea sativa*) ha sopravvissuto alle ultime glaciazioni in diverse aree dell'Europa Meridionale. In Italia, alla fine dell'ultima era glaciale, era localizzato lungo il versante tirrenico degli Appennini (più mite rispetto al versante adriatico sferzato dai freddi venti provenienti da Est), dalla Campania alle Alpi Liguri. Nell'Italia Settentrionale era presente nelle zone collinari del Veneto e dell'Emilia-Romagna (Krebs et al., 2004, 2014). Le prime testimonianze che indicano la presenza del castagno in Italia risalgono all'epoca della colonizzazione della penisola da parte dei greci. All'epoca, il castagno era particolarmente apprezzato per la produzione di legno come materiale di costruzione e per la produzione di carbone (Krebs et al., 2014). I greci furono i primi a introdurre le prime tecniche di coltivazione e selezionarono le varietà che riproducevano i caratteri più apprezzati attraverso la moltiplicazione per innesto (Krebs et al., 2014). Con i romani il castagno venne introdotto in varie zone d'Europa applicando le tecniche tramandate nel corso del tempo dall'epoca dei primi insediamenti greci in Italia.

L'utilizzo dei castagni da parte dei romani era incentrato sulla produzione di paleria per le strutture, piuttosto che per la coltivazione a frutto (Conedera et al., 2000).

Nel Medioevo i castagni vennero principalmente coltivati per la produzione di frutti, soprattutto all'interno dei monasteri rimanendo comunque la fonte principale per la produzione di materiale da costruzione (Pontecorvo, 1932; Tabet, 1936).

Nel corso del tempo, il castagno assunse un ruolo determinante nell'economia europea fino agli inizi del 1900. Dopo di che, l'industrializzazione, l'abbandono delle aree rurali e montane e l'insorgenza di devastanti problematiche fitopatologiche fecero registrare una contrazione delle superfici e delle produzioni di castagne.

A seguito dell'abbandono dei castagneti, in particolare nelle zone montane, si registrò una conversione a ceduo su vaste aree e vennero introdotte nuove specie arboree a rapido accrescimento che di fatto sostituirono il castagno (Bernetti, 1998; Conedera et al., 2000; Paci et al., 2003; Manetti et al., 2004; Pividori et al., 2006).

Solo a partire dagli anni '90 la castanicoltura venne rivalutata, a seguito della ripresa della domanda di frutti sul mercato per il consumo fresco e per l'industria di trasformazione (Bounous et al., 2014).



## 1.2 Inquadramento biologico ed ecologico del castagno

Il castagno europeo (*Castanea sativa*) è un albero deciduo, monoico appartenente alla famiglia delle *Fagaceae* (Raimondi, 2019). Gli esemplari possono raggiungere un'altezza massima di 30 metri ed essere molto longevi, raggiungendo dimensioni tali da essere classificati come alberi monumentali, solo nelle Marche sono presenti 20 esemplari (Regione Marche, 2014). La chioma si presenta con una forma globosa e presenta foglie semplici, alterne, lanceolate oblunghe e margine seghettato. La pagina superiore si presenta di colore verde scuro e lucida rispetto alla pagina inferiore, che risulta opaca e chiara (Raimondi, 2019).

Per quanto riguarda il fusto, negli individui giovani la corteccia si presenta liscia, con una colorazione tendente al bruno-rossastro, mentre negli esemplari adulti la corteccia diventa bruna/grigiastra e tende a screpolarsi longitudinalmente (Bounous et al., 2002). I giovani rami sono caratterizzati dalla presenza di lenticelle localizzate soprattutto nella parte terminale degli stessi. L'apparato radicale è inizialmente di tipo fittonante per poi diventare fascicolato senza raggiungere elevate profondità. Le radici laterali non sono numerose, ma presentano numerose ramificazioni (Gellini et al., 1996). Frequenti sono le associazioni simbiotiche a livello radicale con numerose specie di funghi ectomicorrizici.

I fiori maschili sono amenti che raggiungono una lunghezza massima di 15 cm mentre quelli femminili sono sessili, costituiti da fiori singoli o riuniti a gruppetti di 2-3, e presentano un ovario infero a 6-9 carpelli con stili rigidi e pelosi alla base e ricoperti da una cupola verde, la quale a maturazione diventerà il riccio (Bounous et al., 2002).

Il frutto è un achenio, che si presenta con un pericarpo di color marrone scuro e lucido racchiuso in un numero di 1-3, all'interno di un involucri spinoso denominato riccio. Le varietà di castagno vengono differenziate principalmente in base alle caratteristiche del frutto in castagne e marroni. Nel corso del tempo sono state individuate varietà derivanti dall'incrocio tra castagno europeo e giapponese che sono risultate resistenti al cancro corticale e talvolta al mal dell'inchiostro (Montemartini et al., 1913).

Il castagno predilige ambienti temperati-caldi con temperature medie comprese tra 8-15 °C e precipitazioni di 600-800 mm annui fino a un massimo di 1500 mm/anno.

La specie resiste bene al freddo invernale fino a temperature di -20 °C e riesce a completare il ciclo vegetativo dove la media mensile è superiore ad almeno 10 °C per un periodo minimo di 6 mesi. In zone dove le temperature medie annue risultano inferiori a

4 °C il castagno non è presente (Pecchi et al., 2019). Soffre le gelate tardive e condizioni di siccità prolungata. Raggiunge altitudini comprese tra i 300 e 1200 m.s.l.m. in relazione anche dalla latitudine e delle condizioni macro-microclimatiche.

Dal punto di vista pedologico cresce con difficoltà su terreni calcarei, preferendo suoli leggermente acidi o neutri dove il pH si mantiene tra 4 e 6,5. Importante è anche la quantità di sostanza organica presente a livello del terreno, anche se il castagno può adattarsi a vivere in terreni poveri di nutrienti. I castagni preferiscono terreni sciolti con una buona capacità drenante preferibilmente con una percentuale di sabbia che si aggira attorno al 70%. Al contrario suoli argillosi sono spesso soggetti a ristagno idrico, il quale può portare la pianta a condizioni di stress con conseguente attacco da parte di eventuali agenti fitopatogeni.

### 1.3 Distribuzione del castagno in Europa, in Italia e nella regione Marche

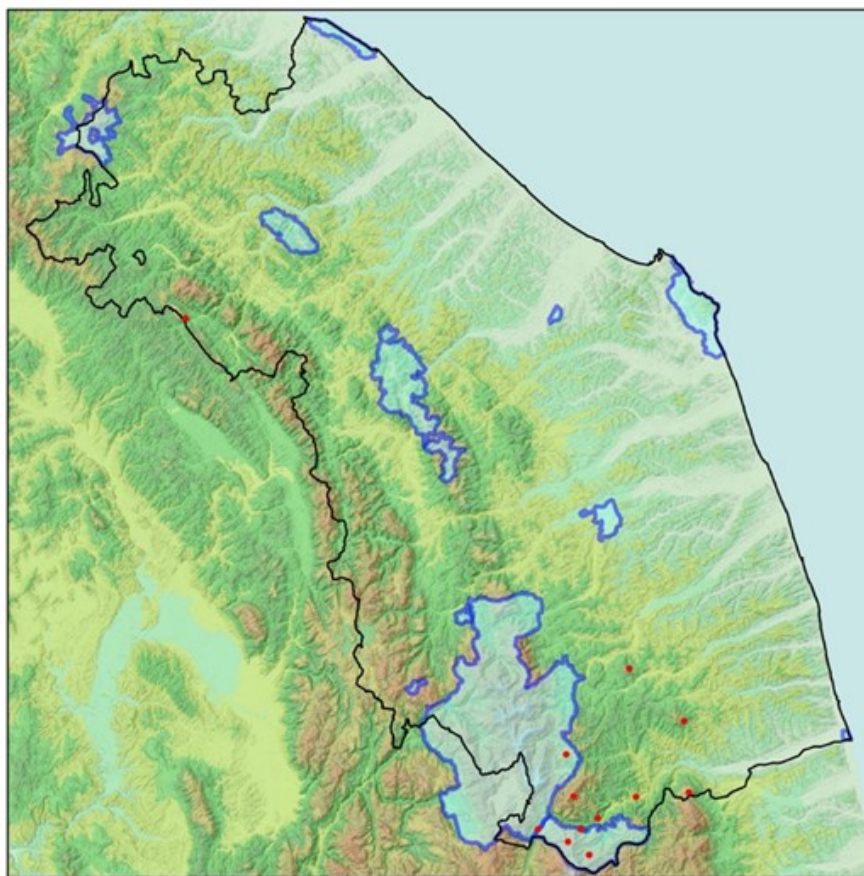
A livello europeo la specie di castagno presente è *Castanea sativa Mill.* distribuita in Croazia, Portogallo, Spagna, Francia, Grecia, Bulgaria, Italia, Slovenia, Turchia estendendosi fino al Mar Caspio. In Africa Settentrionale, il castagno europeo si può trovare in nuclei dislocati dal Marocco alla Tunisia e anche nelle isole Madeira, Azzorre e Canarie (Fig. 1).



**Figura 1** - Carta della distribuzione del castagno europeo in Europa (Euforgen).

In Italia la specie è distribuita principalmente nell'Appennino e nelle aree pedemontane delle Alpi e Prealpi, in particolare coinvolgendo Piemonte, Lombardia, Liguria, Emilia-Romagna, Toscana, Lazio, Campania e Calabria.

Nelle Marche la superficie complessiva dedicata ai castagneti da frutto si aggira attorno ai 980 ha (Rete Natura 2000, Regione Marche). L'Habitat del castagno è fortemente condizionato dal substrato, infatti la maggior parte dei castagneti, in questa regione, si sviluppa dove si possono trovare substrati che presentano valori di pH da neutri ad acidi (calcari decalcificati, calcari selciferi e arenarie). I castagneti sono concentrati principalmente nella provincia di Ascoli Piceno, nelle aree alto-collinari e pedemontane in Appennino, dove il clima si mantiene fresco e umido in boschi misti, mesofili, governati a ceduo o ad alto fusto, in associazione con specie della classe *Querc-Fagetea* (Habitat 9260). Diffusi in nuclei sporadici lungo la dorsale umbro-marchigiana e sui massicci dei Monti Sibillini e dei Monti della Laga (Rete Natura 2000, Regione Marche) (Fig. 2).



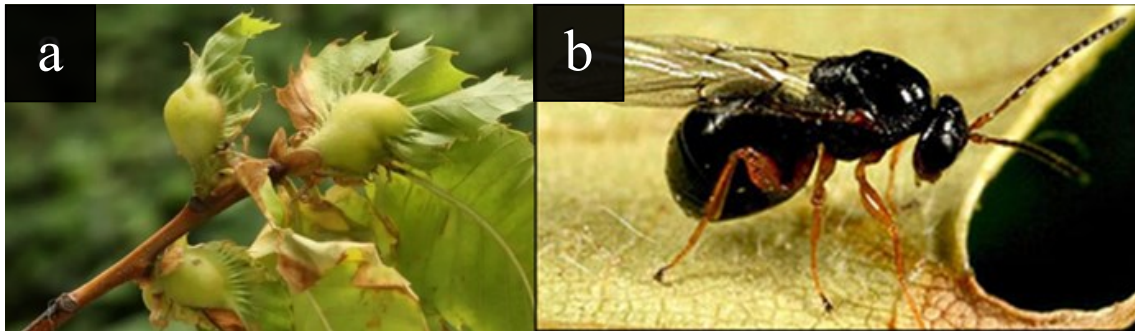
**Figura 2** - Mappa dei castagneti nelle Marche (aree in celeste) (Rete Natura 2000).

## 1.4 Problematiche fitosanitarie causate da insetti

Le principali problematiche fitosanitarie determinate da insetti per il castagno sono: cinipide galligeno, cidie e balanino del castagno di seguito descritte.

### 1.4.1. Cinipide galligeno del castagno

*Dryocosmus kuriphilus* (cinipide galligeno del castagno o comunemente chiamato vespa del castagno) (Fig. 3), è una specie esotica originaria della Asia che provoca la formazione di galle su foglie, infiorescenze e germogli, riducendo la superficie fotosintetizzante e causando talvolta danni irreversibili. Forti infestazioni, determinano una chioma molto diradata e un aumentano della suscettibilità della pianta ad attacchi di altri patogeni (Kato et al., 1997).



**Figura 3** - (a) Galle causate da *Dryocosmus kuriphilus* su foglie di castagno; (b) Adulto di *Dryocosmus kuriphilus* (Gyorgy Csoka, Hungary Forest Research Institute, Bugwood.org).

Il ciclo vitale dell'insetto prevede che le femmine sfarfallino tra giugno e inizio agosto per poi andare ad ovideporre nelle gemme presenti sulla pianta. Tra agosto e settembre avviene la schiusura delle uova con lo sviluppo del primo stadio larvale, che consentirà al cinipide di superare l'inverno.

Nella primavera successiva, alla ripresa vegetativa, la presenza delle larve causa la reazione della pianta con la formazione di galle, che sono ingrossamenti di forma più o meno tondeggianti localizzate sui germogli, sulle foglie e sulle infiorescenze della pianta. Questi sintomi portano alla riduzione dello sviluppo dei germogli, andando poi a compromettere la produzione dei frutti.

L'insetto venne segnalato per la prima volta in Italia in Piemonte nel 2002 e si diffuse rapidamente nelle altre regioni.

Negli anni successivi il suo areale si è esteso interessando anche altre regioni d'Europa (Sabbatini et al., 2014). Nel 2011 il Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (MiPAAF) ha istituito una specifica sezione “Frutta Guscio – sez. Castagno” con l’obiettivo di affrontare le problematiche fitosanitarie e in particolare la lotta biologica al cinipide attraverso l’introduzione dell’imenottero *Torymus sinensis*. Gli antagonisti del cinipide vennero rilasciati dapprima nel 2005 in Piemonte e successivamente in tutte le altre regioni. L’intervento portò a efficace contenimento dell’infestazione e negli anni successivi alla ripresa delle produzioni su livelli comparabili alle annate precedenti all’arrivo dell’insetto (Sabbatini et al., 2014).

#### ***1.4.2. Le cidie del castagno***

Si tratta di lepidotteri le cui larve si sviluppano a carico delle castagne e possono determinare ingenti perdite di produzione (Fig. 4). Tra quelli che causano più danni nei castagneti troviamo *Pammene fasciana*, *Cydia fagiglandana* (Zeller) e *C. splendana* (Hübner) (Ferraccini et al., 2020).



**Figura 4** - Adulto di *Pammene fasciana*, ([www.ukmoths.org.uk](http://www.ukmoths.org.uk)).

Lo sfarfallamento degli adulti si ha dai primi giorni di giugno fino a settembre. La maggior parte degli individui sfarfalla a luglio in quanto si ha la fioritura del castagno,



con un numero maggiore di individui nella seconda metà di luglio, periodo che coincide con la fioritura della pianta ospite e le prime fasi dello sviluppo dei frutti (Müller et al., 1957; Mansilla et al., 1993).

La femmina depone le uova sulle foglie, dove le larve iniziano a nutrirsi e solo successivamente penetrano nei ricci e nelle castagne in via di formazione. I ricci colpiti diventano bruni e cadono in anticipo. Le larve, una volta mature, si spostano dai frutti verso il terreno, dove vanno a formare un bozzolo sericeo all'interno del quale rimangono fino all'anno successivo. Tra maggio e giugno si forma la crisalide, alla quale poi segue la completa metamorfosi e lo sfarfallamento dell'adulto (Müller et al., 1957; Bogenschütz 1991; Mansilla e Salinero 1993; Hancock et al., 2015). Per quanto riguarda le strategie di controllo che si possono adottare per cercare di ridurre la diffusione del lepidottero si utilizza il fungo *Beauveria bassiana* oppure estratti naturali di piante come il rotenone.

In entrambi i casi ci sono problemi riguardanti l'efficacia, in quanto le cidee si sviluppano all'interno delle castagne. Si sta rivelando efficace, inoltre, l'utilizzo di feromoni femminili che vengono dispersi nell'ambiente in modo tale che i maschi non siano più in grado di localizzarle (Sabbatini et al., 2014).

#### **1.4.3. Il balanino del castagno**

Si tratta di insetti che fanno parte della famiglia dei coleotteri. Gli adulti di *Curculio elephas* (Fig. 5) e le larve di si nutrono di castagne e di ghiande (Venette et al., 2003).



**Figura 5** - Adulto di *Curculio elephas* ([www.cabidigitallibrary.org](http://www.cabidigitallibrary.org)).

La femmina depone le uova all'interno dei frutti dove le larve scavano gallerie nutrendosi dell'endosperma (Bonal et al., 2007; Velez-Gavilan, 2022).

## **1.5 Problematiche fitosanitarie causate da funghi e oomiceti**

Tra le problematiche fitosanitarie causate da funghi e oomiceti che possono attaccare il castagno ricordiamo il cancro corticale, mal dell'inchiostro del castagno e marciume delle castagne. Di seguito si riportano gli agenti associati a tali malattie e i principali sintomi.

### **1.5.1 Cancro corticale del castagno**

*Cryphonectria parasitica* è l'agente che causa il cancro corticale del castagno. Originario dell'Asia (Cina, Giappone, Corea) (Lee et al., 2005; Myburg et al., 2004) si è diffuso rapidamente in altri continenti attraverso piante di castagno infette. Segnalato per la prima volta nel 1904 sul castagno americano nel Parco Zoologico di New York City.

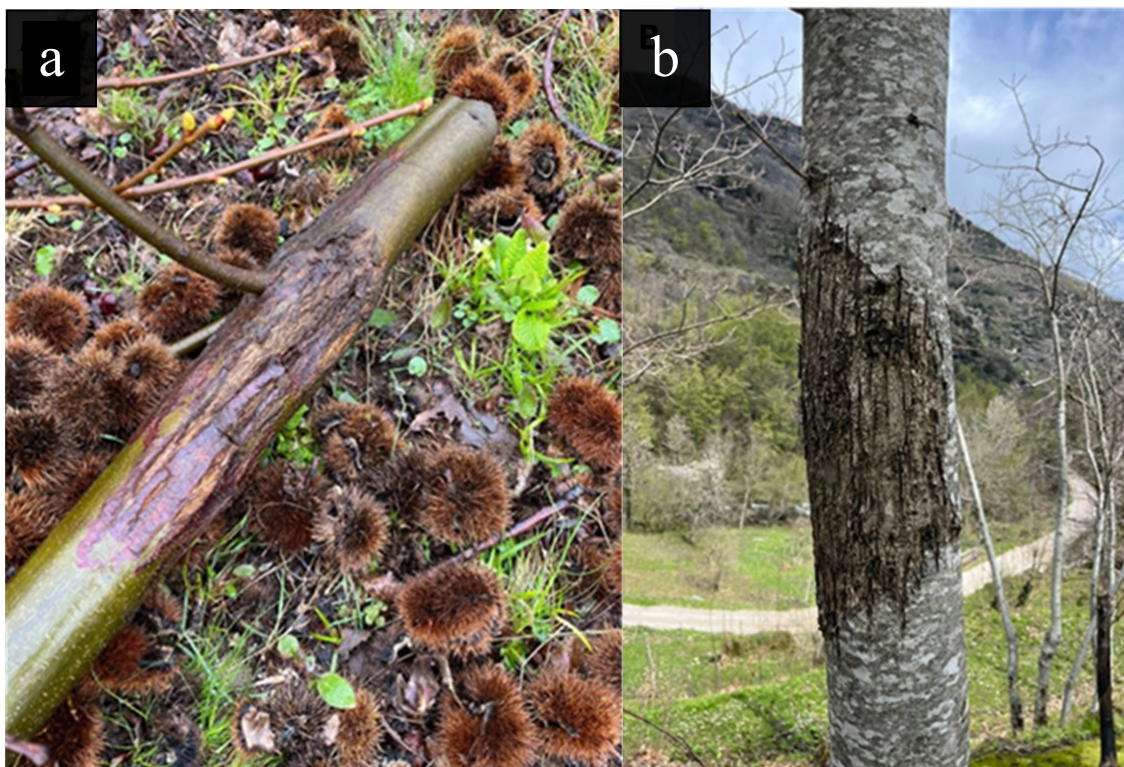
In Nord America, si sono registrati i danni più rilevanti in quanto gran parte dei castagneti di *Castanea dentata* sono stati attaccati con conseguente deperimento a seguito di una diffusione epidemica del patogeno. In Europa, tale patogeno colpì il castagno europeo (*Castanea sativa* Mill.), ma con una severità di danni non paragonabile all'epidemia registrata in America Settentrionale.

La manifestazione dei sintomi varia a seconda sia della virulenza del ceppo di *C. parasitica* sia dell'età della pianta (Heiniger et al., 1994; Prospero et al., 2013). I ceppi virulenti di *C. parasitica* producono tipicamente lesioni necrotiche (i cosiddetti cancri) sulla corteccia (Fig. 6A), che nei casi più gravi possono portare al disseccamento dei rami entro breve tempo. Durante i primi stadi del processo infettivo sono visibili delle aree rosso-rugginose ipotrofiche con margine rilevato, presenti nel punto di penetrazione del fungo (Prospero et al., 2013). Questi sono chiari sintomi di necrosi del tessuto cambiale e floematico. La conseguente disidratazione dovuta al blocco del trasporto della linfa elaborata all'interno dei tessuti infetti, porta in seguito alla fessurazione della corteccia.

*C. parasitica* è difficile da riconoscere fino a quando non compaiono fenditure longitudinali nella corteccia che permettono di rendere visibile il legno sottostante e, in

alcuni casi se le condizioni climatiche decorrono umide, anche il micelio del fungo (Diller, 1965).

Con l'avanzare dell'infezione anche i vasi xilematici si occludono e i sintomi si fanno più evidenti: le foglie appassiscono, diventano gialle o marroni e in genere rimangono appese ai rami secchi infetti. La pianta, a sua volta, cerca di reagire all'infezione producendo numerosi getti epicormici al di sotto dei cancri.



**Figura 6** - Cancro determinato da ceppo di *C. parasitica* virulento (a) e ipovirulento (b).

La presenza in natura di ceppi ipovirulenti di *C. parasitica*, che determinano lesioni corticali superficiali, ha portato all'instaurarsi di un equilibrio ecologico e a riscontrare minori danni nei castagneti. L'ipovirulenza nei ceppi di *C. parasitica* è causata da un micovirus CHV-1 della famiglia *Hypoviridae* che iperparasitizza il fungo vivendo all'interno del citoplasma (Choi e Nuss, 1992).

Il fenomeno dell'ipovirulenza è stato osservato per la prima volta in Italia negli anni '50 in castagneti infetti che mostravano segni di guarigione spontanea dalla malattia (Heiniger et al., 1994). L'ipovirus può essere trasmesso da un ceppo ipovirulento a un



ceppo fungino virulento tramite anastomosi ifale (Hoegger et al., 2003; Milgroom e Cortesi, 2004).

La trasmissione dell'ipovirulenza si verifica quando esiste compatibilità vegetativa tra i due individui. Sfruttando queste proprietà è stato possibile introdurre in natura ceppi ipovirulenti compatibili per mitigare e controllare la popolazione di ceppi di *C. parasitica* (Heiniger et al., 2009; Prospero et al., 2016; Robin et al., 2010).

L'ipovirus, una volta all'interno del citoplasma del fungo modifica la capacità del fungo di produrre tossine e riduce la sua capacità di differenziare strutture riproduttive, la pianta reagisce e confina l'infezione negli strati più superficiali della corteccia, favorendo anche la cicatrizzazione delle ferite cancerose (Fig. 6b).

### **1.5.2 Mal dell'inchiostro del castagno**

Questa malattia rientra nel gruppo dei marciumi radicali e può essere causata da diverse specie del genere *Phytophthora*, tra cui *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. cactorum*, *P. castanetorum*, *P. plurivora*, *P. pseudosyringae*, *P. cryptogea* (Jung et al., 1996; Vettraino et al., 2001). *P. cambivora*, descritta per la prima volta nel 1917 da Petri, questa malattia, proveniente dall'Asia venne segnalata per la prima volta in Spagna nel 1700. Nel secolo successivo fece la sua comparsa negli Stati Uniti sul castagno americano e in Europa su individui di *Castanea sativa*. Agli inizi del 1800, Selva notò una grave epidemia che causava la morte di molti castagni. Non conoscendo l'agente eziologico che causava la malattia venne definita inizialmente col nome generico di "moria dei castagni". La malattia venne descritta per la prima volta da Pulcinelli nel 1859.

*Phytophthora* è un oomicete che si conserva e propaga prevalentemente nel suolo. I sintomi specifici comprendono marciume radicale, dove le radici assumono una colorazione tendente al viola-nero e risultano morbide, spugnose e fragili al tatto. La necrosi dei tessuti radicali porta a una riduzione della capacità pollonifera.

In risposta la pianta reagisce in corrispondenza delle necrosi, producendo tannini, essudati di color scuro come l'inchiostro, che dà poi il nome alla malattia. Quando la corteccia viene rimossa dalla base del fusto o dalle radici, si osservano aree brune e necrotiche a livello del cambio. Queste aree, vengono definite "necrosi a fiamma" in quanto assumono una forma di triangolo con vertice rivolto verso l'alto, raggiungendo anche gli 80 cm dalla base del fusto (Fig. 7).

La malattia può avere un decorso acuto, con la morte dell'individuo durante una stagione vegetativa, oppure la malattia può progredire più lentamente e in questi casi la morte avviene negli anni successivi.



*Figura 7 - Sintomi tipici del mal dell'inchiostro del castagno con evidente necrosi a fiamma e produzione di essudati in corrispondenza del colletto.*

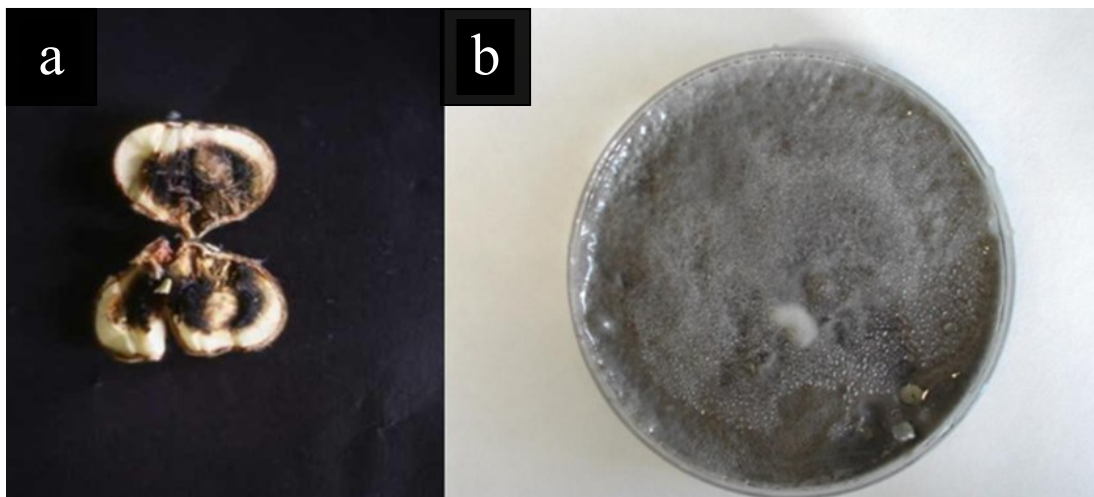
Sintomi aspecifici sono caratterizzati da una chioma rada con foglie che mostrano microfillia e tendono a perdere brillantezza per poi ingiallire. La crescita dei rami diminuisce fino al totale disseccamento. In estate, nei casi più gravi, si verifica una precoce caduta delle foglie. I ricci possono essere più piccoli rispetto a quelli di piante sane e persistono sulla pianta insieme alle foglie disseccate.

### ***1.5.3 I marciumi delle castagne***

La castagna può essere soggetta durante le fasi di conservazione a diversi tipi di marciume, che vanno sotto il nome di marciume nero, marciume rosa, marciume verde e marciume bruno.

Il marciume nero (Fig. 8a) è determinato da *Ciboria batschiana* (Fig. 8b), un fungo endofita che appartiene alla famiglia *Sclerotiniaceae*. L'endosperma infetto viene

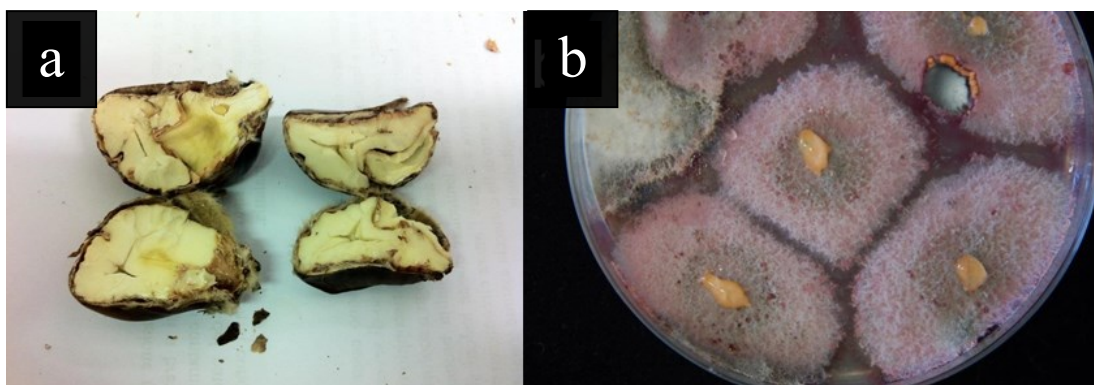
colonizzato completamente dal fungo, viene disidratato e va incontro a quel fenomeno conosciuto come “mummificazione”, sul quale si differenziano pseudosclerotidi neri e amorfi, strutture particolarmente utili per garantire la sopravvivenza dello stesso.



**Figura 8** - (a) Tessuti interni della castagna compromessi da marciume nero; (b) Colonia di *C. batschiana* isolata su substrato artificiale (Turchetti 1986).

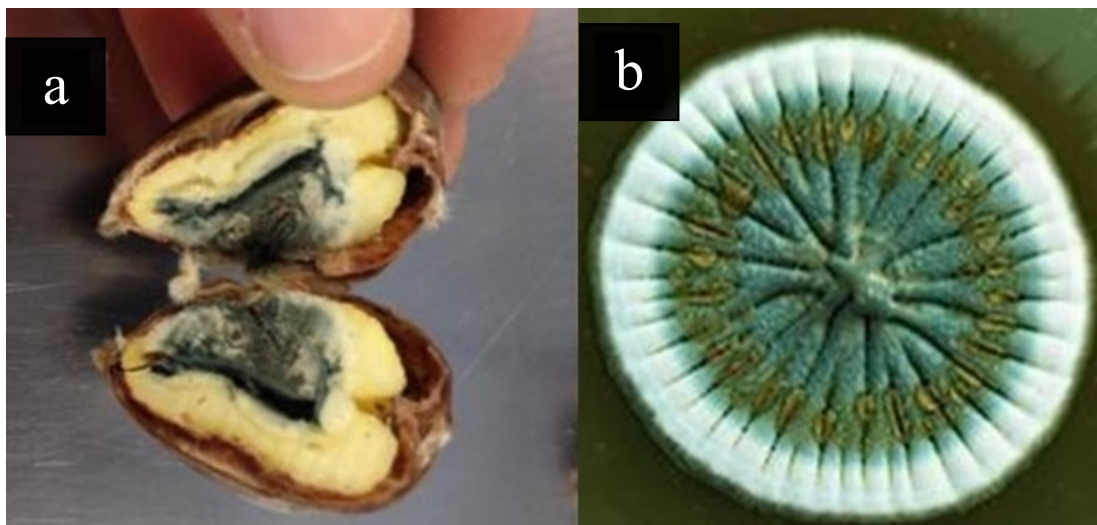
Il marciume rosa (Fig. 9), causato dal *Colletotrichum acutatum* (fungo endofita), è una alterazione del frutto che può causare perdite delle qualità organolettiche del prodotto.

Il fungo può attaccare diverse specie di piante e frutti che possono ritrovarsi sia in ambiente tropicale che temperato. I conidi del fungo si disperdono attraverso l'umidità e la pioggia in genere durante la stagione primaverile soprattutto se decorre umida. Il micelio del fungo si presenta nei primi stadi dell'infezione con una colorazione tendente al bianco per poi diventare grigio, arancione pallido e rosa (Damm et al., 2012).



**Figura 9** - (a) Tessuti interni della castagna compromessi da marciume rosa; (b) Isolamenti in coltura in vitro di *C. acutatum* (Turchetti 1986).

Agente della muffa verde (Fig. 10), il *Penicillium* attacca varie tipologie di frutto, tra i quali anche le castagne. Il micelio differenzia rami conidiofori e numerosi conidi di forma sferica caratterizzati da una colorazione tendente al verde-grigiastro. L'abbondante produzione di conidi e condizioni di umidità elevata aumentano la probabilità che tale fungo possa determinare importanti danni all'interno dell'endosperma, rendendo i frutti non commestibili anche perché potenzialmente contaminati da micotossine prodotte dagli stessi.



**Figura 10** - (a) Tessuti interni della castagna compromessi da marciume verde; (b) Isolamenti in coltura in vitro di *Penicillium* (Turchetti 1986).

Infine, poiché il marciume gessoso delle castagne è una problematica fitosanitaria emergente per la produzione di castagne, si ritiene opportuno fare un approfondimento.

### **1.6 Il marciume gessoso delle castagne**

Il fungo responsabile del marciume gessoso delle castagne è *Gnomoniopsis castaneae*, Ascomicota dell'ordine *Diaporthales*. Vive come endofita all'interno dell'endosperma dei frutti causando in condizioni favorevoli il marciume.

Può attaccare diverse specie appartenenti alla famiglia *Betullaceae*, *Fagaceae*, *Oleaceae* e *Pinaceae* (Visentin et al., 2012; Shuttleworth et al., 2012; Fernandez et al., 2017).

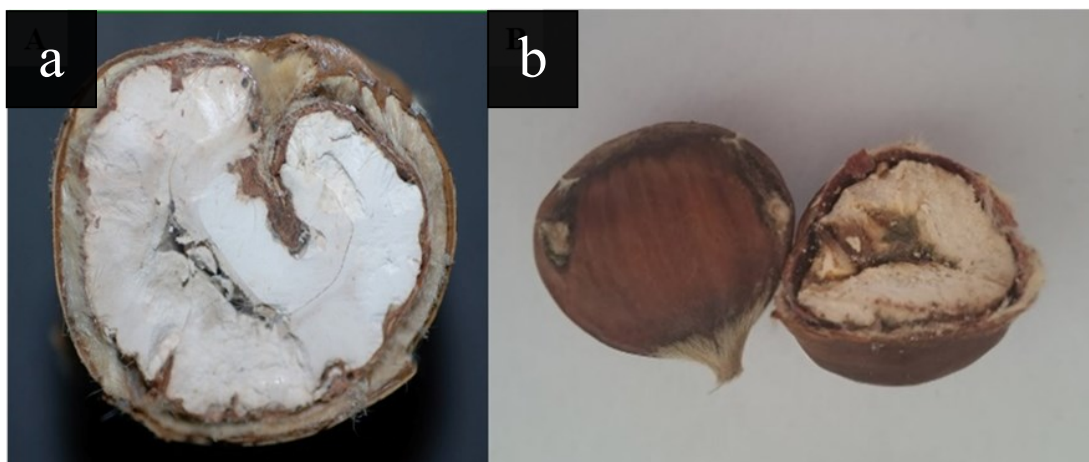
Secondo l'Organizzazione Europea e Mediterranea per la Protezione delle Piante (EPPO 2022), l'agente patogeno è ora presente in 19 paesi: Australia, Belgio, Cile,



Croazia, Repubblica Ceca, Francia, Grecia, India, Italia, Irlanda, Paesi Bassi, Nuova Zelanda, Portogallo, Slovenia, Spagna, Svizzera, Turchia, Regno Unito, Stati Uniti.

L'infezione è responsabile della degradazione, della disidratazione e dell'alterazione del colore dell'endosperma, causando una perdita di qualità e valore sul mercato del prodotto.

Al momento della raccolta, sezionando la castagna si possono notare diversi sintomi, che variano in base allo stato di diffusione del patogeno nel frutto. Esternamente i sintomi non sono visibili. Nei primi stadi dell'infezione, l'endosperma si presenta biancastro, duro al tatto con una consistenza "gessosa", progressivamente assume una colorazione che tende al bruno (Fig. 11), che può interessare l'intero frutto (Lione et al., 2015; Maresi et al., 2013; Shuttleworth et al., 2012).



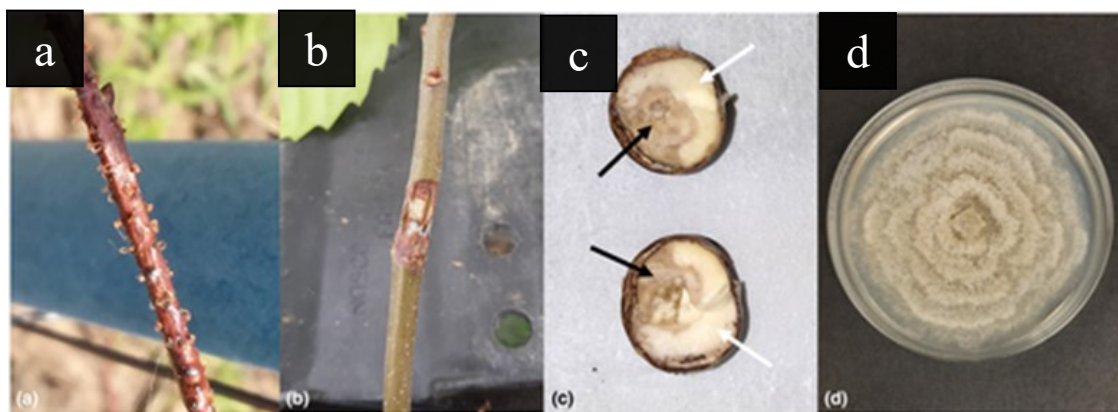
**Figura 11** - Tessuto di castagne interessate dal marciume gessoso causato da *Gnomoniopsis castaneae* (Maresi 2013).

Può capitare che il fungo sia presente anche in castagne che non mostrano sintomi a livello dell'endosperma, in tal caso la malattia è difficilmente diagnosticabile tramite un'analisi visiva.

Il fungo, oltre a essere agente di marciume del frutto, può determinare la morte delle gemme e causare la presenza di cancri corticali localizzati, che sono molto simili a quelli determinati da *Cryphonectria parasitica* (Magro et al., 2010) (Fig. 12). Durante studi condotti nei primi anni duemila sono stati individuati castagni che mostravano lesioni corticali con la presenza di periteci del fungo responsabile del marciume gessoso (Shuttleworth et al., 2012). Inizialmente, le lesioni causate da *G. castaneae*, secondo gli

studi effettuati non risultavano dannose e non vennero attribuite all'agente del marciume gessoso. Solo successivamente, l'agente patogeno è stato identificato in alcuni popolamenti di *Castanea sativa*, presenti nella valle del Kashmir in India (Dar et al., 2015) dimostrando che il fungo responsabile del marciume gessoso aveva causato lesioni del fusto provocando un imbrunimento che si estende attraverso il floema.

L'infezione provocata da *G. castaneae* causa talvolta anche ingiallimento e necrosi fogliare, in particolare quando il castagno viene attaccato da *Dryocosmus kuriphilus* (Magro et al., 2010). Secondo alcuni studi, il cinipide potrebbe agire da vettore nella diffusione del patogeno, dal momento che dalle galle è stato possibile isolare il patogeno (Lione et al., 2016).

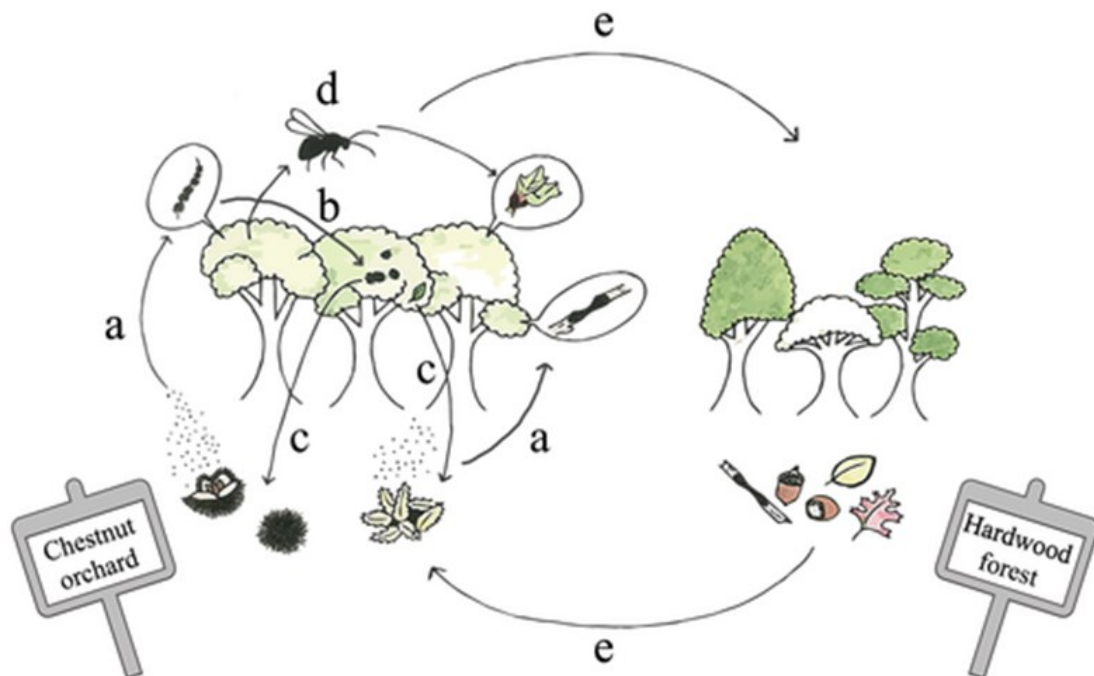


**Figura 12** - (a) Picnidi di *Gnomoniopsis* presenti su astoni di castagno americano; (b) Lesione cancerosa causata da *Gnomoniopsis* su piantina di castagno americano; (c) Endosperma di castagne di *C. mollissima* deteriorato da marciume gessoso; (d) Colonia di *Gnomoniopsis* isolata su piastra Petri di PDA (Dobry e Campbell 2023).

Il ciclo biologico di *G. castaneae* parte dai ricci e foglie cadute al suolo e lasciate dopo la raccolta al suolo.

Essendo un fungo saprofita in grado di colonizzare tessuti morti, riesce a conservarsi all'interno dei residui vegetali della stagione precedente sviluppando i periteci, che a maturità e con le condizioni favorevoli, liberano le ascospore, che determineranno le infezioni primarie (Fig. 13a).

Il trasporto dell'inoculo viene facilitato dalla presenza di acqua, vento e insetti che raggiungono i fiori maschili e femminili, determinando l'infezione dell'endosperma (13 a, c, d).



**Figura 13** - Ciclo biologico di *G. castaneae* (Dobry e Campbell 2023).

Durante il periodo di fioritura, i propaguli del fungo penetrano a livello dei tessuti floreali del castagno e il patogeno rimane latente all'interno dell'endosperma dei frutti in corso di maturazione.

Il parassita è in grado di dare origine ad infezioni secondarie, attraverso la produzione di conidi che si trovano in fruttificazioni anamorfe nelle galle disseccate della vespa cinese. Questo è reso possibile grazie alla presenza di zuccheri all'interno delle galle, utili allo sviluppo delle fruttificazioni fungine. Il rilascio dei conidi avviene durante varie fasi dell'anno, attaccando successivamente gli organi vegetali della pianta.

L'inoculo permane vitale anche nei ricci su cui si differenziano corpi fruttiferi che permetteranno lo svernamento del fungo (13 c). Al termine della stagione vegetativa, durante le fasi di raccolta che in genere coincidono con un periodo particolarmente umido e la persistenza del prodotto a contatto con il suolo, termina la fase di latenza e cominciano a essere visibili i primi sintomi che si manifestano in modo più chiaro durante le fasi di conservazione.

Le variabili climatiche sono tra i fattori abiotici che incidono maggiormente nella diffusione del patogeno. L'aumento delle temperature medie e del tasso di umidità favoriscono infezioni più gravi e le piogge aiutano nella dispersione delle ascospore nel periodo della fioritura.

Secondo alcune ricerche si evidenzia una correlazione tra le precipitazioni e l'incidenza del marciume gessoso delle castagne (Shuttleworth et al., 2013). All'aumentare dell'umidità e della quantità di pioggia caduta corrisponde una maggiore diffusione di *G. castaneae*. Altre ricerche, invece, evidenziano che siccità e temperatura alte sono più determinanti nella diffusione di *G. castaneae* (Maresi et al., 2013). Altri ricercatori sostengono che la temperatura e il vento sono i fattori principali che guidano l'incidenza, mentre precipitazioni/umidità non sono strettamente relazionate al marciume gessoso (Lione et al., 2021).



## 2. SCOPO DELLA TESI

Attualmente *Gnomoniopsis castaneae*, agente del marciume gessoso delle castagne, è considerato tra le principali minacce per la castanicoltura a livello mondiale, essendo oramai diffuso in entrambi gli emisferi in gran parte dell'areale geografico di distribuzione del castagno. Il fungo è un endofita molto versatile la cui adattabilità lo rende un nemico difficile da monitorare e contrastare.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare la presenza e incidenza di *G. castaneae* in differenti varietà di castagne e marroni provenienti da sette diverse regioni d'Italia in cui il castagno da frutto è coltivato. Per ogni varietà sono stati analizzati dei frutti ed è stata valutata la presenza di alterazioni e la percentuale di marciume dell'endosperma da cui poi sono stati effettuati degli isolamenti. Gli isolati di *G. castaneae* sono stati identificati da un punto di vista morfologico con osservazione al microscopio e successivamente l'identificazione è stata validata anche mediante analisi molecolare.

Le fasi della sperimentazione hanno previsto:

- I) Analisi visiva delle varietà di castagne e marroni;
- II) Analisi dell'incidenza e gravità di infezioni del frutto;
- III) Isolamento in vitro effettuato dai frutti infetti;
- IV) Trasferimento in cultura pura dei principali funghi isolati;
- V) Estrazione del DNA e amplificazione genica mediante PCR e sequenziamento nucleotidico per l'identificazione delle specie fungine coinvolte.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Osservazione dei sintomi su campioni di castagne

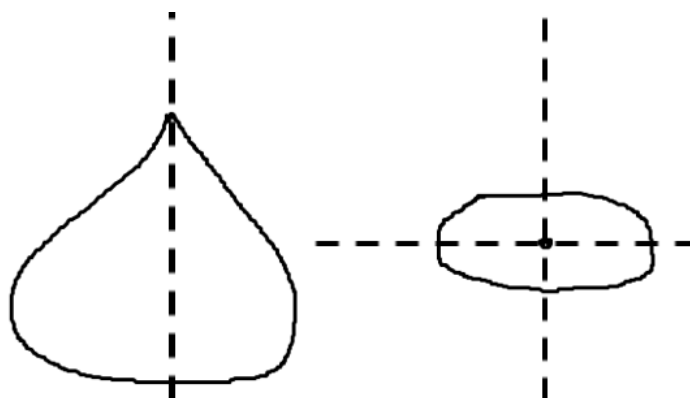
Nell'ambito della Mostra Pomologica del Castagno e del Marrone svoltasi ad Ascoli Piceno l'11 novembre 2023, presso il D3A sono pervenuti 117 campioni di Castagne e Marroni coltivati e conservati presso i Campi Catalogo di Castagno del Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte di Chiusa Pesio (CN), Centro Studi e Documentazione per il Castagno Marradi, Centro Studi e Documentazione sul Castagno di Marradi (FI), CREA OFA Caserta, Consorzio Agro Silvo Castanicolo dell'Appennino Modenese, AGRIS Sardegna e Azienda Agraria Sperimentale "Santa Paolina" presso IBE CNR sede Follonica (Fig. 14).



*Figura 14 - Provenienza delle 117 varietà di castagne dalle diverse regioni italiane.*

Dopo la mostra pomologica, 300-400 g di ciascun campione sono stati conservati in sacchi retati, alla temperatura di 4°C in cella frigo per circa 40 giorni. Dopo tale periodo i campioni sono stati lasciati per 15 giorni a temperatura ambiente. Successivamente si è proceduto alla valutazione della diffusione e gravità del marciume gessoso delle castagne.

Per ciascuno delle 117 varietà sono stati analizzati 20 frutti sia registrando le caratteristiche morfologiche dell'episperma (colore e consistenza), che l'eventuale alterazione dell'endosperma dopo aver sezionato longitudinalmente il singolo frutto lungo l'asse minore (Fig. 15)



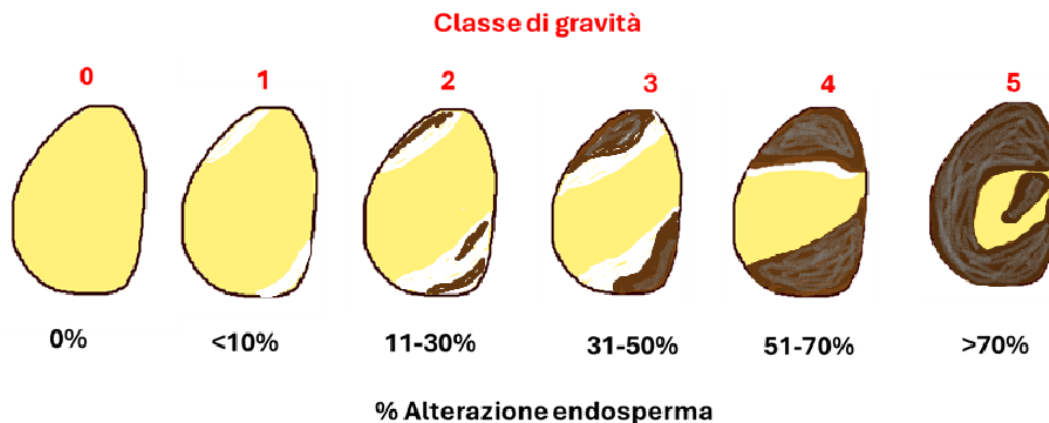
*Figura 15 - Rappresentazione grafica della sezione longitudinale effettuata sui campioni analizzati.*

Una volta effettuato il taglio con un coltello affilato, è stato possibile verificare la diffusione del marciume calcolando il numero di castagne sul totale che presentavano alterazioni limitate o estese dell'endosperma.

Per ogni frutto è stata effettuata una valutazione della gravità della malattia seguendo una scala empirica e attribuendo un valore da 0 a 5 in base alla classe di gravità del marciume (Fig. 16). Ai frutti asintomatici è stata attribuita la classe 0, per i frutti con il 10% di marciume la classe 1, classe 2 per i frutti con marciume tra 11-30%, classe 3 per i frutti sintomatici fino al 50%, classe 4 per i frutti con percentuale di marciume tra 51-70% e la classe 5 per frutti con più del 70% di endosperma sintomatico. La gravità è stata calcolata con la seguente formula

$$G = (c \times f) / n$$

dove **G**= gravità; **c**= classe empirica da 0 a 5; **f**= frequenza; **n**= numero castagne sintomatiche.



**Figura 16** - Rappresentazione grafica della scala empirica di gravità utilizzata per valutare l'alterazione dell'endosperma. 0= sana; 1= fino al 10%; 2= 11-30%; 3= 31-50%; 4= 51-70%; 5= maggiore del 70%.

Oltre alle alterazioni dell'endosperma determinate da *G. castaneae*, è stato possibile notare anche marciumi determinati da muffa verde, marciume nero e marciume rosa. Inoltre, su alcuni campioni è stata registrata anche l'infestazione di insetti allo stadio larvale che vivevano e si nutrivano dell'endosperma.

Effettuata l'analisi visiva dei sintomi e l'assegnazione alle classi di gravità dei campioni selezionati, sono state scattate delle foto per ogni varietà cercando di mettere a confronto le castagne sane con quelle che presentavano sintomi evidenti.

### **3.2 Isolamento di *G. castaneae* in piastre Petri e identificazione morfologica**

Una volta effettuata l'analisi visiva dei sintomi è stato effettuato l'isolamento del patogeno in piastra Petri.

Per ogni varietà, sono state selezionate quelle che presentavano una gravità pari a 3 e quindi una percentuale di endosperma alterato tra il 31 e il 50%. L'isolamento su substrato agarizzato è stato effettuato in condizioni di asepsi sotto cappa a flusso laminare. I frutti decontaminati con etanolo al 90% per 2 min, passati in ipoclorito di sodio al 2% per 2 min, sono stati passati in acqua sterile per 2 min e lasciati asciugare su carta assorbente sterile sotto cappa. Dai frutti tagliati longitudinalmente con lama sterile, sono stati asportati gli strati di tessuto superficiale con lama calda, successivamente sono stati

prelevati tessuti di endosperma tra la zona sintomatica e quella che all'aspetto visivo sembrava ancora integra ma tendente al bianco. Per ogni frutto sono stati prelevati 5 porzioni che sono state trasferite in piastre Petri (diametro 90 mm) contenenti 15 ml di PDA (Potato Daxtrose Agar) addizionato di una soluzione antibiotica (150 mg/l streptomina e 150 mg/l ampicillina).

Successivamente, ogni piastra è stata contrassegnata con il nome della varietà, la data in cui è stato effettuato l'isolamento e sigillata con parafilm, in modo tale da preservare il campione da eventuali fonti di contaminazione. Gli isolamenti sono stati conservati a temperatura ambiente. Dopo circa una settimana di incubazione le colonie fungine sono state trasferite su nuove piastre con PDA e in seguito sono state eseguite più subculture per ottenere colonie pure.

A distanza di un mese dal trasferimento sulle nuove piastre Petri, è stato possibile effettuare l'identificazione delle colonie pure. Le caratteristiche morfologiche delle colonie fungine come la forma, la colorazione del micelio e dei corpi fruttiferi sono state osservate e analizzate al microscopio ottico.

### **3.3 Analisi molecolare: estrazione DNA, amplificazione e sequenziamento**

Le colonie fungine pure, precedentemente identificate sulla base dei caratteri morfologici, sono state sottoposte all'estrazione del DNA genomico. L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il protocollo CTAB (Doyle et al., 1990). Il micelio, raccolto direttamente da piastre Petri con bisturi sterile, è stato messo all'interno di mortai sterili e, in presenza di 3 ml di tampone di estrazione preriscaldato (3% CTAB, 200mM Tris-HCL pH 8,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% PVP-40) con aggiunta di 0,6% di metabisolfito di sodio, è stato omogenizzato con pestello. L'omogenato è stato aliquotato in due tubi Eppendorf da 2 ml. La sospensione è stata incubata per 20 min a 65°C in bagnomaria, andando a capovolgere i tubi ogni 4 min. Successivamente, i tubi sono stati lasciati a temperatura ambiente per 2 min e sottoposti a centrifugazione per 5 min a 12000 rpm. Sono poi stati recuperati 900 µl di sospensione a cui è stato aggiunto un ugual volume di cloroformio. Dopo aver miscelato tramite vortex la sospensione è stata ripetuta la centrifuga per 5 min a 13000 rpm. E' seguito un secondo lavaggio con cloroformio. Al surnatante (circa 600 µl) è stato aggiunto un ugual volume di isopropanolo e dopo aver delicatamente capovolto gli eppendorf, questi sono stati lasciati a 4 °C per 10 min. Infine,

è stata effettuata una centrifugazione di 20 min a 13000 rpm, eliminato il sovrantante, il pellet è stato lavato con etanolo al 70 %. Il pellet, ottenuto in seguito a centrifugazione per 5 min a 13000 rpm, è stato asciugato e risospeso in 70 µl di acqua MilliQ sterile. 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 µl contenenti: 10 mM di Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 0,1% Triton 100X, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 nM di ciascun nucleotide (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Promega Corporation), 0,5 µM 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, e Bt2a (5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3') e Bt2b (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) (Glass et al., 1995), disegnati nel gene della *β-tubulina*. L'amplificazione è stata realizzata in un termociclatore DNA Icycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizzando un programma di amplificazione che prevedeva un ciclo iniziale di denaturazione di 5 minuti a 94° C; successivamente prevedeva 35 cicli di 30 sec a 94° C, 55° C e 72° C; e una fase di estensione finale di 5 min a 72° C. Un'aliquota di 10 µl del prodotto di amplificazione è stata miscelata a 2 µl di colorante, caricata su gel di agarosio al 1% e fatto correre in tampone TAE 1 × (45mM di Tris-borato; 1 mM EDTA, pH 8) a 110 V per 15 min in camera elettroforetica per gel orizzontale sommerso (Bio-Rad). Per la stima delle dimensioni dei prodotti di amplificazione è stato utilizzato come standard il 100 pb DNA Ladder (Sigma). Il gel di agarosio, precolorato con GelRed 10,000× (Biotium) è stato osservato su transilluminatore integrato nel sistema di acquisizione Gel Doc XR (Biorad), che ha permesso l'acquisizione e l'elaborazione dell'immagine mediante il software QuantityOne® (Bio-Rad).

L'identificazione molecolare è stata condotta su isolati che erano stati identificati come *Gnomoniopsis* almeno su base morfologica. In particolare, gli ampliconi ottenuti da 29 campioni analizzati con le coppie di primer ITS1/ITS4 e Bt2a/Bt2b sono stati inviati ad AZETA Genewiz (Germany) per la purificazione e il sequenziamento nucleotidico. Le sequenze, in formato FASTA, sono state sottoposte ad analisi blastN sulla piattaforma NCBI, che ha permesso di verificare la percentuale di identità nucleotidica con sequenze già depositate in Genbank.

## 4.RISULTATI E DISCUSSIONE

Dall'analisi visiva di 2340 frutti (20 frutti per ciascuna delle 117 varietà), è stato possibile verificare un deterioramento dell'endosperma più o meno esteso su 1755 frutti (75%), la restante parte dei campioni è risultata asintomatica. Tale dato è particolarmente interessante e riguarda il deterioramento interno del frutto, che nella maggior parte (94%) dei casi non corrispondeva ad alcuna alterazione dell'episperma.

Bisogna tener conto che questi campioni erano stati inviati per una mostra pomologica per cui tendenzialmente selezionati per quanto riguarda l'integrità del frutto.

È probabile che durante le fasi di conservazione, 40 giorni a 4°C e 15 giorni a temperatura ambiente, i patogeni in forma latente abbiano avuto la possibilità di continuare il processo infettivo già iniziato in campo e al momento della raccolta.

I principali problemi post-raccolta associati alla castagna sono rappresentati dai marciumi, che possono essere causati da diversi agenti fungini come *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Phomopsis castanea*, *Acrospeira mirabilis*, *Ciboria batschiana* (sin. *Sclerotinia pseudotuberosa*), *Phoma castanea* e *Phomopsis endogena* (Rodrigues et al., 2013; Wells et al., 1975; Lione et al., 2019; Washingt et al., 1997; Vettraiño et al., 2005; Jermini et al., 2006; Siebe et al., 2007; Donis-González et al., 2016). Negli ultimi dieci anni, tuttavia, si è verificato un forte aumento dell'incidenza del marciume bruno tanto da considerarla una problematica emergente (Rodrigues et al., 2022).

Dalle osservazioni dei frutti sezionati è stato possibile verificare che le principali alterazioni dell'endosperma in ordine di importanza sono il marciume gessoso, la muffa verde, il marciume rosa e il marciume nero, ma non sono mancati anche danni determinati da insetti (Tab. 1).

Dall'analisi dei frutti appartenenti alle 117 varietà è stato possibile valutare la diffusione media delle diverse alterazioni del frutto, espressa come percentuale di frutti interessati dal deterioramento.

**Tabella 1** - Quadro sintomatologico dei frutti analizzati che presentavano alterazioni.

<b>Alterazione del frutto</b>	<b>Diffusione (%)</b>
Marciume bruno	59
Muffa verde	35
Marciume rosa	4
Marciume nero	7
Insetti	32

Su circa 1755 frutti che presentavano alterazioni, il 59% erano riconducibili ad alterazioni ascrivibili al marciume gessoso delle castagne (Fig. 17).



**Figura 17** - A sinistra una castagna asintomatica, mentre a destra un campione che mostra marciume gessoso che interessa oltre il 70% dell'episperma.

Sul 24% dei tessuti interni dei campioni, è stata riscontrata la presenza di muffa verde, mentre occasionalmente sono state riscontrate alterazioni ascrivibili al marciume rosa e nero della castagna. Generalmente, le diverse tipologie di marciumi erano presenti singolarmente e solo occasionalmente è stato possibile verificare la co-presenza di marciume gessoso e muffa verde (17%) (Fig. 18).





**Figura 18** -. A sinistra episperma con sintomi di marciume nero. A destra campione con evidenti sporificazioni di *Penicillium* e marciume gessoso.

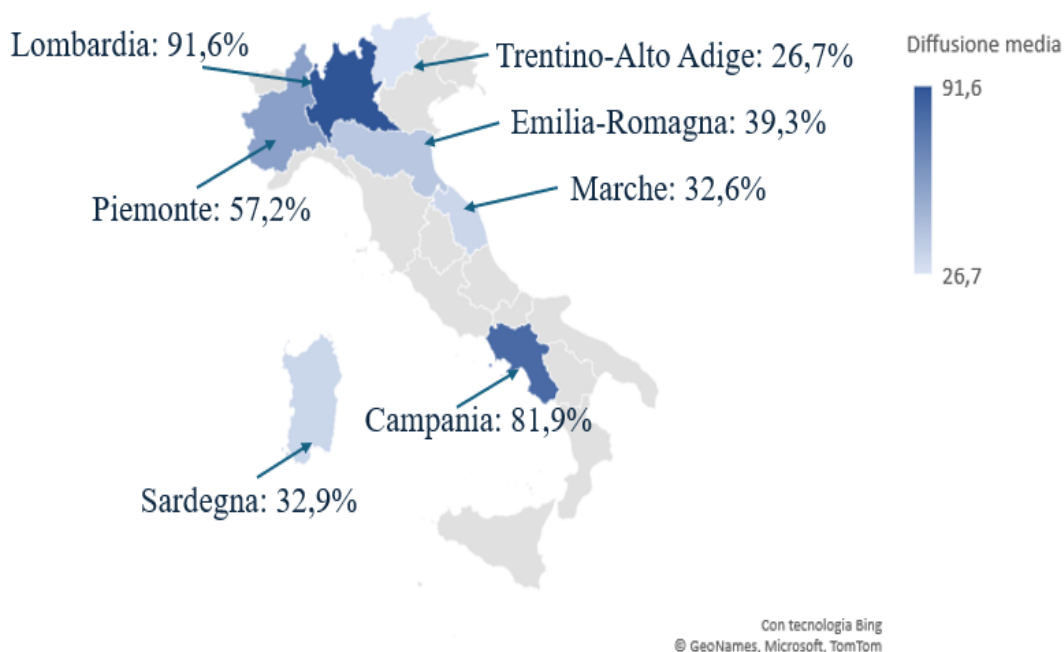
Più frequente (19%) invece è stata la presenza di marciume gessoso e alterazioni legate ad insetti che svolgono il loro stadio larvale all'interno del frutto e poi da adulti lasciano la castagna attraverso un foro di sfarfallamento (Fig. 19). I principali insetti riscontrati in associazione con il marciume bruno sono *Cydia flagiglandana*, *Cydia splendana*, e *Curculio elephas*.



**Figura 19** -. A sinistra episperma con evidente galleria determinata da stadio larvale di insetti e deterioramento del tessuto ascrivibile al marciume gessoso.

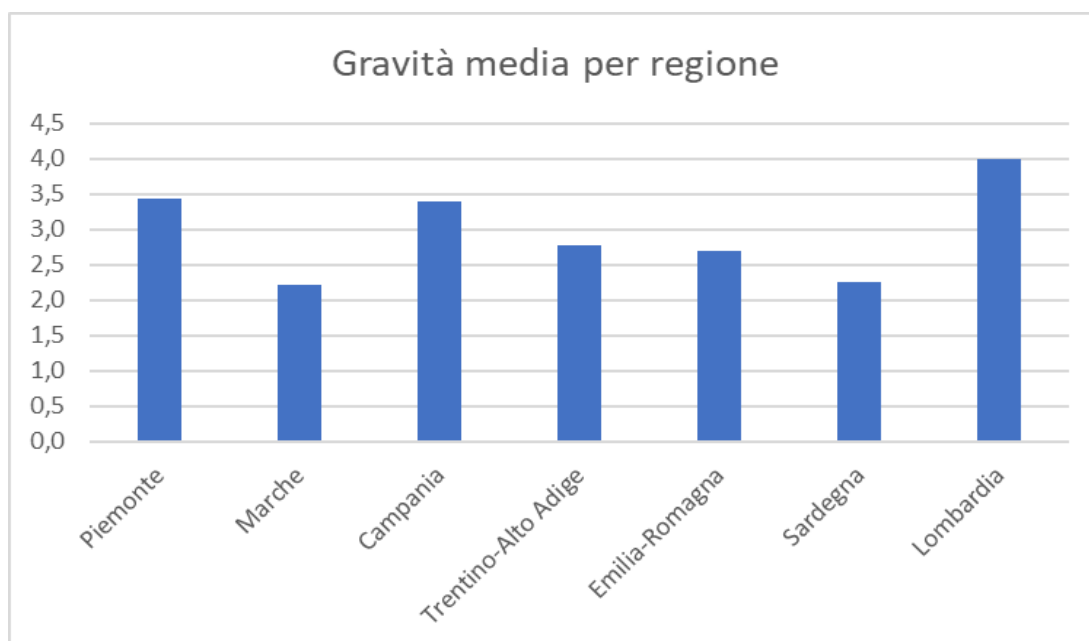
La tesi ha fatto un focus sulle alterazioni del frutto ascrivibili al marciume gessoso delle castagne per cui oltre alla diffusione media che è stata pari al 59%, è stata anche calcolata la gravità media espressa come porzione di frutto interessato con valori variabili tra 0 e 5. In particolare, in media è stata riscontrata una gravità della malattia pari a 3,2. Tale indice ha permesso di valutare che la maggior parte delle castagne analizzate rientravano in classe 3 con una percentuale di frutto compromesso dal marciume bruno tra il 31 e il 50%.

Tali parametri sono stati calcolati per le diverse varietà e per le diverse regioni di provenienza (Fig. 20). I campioni su cui sono stati riscontrati danni da marciume gessoso più ingenti sono quelli provenienti dalla Lombardia, con un valore medio di diffusione del 91,6% e una gravità media di 4, seguiti da quelli della regione Campania dove la diffusione media riscontrata è stata del 81,9% e la gravità 3,4. Anche i campioni provenienti dal Piemonte hanno mostrato un indice di diffusione medio pari al 57,2% e una gravità media pari a 3,4.



**Figura 20** - Rappresentazione della diffusione media del marciume gessoso riscontrata sui campioni di castagne provenienti da diverse regioni

Valori di diffusione di malattia sotto la soglia del 50% sono stati riscontrati per i campioni provenienti da Trentino-Alto Adige (26,7%), Marche (32%), Emilia-Romagna (39,3%) e Sardegna (32%). Anche la gravità della malattia riscontrata sui campioni ha raggiunto valori più bassi che oscillano tra il 2,2 in Sardegna e il 2,8 in Trentino-Alto Adige (Fig. 21).

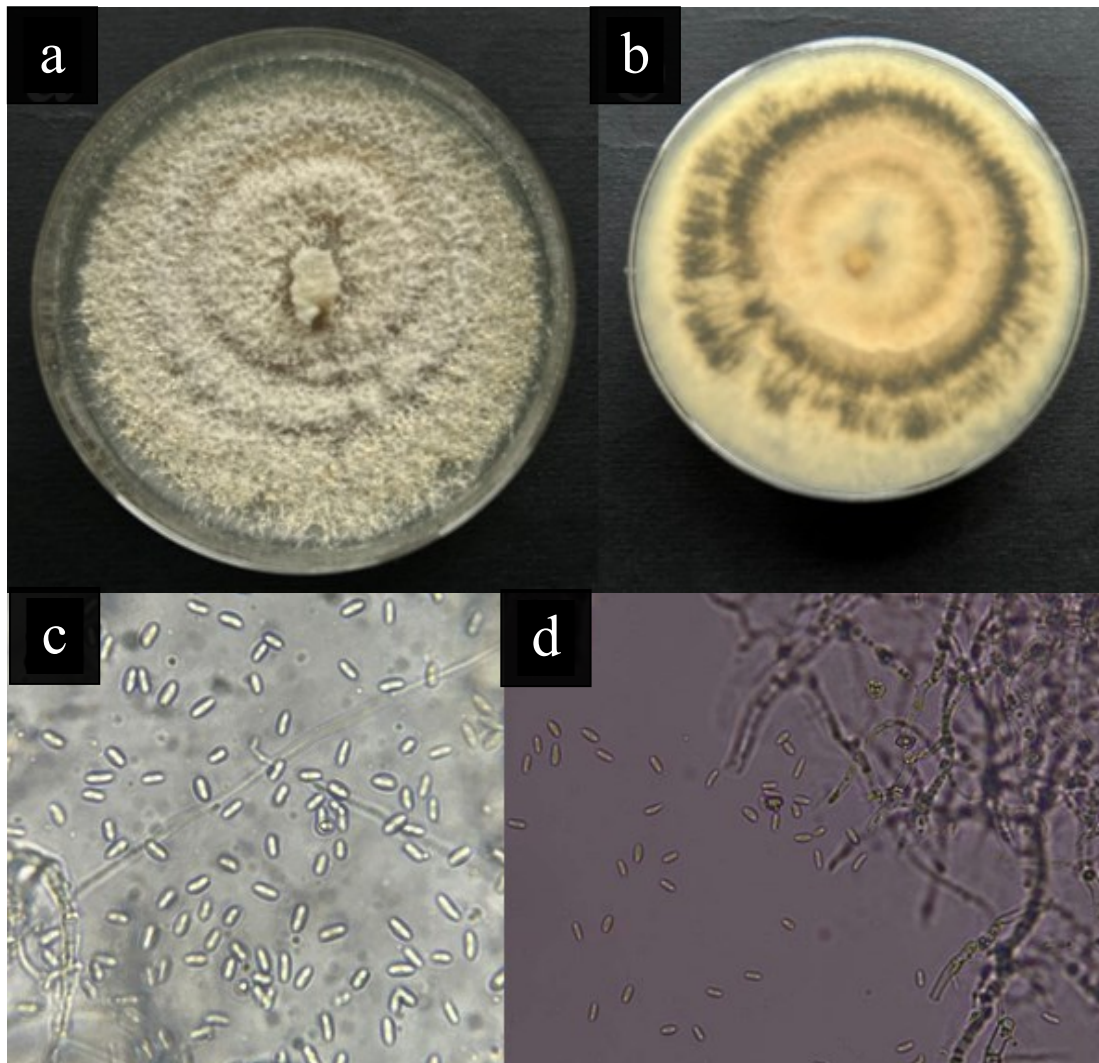


**Figura 21** - Rappresentazione della gravità media del marciume gessoso riscontrata sui campioni di castagne provenienti da diverse regioni

Il marciume bruno, determinato da *G. castaneae*, è oggi riconosciuto come una delle minacce più gravi per le produzioni di castagno, determinando gravi perdite economiche soprattutto durante le fasi di conservazione. Nella review scritta da Lema et al. (2023) vengono riassunti i dati di incidenza del marciume bruno. Nello specifico in Europa, il più alto tasso d'infezione da marciume della castagna è stato segnalato in Svizzera e Italia (rispettivamente dal 54 al 91% e dal 20 al 94%), in Portogallo sono stati riscontrati valori inferiori al 10%. Al di fuori dell'Europa, è stata segnalata un'elevata incidenza in Australia (circa il 72%), seguita da India (33–58%) e Cile (5%).

Dagli isolamenti, sono state ottenute un totale di 53 colonie di *G. castaneae* (Fig. 22 a, b). Ad un mese dal trasferimento su nuove piastre Petri è stato possibile osservare al microscopio le caratteristiche morfologiche principali.

Con l'aiuto di una spatolina prontamente sterilizzata sono stati prelevati tre frammenti di micelio che sono stati poi posizionati su un singolo vetrino portaoggetti. Una volta aggiunta una goccia di acqua sterile e ricoperto con il vetrino copri-oggetti ogni frammento, è stato possibile osservare al microscopio ottico le caratteristiche del fungo. In particolare, sono state analizzate le caratteristiche morfologiche dei conidi e delle ife fungine (Fig. 22 c, d), utili per l'identificazione di *Gnomoniopsis castaneae*. I conidi sono risultati ialini, asettati e tendenzialmente ovali/elissoidi, con una forma allungata e appuntita agli apici.

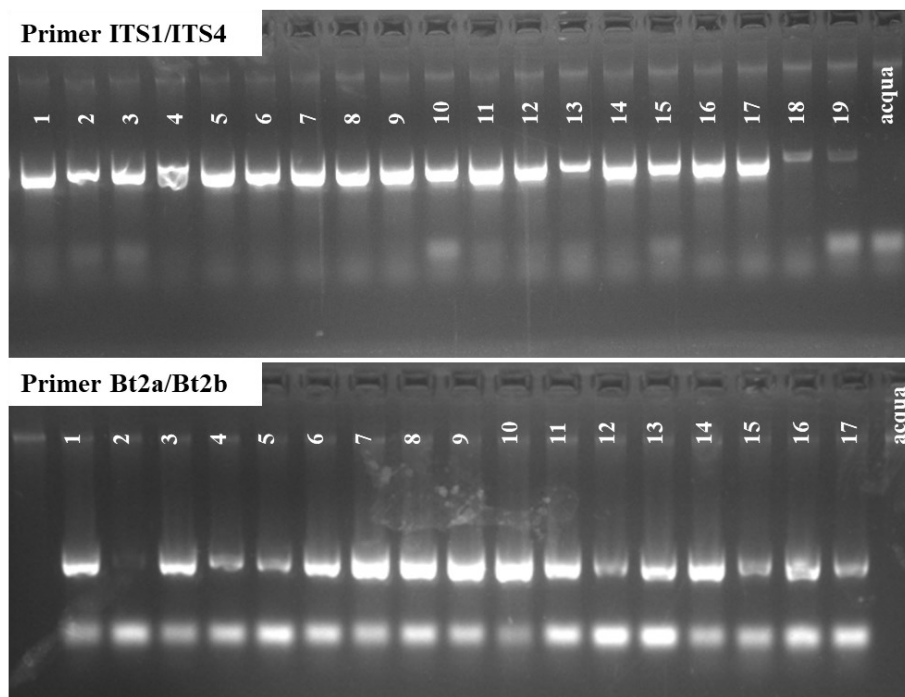


**Figura 22** - Caratteristiche morfologiche di una colonia pura di *G. castaneae* isolata su PDA fronte (a) e retro (b); conidi (c) e micelio osservati al microscopio ottico (d).

I 53 isolati di *G. castaneae*, identificati sulla base delle caratteristiche morfologiche, sono stati sottoposti ad analisi molecolare. L'estrazione del DNA ha consentito di ottenere nella maggior parte dei casi una quantità di DNA tra 75 e 172 ng/ $\mu$ l e una qualità espressa come rapporto tra 260 nm/280nm non inferiore a 1,8. Anche quei pochi campioni che presentavano valori sotto questa soglia sono stati utilizzati durante la reazione a catena della polimerasi utilizzando i primer ITS1/ITS4 e Bt2a/Bt2b.

Tutti i campioni sono stati amplificati positivamente con la coppia disegnata nella regione ITS, mostrando una banda specifica delle dimensioni di circa 600 pb, ad eccezione di un campione.

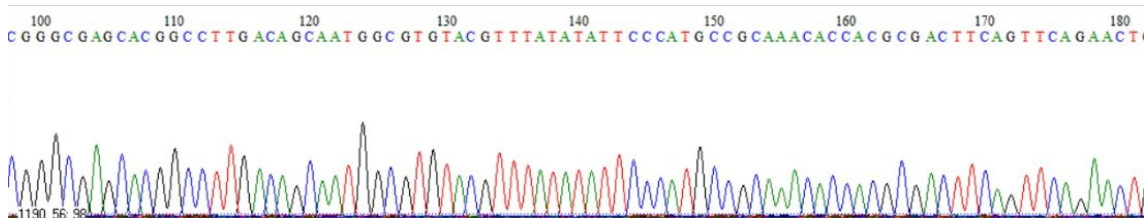
L'amplificazione con i primer disegnati sulla regione della beta tubulina è avvenuta positivamente sulla maggior parte dei campioni analizzati. In questo caso è stata ottenuta una banda specifica di circa 300 pb (Fig. 23).



**Figura 23** – Gel di agarosio al 1% mostrante gli ampliconi specifici ottenuti con i primer ITS1/ITS4 e Bt2a/2b.

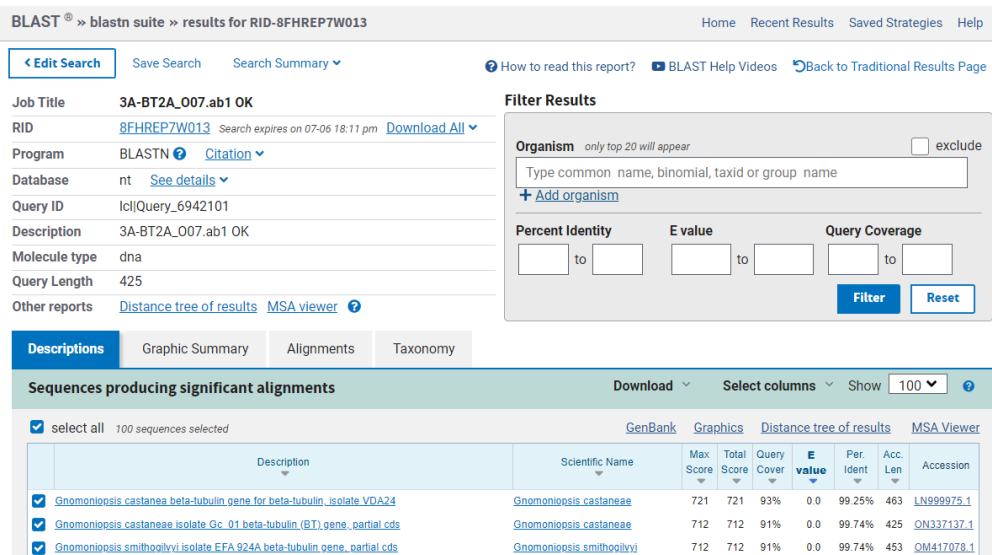
Infine, i campioni positivamente amplificati con i primer ITS1/ITS4 e Bt2a/Bt2b, sono stati inviati per il sequenziamento nucleotidico.

AZETA Genewiz ha rilasciato i cromatogrammi delle singole sequenze (Fig. 24), che dopo essere stati convertiti in file fasta sono stati utilizzati durante l'analisi BlastN.



**Figura 24** - Esempio di cromatogramma di una sequenza nucleotidica di *G. castaneae*.

Dal confronto delle sequenze ottenute nel presente lavoro con quelle depositate nel database NCBI è stato possibile verificare che tutte avevano una elevata identità di sequenza pari al 100% con *G. castaneae* nella regione ITS (Fig. 25).



**Fig. 25** - Risultati dell'analisi BlastN effettuata interrogando il database NCBI per la regione ITS.

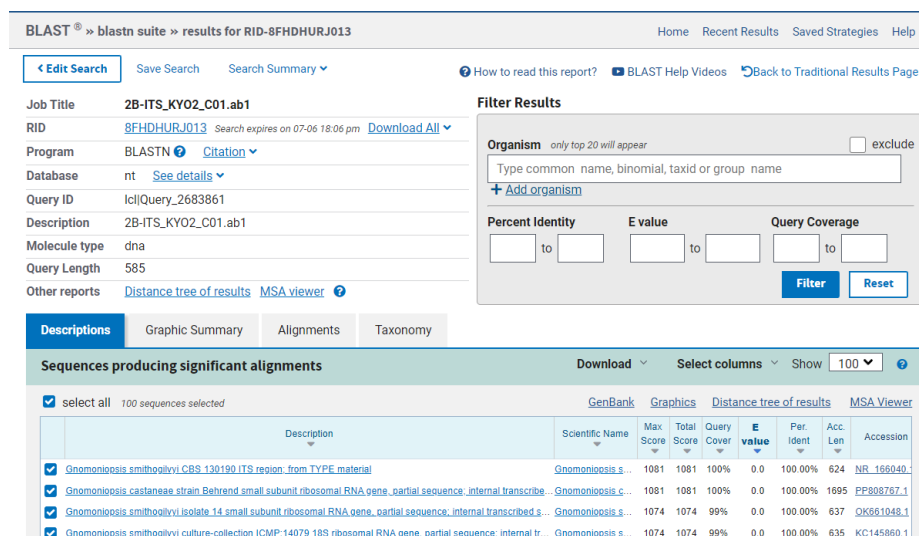
Nel recente lavoro di Seddaiu et al. (2023) sono state individuate delle mutazioni puntiformi conservate in questa regione che hanno permesso di definire due aplotipi (A e B). Nello specifico, il 63,5% degli isolati italiani apparteneva all'aplotipo A e il 36,5% all'aplotipo B.



L'analisi della distribuzione geografica degli isolati italiani ha rivelato che aplotipi e regioni non erano casuali, ma l'aplotipo A era dominante nell'Italia centrale e l'aplotipo B nell'Italia settentrionale. Gli isolati di *Gnomoniopsis castaneae* di entrambi gli aplotipi A e B, determinano sintomi di marciume bruno ma l'aplotipo A si è dimostrato il più virulento.

Tale regione è particolarmente utile durante le fasi di identificazione dei microrganismi, in quanto possiede un'elevata conservazione delle sequenze appartenenti allo stesso genere e alla stessa specie. Non sempre è possibile arrivare a livello di specie per tutti i microrganismi utilizzando solo la regione ITS, per cui l'utilizzo di un'ulteriore regione genica può essere molto utile per meglio definire l'identificazione molecolare a livello di specie.

La stessa analisi è stata effettuata anche utilizzando sequenze della regione della Beta-tubulina ed è stato possibile registrare valori particolarmente alti, ma inferiori rispetto alla regione ITS (Fig. 26). Tale regione è meno conservata ma è particolarmente informativa perché è possibile distinguere *G. castaneae* in diversi morfotipi.



**Fig. 26 - Risultati dell'analisi BlastN effettuata interrogando il database NCBI per la regione genica della Beta-tubulina.**

## 5. CONCLUSIONI

Il marciume gessoso delle castagne al momento risulta essere una emergenza per la castanicoltura da frutto. *Gnomoniopsis castaneae* può agire da endofita ma anche da agente patogeno determinando il marciume dei frutti ma anche necrosi corticali, delle foglie e anche delle galle determinate dal cinipide galligeno. Anche nel presente studio è stato possibile mettere in evidenza come sia alto l'impatto che tale fungo può avere sull'integrità delle produzioni. Anche se con diversa incidenza la malattia era presente con tassi molto elevati in tutti i campioni analizzati provenienti dalle diverse regioni, pur essendo campioni selezionati da esporre in una mostra pomologica. Questo studio insieme a quello pubblicato da Seddaiu et al. (2023) descrive in maniera esaustiva la diffusione del marciume bruno delle castagne in diverse regioni italiane (Trentino Alto-Adige, Veneto, Sardegna, Emilia -Romagna, Toscana, Piemonte, Lombardia, Campania, Marche). Inoltre, conferma la stretta relazione del marciume bruno con la presenza di *Gnomoniopsis castaneae*, nonché la presenza di due aplotipi sulla base della regione della beta tubulina anche nelle accessioni che sono state analizzate.

Tali informazioni sono di fondamentale importanza e costituiscono il punto di partenza per poter avviare progetti di ricerca che possano chiarire alcuni aspetti epidemiologici di *G. castaneae*, il ruolo dei fattori abiotici nella transizione del fungo da endofita a patogeno nonché la presenza in natura di antagonisti microbici che possano contrastare la diffusione e mitigare i danni inferti da questo patogeno. Recentemente, risultati incoraggianti sono stati pubblicati sull'utilizzo di *Trichoderma* attraverso applicazioni endoterapiche prima della fioritura (Benigno et al., 2024).



## 6. BIBLIOGRAFIA

- Addario, E. & Turchetti, T. (2011) Funghi parassiti su *Dryocosmus kuriphilus* nelle galle necrotiche di *Castanea sativa*. *Bollettino di Insettologia*, 64, 269–273.
- Barr, M.E. (1978) The Diaporthales in North America with emphasis on *Gnomonia* and its segregates. *Mycol. Mem.* 7, 1–232.
- Benigno, A., Aglietti, C., Cacciola, S. O., & Moricca, S. (2024). Trunk Injection Delivery of Biocontrol Strains of *Trichoderma* spp. Effectively Suppresses Nut Rot by *Gnomoniopsis castaneae* in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Biology*, 13(3), 143.
- Bernetti G. 1998. Prospettive di evoluzione e di uso dei boschi di montagna. Selvicoltura dell'Appennino centrale. Atti della giornata pre paratoria al II Congresso Nazionale di Selvicoltura, Firenze: 33-40
- Biraghi A, 1953. Notizie sul mal dell'inchiostro del castagno. *Monti e Boschi*, IV:106-107.
- Bissanti, G., 2019. Un mondo ecosostenibile.
- Bogenschütz, H., 1991. Eurasian species in forestry. In: *Tortricid pests, their biology, natural enemies and control*. World crop pests, 5 [ed. by Geest, L.P.S. van der, Evenhuis, H.H.]. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science. 673-709.
- Bonal, R., Muñoz, A., 2007. Multi-trophic effects of ungulate intraguild predation on acorn weevils. *Oecologia*, 152(3) 533-540.
- Bounous G., 2014. *Il Castagno*. Edagricole - Edizioni Agricole New Business Media srl. Milano.
- Bounous, 2002. *Il castagno*. Coltura, ambiente ed utilizzazioni in Italia e nel mondo.
- Bounous, G., 2006. Revival of chestnut culture in Mediterranean countries: factors to improve the quality of productions. *Advances in Horticultural Science*, 20(1) 7-15.
- Branzanti MB, Rocca E, Pisi A, 1999. Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza*, 9(2):103-109; 31 ref.
- Brussino, G., Bosio, G., Baudino, M., Giordano, R., Ramello, F. & Melika, G. (2002) Pericoloso insetto esotico per il castagno europeo. *L'Informatore Agrario*, 58, 59-61.
- Choi, G.H. and Nuss, D.L. (1992) Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science*, 257, 800–803.

- Conedera M., Krebs P., Tinner W., Pradella M., Torriani D. 2004a. The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Vegetation History and Archaeobotany*, 13, 161-179.
- Conedera M., Stanga P., Lischer C., Stockli V. 2000. Competition and dynamics in abandoned chestnut orchards in southern Switzerland. *Ecologia Mediterranea*, 26 (1-2): 101-112
- Corona P., Castellotti T. 2017. Castanicoltura, il rilancio passa per la filiera. *Terra e Vita*, 19: 52-55
- Damm, U.; Cannone, P. F.; Woudenberg, J. H. C.; Crous, P. W., 2012: Il complesso di specie *Colletotrichum acutatum*. *Stud. Mycol.* **73**, 37-113.
- Dar, M.A. & Rai, M. (2015) *Gnomoniopsis smithogilvyi*, un patogeno che causa il cancro su *Castanea sativa*: primo rapporto. *Micosfera*, 6, 327–336.
- Dennert, F.G., Brogгинi, G.A.L., Gessler, C. & Storari, M. (2015) La *Gnomoniopsis castanea* è il principale agente del marciume del castagno in Svizzera. *Phytopathologia Mediterranea*, 54, 199-211.
- Diller, J.D. (1965) Chestnut Blight. Forest Pest Leaflet 94. U.S. Department of Agriculture Forest Service, Washington, D.C. 7 p
- Dobry, E., & Campbell, M. (2023). *Gnomoniopsis castaneae*: An emerging plant pathogen and global threat to chestnut systems. *Plant Pathology*, 72(2), 218-231.
- Doyle J.J., Doyle . J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.
- Donis-González, I. R., Guyer, D. E., & Fulbright, D. W. (2016). Quantification and identification of microorganisms found on shell and kernel of fresh edible chestnuts in Michigan. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4514-4522.
- EPPO – Organizzazione Europea e Mediterranea per la Protezione delle Piante. (2022) *Gnomoniopsis smithogilvyi* (GNMPCA)[Distribuzione mondiale]. Banca dati EPPO Global.
- Fernández, M.M., Bezos, D. & Diez, J.J. (2018) Funghi associati a galle necrotiche di *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae) nel nord della Spagna. *Silva Fennica*, 52, 3.
- Fernandez-Conradi, P., Borowiec, N., Capdevielle, X., Castagneyrol, B., Maltoni, A., Robin, et al. (2017). L'identità del vicino di pianta e l'infezione da patogeno invasivo

- influenzano la resistenza associativa a una vespa biliare invasiva. *Invasioni biologiche*, 20, 1459–1473.
- Ferracini C, Pogolotti C, Lentini G, Saitta V, Busato E, Rama F, Alma A. Performance of Pheromone-Baited Traps to Monitor the Seasonal Abundance of Tortrix Moths in Chestnut Groves. *Insects*. 2020; 11(11):807. <https://doi.org/10.3390/insects11110807>
- Gellini e Grossoni, 1996. *Botanica forestale*.
- Glass N.L, Donaldson G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1323, 1330.
- Gonthier, P., Visentin, I., Valentino, D., Tamietti, G. & Cardinale, F. (2017) Il nome legittimo di un patogeno fungino delle piante e l'etica della pubblicazione nell'era della tracciabilità. *Etica della scienza e dell'ingegneria*, 23, 631–633.
- Guerin, L. , Froidefond, G. and Xu, X.M. (2001) Seasonal patterns of dispersal of ascospores of *Cryphonectria parasitica* (chestnut blight). *Plant Pathol.* 50, 717–724.
- Hancock, E.F., Bland, K.P., Razowski, J., 2015. *The moths and butterflies of Great Britain and Ireland*, 5(2) [ed. by Bland, K.P.]. Leiden, Netherlands: Brill. Xiv + 377 pp.
- Heiniger, U. and Rigling, D. (1994) Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 581–599.
- Heiniger, U. and Rigling, D. (2009) Application of the *Cryphonectria* Hypovirus (CHV-1) to control the chestnut blight, experience from Switzerland. *Acta Hort.* 815, 233–245.
- Hoegger, P.J. , Heiniger, U. , Holdenrieder, O. and Rigling, D. (2003) Differential transfer and dissemination of hypovirus and nuclear and mitochondrial genomes of a hypovirus-infected *Cryphonectria parasitica* strain after introduction into a natural population. *Appl. Environ. Microb.* 69, 3767–3771.
- Jermi, M., Conedera, M., Sieber, T. N., Sassella, A., Schärer, H., Jelmini, G., & Höhn, E. (2006). Influence of fruit treatments on perishability during cold storage of sweet chestnuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(6), 877-885.

- Jung T, Blaschke H, Neumann H, 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology*, 26(5):272.
- Jung T, Hansen EM, Winton L, Osswald W, Delatour C, 2002. Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycological Research*, 106(4):397-411; 37 ref.
- Kato, K. & Hijii, N. (1997) Effects of gall formation by *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hym., Cynipidae) on the growth of chestnut trees. *Journal of Applied Entomology*, 121, 9–15.
- Kepekci, I., Gokce, A., Gaugler, R., 2004. Virulence of three species of entomopathogenic nematodes to the chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematropica*, 34:199 -204.
- Kolp, M., Double, M.L., Fulbright, D.W., MacDonald, W.L. & Jarosz, A.M. (2020) Dinamiche spaziali e temporali della comunità fungina di cancri della peronospora del castagno sul castagno americano (*Castanea dentata*) in Michigan e Wisconsin. *Ecologia fungina*, 45, 100925.
- Krebs P., Conedera M., Pradella M., Torriani D., Felber M., Tinner W. 2004. Quaternary refugia of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): an extended palynological approach. *Vegetation History and Archaeobotany*, 13: 145-160.
- Krebs P., Tinner W., Conedera M. 2014. Del Castagno e della castanicoltura nelle contrade in subricche: tentativo di una sintesi eco-storica. *Archivio storico ticinese*, 155: 37 pp.
- Montemartini L., 1913, rivista di patologia vegetale il cancro corticale del Castagno 24-30.
- Lee, S.H. , Park, J.Y. , Kim, K.H. and Lee, J.K. (2005) Characteristics of hypovirulent strains of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* isolated in Korea. *Proceedings of the Third International Chestnut Congress. Acta Hort.* 693, 611–616.
- Lema, F., Baptista, P., Oliveira, C., & Ramalhosa, E. (2023). Brown Rot Caused by *Gnomoniopsis smithogilvyi* (syn. *Gnomoniopsis castanae*) at the Level of the Chestnut Tree (*Castanea sativa* Mill.). *Applied Sciences*, 13(6), 3969.

- Lione, G., Giordano, L., Ferracini, C., Alma, A. & Gonthier, P. (2016) Testare le interazioni ecologiche tra *Gnomoniopsis castaneae* e *Dryocosmus kuriphilus*. *Acta Oecologica*, 77, 10–17.
- Lione, G., Giordano, L., Sillo, F. & Gonthier, P. (2015) Testare e modellare gli effetti del clima sull'incidenza dell'agente emergente del marciume delle noci del castagno *Gnomoniopsis castanea*. *Patologia vegetale*, 64, 852–863.
- Lione, G., Danti, R., Fernandez-Conradi, P., Ferreira-Cardoso, J. V., Lefort, F., Marques, G., ... & Gonthier, P. (2019). The emerging pathogen of chestnut *Gnomoniopsis castaneae*: the challenge posed by a versatile fungus. *European Journal of Plant Pathology*, 153, 671-685.
- Lione, G., Giordano, L., Sillo, F., Brescia, F. & Gonthier, P. (2021) Modelli di deposizione temporale e spaziale dei propaguli del patogeno fungino emergente del castagno *Gnomoniopsis castaneae* nei frutteti dell'Italia nord-occidentale. *Patologia vegetale*, 70, 2016–2033.
- Magro, P., Speranza, S., Stacchiotti, M., Martignoni, D. & Paparatti, B. (2010) *Gnomoniopsis* associata alla necrosi delle foglie e delle galle di castagno indotta da *Dryocosmus kuriphilus*. *Patologia vegetale*, 59, 1171.
- Manetti M.C., Amorini E., Becagli C. (2004). Gestione selvicolturale e tipologie strutturali nei popolamenti di castagno del Pratomagno Casentinese. *Annali Istituto Sperimentale Selvicoltura*, vol. 31: 109-118.
- Mansilla, J.P., Salinero, M.C., 1993. *Pammene fasciana* L. (Lep., Tortricidae), an early tortricid of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). (*Pammene fasciana* L. (Lep., Tortricidae) tortricido precoz del castaño (*Castanea sativa* Mill.)) *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, 19(2) 151-157.
- Maresi, G., Longa, C.M.O. & Turchetti, T. (2013) Marciume bruno su noci di *Castanea sativa* Mill.: una malattia emergente e il suo agente causale. *iForest*, 6, 294–301.
- Maresi, G., Longa, C.M.O. & Turchetti, T. (2013) Marciume bruno su noci di *Castanea sativa* Mill.: una malattia emergente e il suo agente causale. *iForest*, 6, 294–301.
- Milgroom, M.G. and Cortesi, P. (2004) Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 311–338.

- Myburg, H., Gryzenhout, M., Wingfield, B. D., Milgroom, M. G., Kaneko, S., & Wingfield, M. J. (2004). DNA sequence data and morphology define *Cryphonectria* species in Europe, China, and Japan. *Canadian Journal of Botany*, 82(12), 1730-1743.
- Montemartini, L. (1917). *Rivista di patologia vegetale* (Vol. 8).
- Müller, O., 1957. Biological studies on *P. fasciana* and its importance for the canton of Ticino. (Biologische Studien über den frühen Kastanienwickler *Pammene juliana* (Stephens) (Lep. Tortricidae) und seine wirtschaftliche Bedeutung für den Kanton Tessin.) *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 41pt. 173-111.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., et al. (2000). Amplificazione isotermica del DNA mediata da loop. *Ricerca sugli acidi nucleici*, 28(12), e63.
- Paci M., Bianchi L., Maltoni A., Mariotti B. 2003. Tipologie forestali: rassegna su alcuni studi svolti in Toscana. Atti IV Congresso SISEF, Potenza: 111-120.
- Pasche, S., Calmin, G., Auderset, G., Crovadore, J., Pelleteret, P., Mauch-Mani, B. et al. (2016) *Gnomoniopsis smithogilyvi* provoca sintomi di cancro del castagno nei germogli di *Castanea sativa* in Svizzera. *Genetica e biologia fungina*, 87, 9–21.
- Pasche, S., Crovadore, J., Pelleteret, P., Jermimi, M., Mauch-Mani, B., Oszako, T., & Lefort, F. (2016b). Controllo biologico del patogeno latente *Gnomoniopsis smithogilyvi* in marze da innesto di castagno europeo utilizzando *Bacillus amyloliquefaciens* e *Trichoderma atroviride*. *Dendrobiologia*, 75, 113-122.
- Pecchi M., Marchi M., Giannetti F., Bernetti I., Bindi M., Moriondo M., Maselli F., Fibbi L., Corona P., Travaglini D., Chirici G. 2019. Re viewing climatic traits for the main forest tree species in Italy. *iForest*, 12: 173-190.
- Pividori M., Armando F., Conedera M. 2006. Dinamiche post-colturali in un ceduo misto di castagno ai suoi limiti ecologici. *Forest@* 3: 86-90.
- Pontecorvo G. 1932. Le condizioni dell'economia rurale nell'Appennino Toscano. II Pratomagno e Appennino Casentino. Reale Accademia dei Georgofili di Firenze, 184 pp
- Prospero, S. , Conedera, M. , Heiniger, U. and Rigling, D. (2006) Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. *Phytopathology*, 96, 1337–1344.

- Prospero, S. and Rigling, D. (2013) Chestnut blight In: Infectious Forest Diseases (Gonthier P. and Nicolotti G., eds), pp. 318–338. Wallingford: CAB International.
- Prospero, S. and Rigling, D. (2016) Using molecular markers to assess the establishment and spread of a mycovirus applied as a biological control agent against chestnut blight. *Biocontrol*, 61, 313–323.
- Raimondi, Massimo. 2019. «Elementi Botanici, Agronomici Ed Ecologici Del Castagno», 24.
- Roane, M.K. , Griffin, G.J. and Elkins, J.R. (1986) Chestnut blight, other Endothia diseases, and the genus Endothia APS Monograph Series 53. St. Paul, MN: APS Press.
- Robin, C. , Lanz, S. , Soutrenon, A. and Rigling, D. (2010) Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in south-eastern France is associated with fitness-related traits. *Biol. Control*, 53, 55–61.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., & Lima, N. (2013). Incidence and diversity of the fungal genera *Aspergillus* and *Penicillium* in Portuguese almonds and chestnuts. *European journal of plant pathology*, 137, 197-209.
- Rodrigues, P., Driss, J. O., Gomes-Laranjo, J., & Sampaio, A. (2022). Impact of cultivar, processing and storage on the Mycobiota of European Chestnut Fruits. *Agriculture*, 12(11), 1930.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Lombardi, N., Varlese, R., Aliberti, A., Carpenito, et al. (2016). Nuovi strumenti per migliorare la conservabilità dei frutti di castagno durante la conservazione. *Acta Horticulturae*, 1144, 309–316.
- Sabbatini Peverieri G., Alma A., Manzo A., Vez zalini L., Bellini E., Fazzi L., Poli I., Ferracini C., Ferri A., Turchetti T., Maltoni A., Ferrarese G.B., Pennacchio F., Roversi P.F. (2014). Linee guida per la gestione delle problematiche fitosanitarie del castagno. Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura (CRA), pp. 1-48.
- Seddaiu, S., Mello, A., Sarais, L. *et al.* Haplotypes distribution and virulence of *Gnomoniopsis castaneae* in Italy. *J Plant Pathol* **105**, 1135–1140 (2023). <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01459-1>
- Shuttleworth, L.A. & Guest, D.I. (2017) Il processo di infezione del marciume del castagno, un'importante malattia causata da *Gnomoniopsis smithogilvyi*



- (Gnomoniaceae, Diaporthales) in Oceania e in Europa. *Patologia vegetale australasiatica*, 46, 397–405.
- Shuttleworth, L.A., Liew, E.C.Y. & Guest, D.I. (2012) *Gnomoniopsis smithogilvyi* sp. Nov. fogli di descrizione delle piante fungine 107-127. *Persoonia*, 28, 142–143.
- Shuttleworth, L.A., Liew, E.C.Y. & Guest, D.I. (2013) Indagine sull'incidenza del marciume delle castagne nel sud-est dell'Australia. *Patologia vegetale australasiatica*, 42, 63–72.
- Sieber, T. N., Jermini, M., & Conedera, M. (2007). Effects of the harvest method on the infestation of chestnuts (*Castanea sativa*) by insects and moulds. *Journal of Phytopathology*, 155(7-8), 497-504.
- Sillo, F., Giordano, L., Zampieri, E., Lione, G., De Cesare, S. & Gonthier, P. (2017) L'analisi HRM fornisce approfondimenti sulla modalità di riproduzione e sulla struttura della popolazione di *Gnomoniopsis castaneae* in Europa. *Patologia vegetale*, 66, 293–303.
- Tabet D. 1936. Le condizioni dell'economia rura le nell'Appennino Toscano. Monte Amiata. Re ale Accademia dei Georgofili di Firenze, 285 pp.
- Tamietti, G. (2016) Sulla specie fungina *Gnomoniopsis castaneae* ("castanea") e il suo sinonimo *G. Smithogilvyi*. *Giornale di patologia vegetale*, 98, 189-190.
- Turchetti T, 1986. Some aspects of the main fungus diseases of chestnut. *Informatore Agrario*, 42(2):51-53
- Turchetti T, Maresi G, Nitti D, Guidotti A, Miccinesi G, 2003. Chestnut ink disease in the Mugello area: damage and control. *Monti e Boschi*, 54(1):22-26; 19 ref.
- Vannini, A., Martignoni, D., Bruni, N., Tomassini, A., Aleandri, M.P., Vettraino, A.M. et al. (2014) Nuovi cenni sulla biologia del fungo del castagno *Gnomoniopsis* sp. e sul suo possibile utilizzo come agente di biocontrollo della vespa gallina orientale del castagno. *Acta Horticulturae*, 1019, 235–238.
- Velez-Gavilan, J. *Curculio elephas* (European chestnut weevil).
- Venette, R.C., Davis, E.E., Heisler, H., Larson, M., 2003. In: Mini risk assessment. Chestnut weevil, *Curculio elephas* (Gyllenhal) [Coleoptera: Curculionidae]. Department of Entomology, University of Minnesota. 11 pp.

- Vettraino AM, Natili G, Anselmi N, Vannini A, 2001. Recovery and pathogenicity of Phytophthora species associated with a resurgence of ink disease in Castanea sativa in Italy. *Plant Pathology*, 50(1):90-96; 30 ref.
- Vettraino, A. M., Paolacci, A., & Vannini, A. (2005). Endophytism of Sclerotinia pseudotuberosa: PCR assay for specific detection in chestnut tissues. *Mycological Research*, 109(1), 96-102.
- Vettraino AM, Tomassini A, Vannini A, 2009. Detection and quantification of mRNA by reverse transcription real time PCR as indicator of viability of Phytophthora cambivora in soil. *Acta Horticulturae* [IV International Chestnut Symposium, Beijing, China, 25-28 September 2008].
- Vinale, F., Ruocco, M., Manganiello, G., Guerrieri, E., Bernardo, U., Mazzei, P. et al. (2014) Metaboliti prodotti da Gnomoniopsis castanea associati alla necrosi delle galle del castagno. *Tecnologie chimiche e biologiche in agricoltura*, 1, 8.
- Visentin, I., Gentile, S., Valentino, D., Gonthier, P., Tamietti, G. & Cardinale, F. (2012) Gnomoniopsis castanea sp. (Gnomoniaceae, Diaporthales) come agente causale del marciume delle noci nel castagno dolce. *Giornale di patologia vegetale*, 94, 411–419.
- Visentin, I., Gentile, S., Valentino, D., Gonthier, P., Tamietti, G. & Cardinale, F. (2012) Gnomoniopsis castanea sp. (Gnomoniaceae, Diaporthales) come agente causale del marciume delle noci nel castagno dolce. *Giornale di patologia vegetale*, 94, 411–419.
- Washington, W.S., Allen, A.D. & Dooley, L.B. (1997) Studi preliminari su Phomopsis castanea e altri organismi associati a frutti di castagno sani e marci in conservazione. *Patologia vegetale australasiatica*, 26, 37–43.
- Wells, J. M., & Payne, J. A. (1975). Toxigenic Aspergillus and Penicillium isolates from weevil-damaged chestnuts. *Applied microbiology*, 30(4), 536-540.

## 7.SITOGRAFIA

<https://ukmoths.org.uk/species/pammene-fasciana/>

[https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina\\_baseee53.html?id=1662](https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina_baseee53.html?id=1662)

## **8. RINGRAZIAMENTI**

Un ringraziamento particolare va al mio relatore, Professor Sergio Murolo e alla Dott.ssa Francesca Carloni per la professionalità e la grande disponibilità che mi hanno dimostrato nella stesura di questo elaborato. Ringrazio i miei genitori per aver permesso di proseguire i miei studi ed avermi sostenuto nei momenti più bui.