



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE FORESTALI E AMBIENTALI

**IDENTIFICAZIONE MORFOLOGICA DI ISOLATI  
DI *PHYTOPHTHORA* SPP. ASSOCIATI AL MAL  
DELL'INCHIOSTRO DEL CASTAGNO NELLE  
MARCHE**

***Morphological identification of Phytophthora isolates  
associated to chestnut ink disease in the Marche  
region***

TIPO TESI: SPERIMENTALE

Studente:  
FRANCESCO CAROSI

Relatore:  
PROF. SERGIO MUROLO

Correlatore:  
PROF. BENEDETTO  
LINALDEDDU

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

# INDICE

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| RIASSUNTO .....                                                                   | 4  |
| ABSTRACT .....                                                                    | 5  |
| 1. INTRODUZIONE .....                                                             | 6  |
| 1.1 Inquadramento tassonomico sistematico del castagno.....                       | 6  |
| 1.2 Areale di distribuzione del castagno nel mondo .....                          | 8  |
| 1.3 Areale di distribuzione del castagno in Italia e nelle Marche.....            | 9  |
| 1.3     Tecniche di coltivazione del castagno da frutto .....                     | 10 |
| 1.5 Principali problematiche fitosanitarie del castagno .....                     | 11 |
| 1.6 Mal dell'inchiostro del castagno agenti patogeni.....                         | 20 |
| 1.6.1. <i>Malattia e sintomatologia</i> .....                                     | 20 |
| 1.6.2. <i>Agente patogeno associato al mal dell'inchiostro del castagno</i> ..... | 21 |
| 2. SCOPO DELLA TESI .....                                                         | 27 |
| 3 MATERIALI E METODI .....                                                        | 28 |
| 3.1 Monti Sibillini e Monti della Laga .....                                      | 28 |
| 3.2 Le zone protette e Rete Natura 2000.....                                      | 32 |
| 3.3 Monitoraggio fitosanitario.....                                               | 35 |
| 3.4 Raccolta dei campioni di suolo .....                                          | 37 |
| 3.5 Isolamento di <i>Phytophthora</i> mediante tecnica baiting.....               | 37 |
| 3.6 Diagnosi molecolare .....                                                     | 39 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....                                                  | 42 |
| Area di studio A1 – Montemonaco (AP).....                                         | 44 |
| Area di studio A2 – Altino di Montemonaco (AP).....                               | 46 |
| Area di studio A3 – Montegallo (AP).....                                          | 47 |

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Area di studio A4 – Montegallo 2 (AP).....</b>                       | <b>49</b> |
| <b>Area di studio A5 – Pozza di Acquasanta Terme (AP) .....</b>         | <b>50</b> |
| <b>Area di studio A6 – Acquasanta terme (AP).....</b>                   | <b>52</b> |
| <b>Area di studio A7 – Colle San Marco (Ascoli Piceno) Ranelli.....</b> | <b>54</b> |
| <b>Area di studio A8 – Faete di Arquata del Tronto (AP).....</b>        | <b>55</b> |
| <b>Area di studio A9 – Spelunga di Arquata del Tronto (AP).....</b>     | <b>56</b> |
| <b>Area di studio A10 – Altino di Montemonaco 2 (AP).....</b>           | <b>56</b> |
| <b>Area di studio A11 – Uscerno di Montegallo (AP) .....</b>            | <b>58</b> |
| <b>CONCLUSIONI .....</b>                                                | <b>59</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>                                               | <b>60</b> |
| <b>SITOGRAFIA.....</b>                                                  | <b>64</b> |

## RIASSUNTO

*Il castagno europeo (Castanea sativa Mill.) è una specie che nelle Marche riveste un ruolo molto importante nell'economia delle comunità montane soprattutto nel territorio di Ascoli Piceno. Negli ultimi anni, a causa di numerose problematiche fitosanitarie, le basse produzioni e il basso prezzo spuntato sul mercato, la superficie dei castagneti è andata via via riducendosi, con un conseguente abbandono del territorio montano. Recentemente, la Regione Marche grazie a fondi europei, ha finanziato il progetto PSR INKAS, che tra gli obiettivi ha quello di preservare il patrimonio castanicolo regionale cercando nuove strategie di difesa per il controllo del mal dell'inchiostro del castagno. Tale malattia, diffusa a macchia di leopardo sul territorio marchigiano, è determinata da agenti patogeni appartenenti al genere Phytophthora, che vivono nel suolo, dove si propagano e infettano gli apparati radicali, compromettendo nei casi più gravi la vitalità delle piante stesse. In questa ricerca è stato verificato lo stato fitosanitario di 11 castagneti, prendendo in considerazione le principali malattie del castagno e in particolare il mal dell'inchiostro. Da ciascun sito sono stati raccolti campioni di rizosfera che sono stati analizzati in laboratorio per isolare gli agenti patogeni. All'isolamento su substrato selettivo, è seguita la fase di identificazione morfologica e poi molecolare. Dai risultati si evince che Phytophthora è presente in tutti gli 11 castagneti oggetto di studio. Sulla base della caratterizzazione morfologica e molecolare è emerso che sono 7 diverse specie di Phytophthora associate a sintomi di mal dell'inchiostro del castagno nella regione Marche. Tali dati saranno particolarmente utili ai fini di meglio calibrare le strategie di contenimento del mal dell'inchiostro.*

## ABSTRACT

*The European chestnut (Castanea sativa Mill.) is a species that plays a very important role in the economy of mountain communities in the Marche region, especially in the Ascoli Piceno area. In recent years, due to numerous phytosanitary problems, low production and low price on the market, the surface area of chestnut groves has been gradually decreasing, with a consequent abandonment of the mountain territory. Recently, the Marche Region, thanks to European funds, financed the PSR INKAS project, which one of the objectives is to preserve the regional chestnut-growing heritage by seeking new defence strategies to control the chestnut ink disease. This disease, which is widespread throughout the Marche region, is caused by pathogens belonging to the Phytophthora genus, which live in the soil, where they propagate and infect the root systems, compromising the vitality of the plants in the most extreme cases. In this research, the phytosanitary status of 11 chestnut groves was verified, taking into consideration the main chestnut diseases and in particular ink disease. Rhizosphere samples were collected from each site and analysed in the laboratory to isolate the pathogens. The isolation on a selective substrate was followed by morphological and then molecular identification. The results show that Phytophthora is present in all 11 chestnut groves studied. Based on the morphological and molecular characterisation, it emerged that there are 7 different Phytophthora species associated with symptoms of chestnut ink disease in the Marche region. These data will be particularly useful to better calibrate ink disease containment strategies.*

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Inquadramento tassonomico sistematico del castagno.

Il castagno europeo (*Castanea sativa*) è la specie di castagno più diffusa in Italia, si tratta di una dicotiledone appartenente alla Famiglia delle *Fagaceae* (Raimondi, 2019).

È un albero deciduo di dimensioni elevate, che può raggiungere un'altezza massima di 30 – 35 metri, presenta una chioma larga e arrotondata. È dotato di un'elevata longevità e, solo nelle Marche, sono presenti diversi individui secolari, anche se attualmente risultano presenti nel Registro degli alberi Monumentali solo 20 esemplari (Regione Marche, 2014). Il fusto negli esemplari più giovani appare liscio, di colore bruno-rossastro con numerose lenticelle allungate; successivamente, dopo i primi 10-15 anni di vita, assume un colore grigio-bruno con profonde fessurazioni su tutta la corteccia (Bounous, 2002). I rami dell'anno sono normalmente cilindrici, ma a volte anche angolati, specialmente nei polloni in forte accrescimento.

Le foglie (Fig. 1A) sono semplici, alterne e disposte a spirale ma apparentemente distiche per torsione del picciolo; sono a contorno ellittico-lanceolato e margine seghettato, presentano una consistenza tenace con la base cuneato-arrotondata e il picciolo lungo 1,5-2,5 cm con stipole presto caduche. Hanno una pagina superiore lucida di colore verde scuro mentre quella inferiore è opaca e più chiara. Le giovani foglie hanno una peluria che le avvolge completamente mentre le foglie mature sono quasi glabre (Raimondi, 2019).

La fioritura avviene generalmente tra maggio e giugno ma può essere più tardiva in annate fredde arrivando fino a luglio; si tratta di una specie monoica con infiorescenze ad amento miste oppure singole che si differenziano per lo sviluppo e il periodo di comparsa. È una specie autosterile quindi perché ci sia la fecondazione si deve verificare l'impollinazione incrociata tra diverse cultivar. Generalmente le infiorescenze miste sono più brevi e posizionate verso l'apice del ramo e sono caratterizzate da circa 20 cime ascellari in cui quelle basali sono femminili e verso l'apice maschili. I fiori femminili (pistilliferi) sono sessili (non presentano il peduncolo) con un ovario infero a 6-9 carpelli con stili rigidi e pelosi alla base, sono avvolti da una cupola verde (generalmente isolati o in gruppi di 2-3) (Bounous, 2002). I fiori maschili hanno un perianzio esamero con 6-12 stami lunghi e sottili. Le infiorescenze maschili (Fig. 1b) sono formate da fiori riuniti

in glomeruli ascellari o in cime che si sviluppano alla base del ramo dell'anno nuovo in forma eretta con una lunghezza che raggiunge i 15 cm. L'impollinazione è prevalentemente anemofila ma in parte minore anche entomofila in quanto il fiore produce numerosi essudati nettariini che attraggono le api, i ditteri e i lepidotteri. Successivamente all'impollinazione avviene la fecondazione e la cupola del fiore femminile si ricopre di lunghi aculei formando il riccio. La maturità riproduttiva negli individui selvatici generalmente viene raggiunta intorno ai 18-20 anni, mentre in quelli innestati attorno ai 25-30 anni (Bounous, 2002).

Il frutto (Fig. 1c) è un achenio duro, glabro e lucido all'esterno mentre è tomentoso all'interno. Gli acheni sono racchiusi, in numero di 1-3, all'interno di un involucri spinoso, comunemente chiamato riccio, derivato dall'accrescimento della cupola.

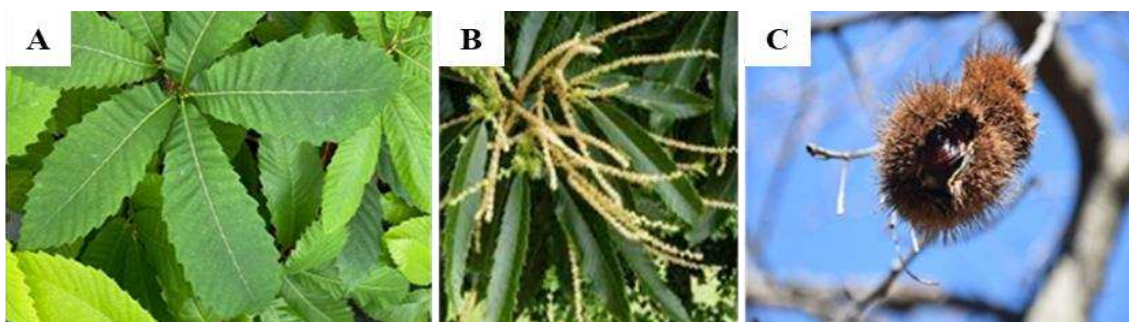


Figura 1 - (a) Foglia; (b) infiorescenza del castagno; (c) frutto e seme.

Il frutto è la principale caratteristica che permette l'identificazione delle diverse varietà:

- *Castagna*: questo gruppo comprende numerose varietà diffuse nelle diverse zone castanicole italiane, derivano tutte dal castagno europeo e presentano una pezzatura molto variabile (45 - 110 frutti per kg). Hanno una pellicola interna che solitamente penetra in profondità all'interno della polpa (spesso dividono in due parti la porzione interna), sono generalmente consumate fresche ma anche essiccate oppure confettate (Raimondi, 2019);
- *Marrone*: vengono prodotti solo da varietà coltivate e innestate; presentano all'interno dell'involucro frutti non settati con pellicola che non penetra la polpa e che si stacca facilmente durante le fasi di pulitura. Sono anche in questo caso utilizzati freschi oppure lavorati, hanno una pezzatura grande che varia dai 55 ai 70 frutti per kg e tutte le varietà derivano dal castagno europeo. Le piante di Marroni hanno un portamento

assurgente con un'entrata in produzione che avviene dopo il quinto-sesto anno dall'impianto o dall'innesto, sono quasi tutte piante astaminee (prive di fiori maschili) e che necessitano dell'impollinazione entomofila (Raimondi, 2019);

- *Euro-giapponesi*: sono varietà che derivano dall'incrocio tra il castagno europeo e il castagno giapponese (*C. crenata*) e sono stati introdotti in Italia dalla metà degli anni 70; molte varietà di questo tipo sono resistenti al cancro corticale ed in maniera minore al mal dell'inchostro (Montemartini, 1913);

## 1.2 Areale di distribuzione del castagno nel mondo

Il castagno è una specie moderatamente termofila, che predilige temperature tra i 6 e i 16°C, ma che riesce a sopportare temperature estreme fino a - 18°C, diventando più esigente durante la stagione vegetativa con una durata della stagione ottimale di almeno 6 mesi per permettere il completamento del ciclo vegetativo. Predilige terreni sciolti, freschi e ricchi di nutrienti (soprattutto potassio e fosforo); è una specie acidoclima preferendo terreni a reazione subacida ma anche acida. Il castagno viene coltivato e cresce spontaneamente fra i 200 e gli 800 m.s.l.m. nelle zone alpine arrivando fino a 1000-1300 m. Condizioni di moderata siccità estiva determinano un rilevante rallentamento dell'attività vegetativa con una conseguente fruttificazione irregolare (Euforgen, 2018).

Questo albero è originario dell'Europa meridionale e dell'Asia minore, ma è stato introdotto in molte parti del mondo per la sua importanza economica e culturale. L'areale naturale di distribuzione per *Castanea sativa* si estende dall'Europa meridionale, comprese le Isole Baleari, a sud fino alla Turchia e all'Iran a est. La specie è presente anche in alcune parti del Nord Africa, come Algeria, Tunisia e Marocco. In Europa, il castagno è particolarmente comune nei Paesi del Mediterraneo, tra cui Italia, Spagna, Francia, Portogallo e Grecia (Fig. 2). In Asia minore, la specie è presente soprattutto nelle regioni montuose della Turchia, dove il castagno ha una grande importanza economica e culturale. In queste regioni, la castanicoltura è una delle principali fonti di reddito delle comunità locali e viene utilizzato per produrre castagne, farina, miele e altri prodotti. Il castagno europeo è stato introdotto in molte altre parti del mondo, tra cui Nord America, Sud America, Australia e Nuova Zelanda. In Nord America, la specie è stata introdotta dai coloni europei nel XVII secolo e si è diffusa rapidamente in alcune parti del continente. In Sud America, il castagno è stato diffuso principalmente in Argentina e Cile,

dove è coltivato per la produzione di castagne fresche e secche (Guitian J., 2012). In Australia e Nuova Zelanda, è stato introdotto principalmente per motivi ornamentali e come fonte di legno. Tuttavia, la specie si è naturalizzata in alcune parti di questi paesi e la coltivazione commerciale della castagna è iniziata solo di recente (Conedera e Krebs, 2015).

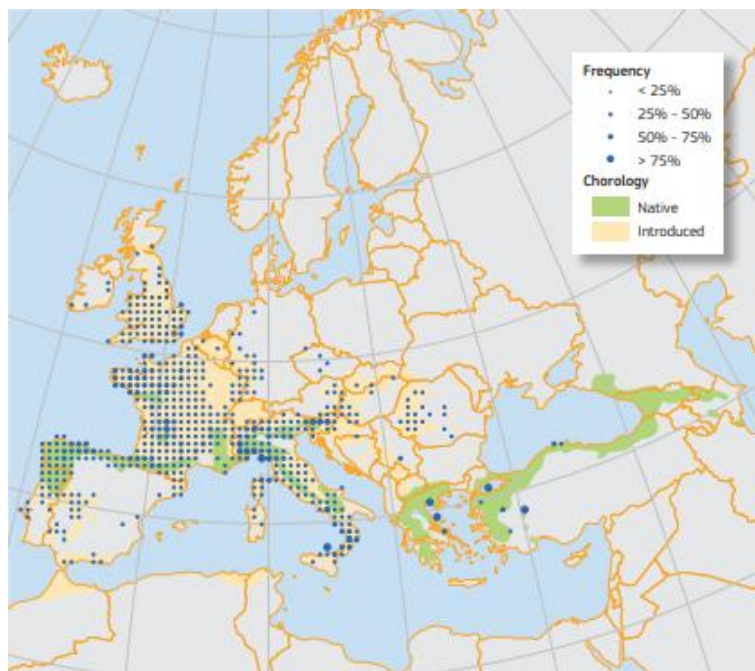


Figura 2 - Areale di distribuzione di *C. sativa* in Europa (Conedera, 2016).

### 1.3 Areale di distribuzione del castagno in Italia e nelle Marche

In Italia, l'areale di distribuzione di *Castanea sativa* è molto ampio e comprende gran parte della penisola, con eccezione di alcune aree montuose dell'Italia settentrionale. Il castagno è stato a lungo una delle colture più importanti dell'Italia, e ancora oggi la produzione rappresenta un'importante fonte di reddito per molte comunità rurali. Le regioni italiane con la più alta concentrazione di castagneti sono quelle del centro-sud, tra cui Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Campania, Calabria e Sicilia. Nel Nord Italia i castagneti sono invece concentrati in Emilia-Romagna, Liguria e Piemonte.

In queste regioni, il castagno da frutto è coltivato in modo naturaliforme, senza un sesto di impianto regolare o in frutteti organizzati.

Nella regione Marche si contano circa 900 ha destinati a castagneti da frutto e la Regione Marche ha finanziato recentemente una misura per il recupero di superfici

abbandonate. In particolare, nelle Marche la castanicoltura è concentrata nella provincia di Ascoli Piceno seguita da Fermo, ma piccole aree coltivate a castagno sono state censite anche nella provincia di Macerata, Ancona e Pesaro Urbino. I luoghi di maggiore coltivazione includono i monti Sibillini con annesso il parco nazionale omonimo che fornisce un clima fresco ed umido molto adatto al castagno, i monti della Laga che si trovano a confine con Marche, Lazio e Abruzzo e che hanno dei suoli ben drenati con abbondanza di acqua, in particolare nei comuni collinari di Arquata del Tronto, Acquasanta Terme, Montemonaco e Montegallo, noti per la produzione di castagne di alta qualità. Grazie all'attività congiunta dell'AMAP con il sostegno scientifico dell'Università Politecnica delle Marche D3A, dal territorio marchigiano sono state recuperate diverse accessioni di castagne e marroni autoctone (Marrone rugoso, Marrone Gentile, Marrone classico, Inzita e Pallante, Marrone della Sibilla di Montemonaco, Marrone di Pievebovigliana, Marroncino dell'Ascensione, Castagna di Valdicastro) e iscritte al Repertorio Regionale della Biodiversità Agraria.

### **1.3 Tecniche di coltivazione del castagno da frutto**

Le tecniche di coltivazione del castagno da frutto variano a seconda delle condizioni ambientali e climatiche, delle aree geografiche in cui la specie viene coltivata. Tuttavia, ci sono alcune tecniche colturali applicate e comuni in diverse parti del mondo:

- *Impianto di piantine*: messe generalmente a dimora in primavera o in autunno, in terreni ben drenati e fertili. La distanza di impianto dipende dalle varietà di castagno e dalle tecniche di gestione della pianta che si intendono utilizzare. Le piantine sono in genere selvatici che successivamente possono essere innestati o piantine già innestate. La scelta delle varietà da innestare e coltivare dipende dalle condizioni ambientali e climatiche. In generale, si preferiscono varietà autoctone che si adattano bene alle condizioni locali, ma in alcune zone vengono coltivate anche varietà introdotte da altre parti del mondo.
- *Potatura*: è una tecnica importante per la gestione delle piante sia in fase di allevamento che di produzione del castagneto, e viene utilizzata per controllare la forma degli alberi, favorire la produzione di frutti e prevenire le malattie delle piante. La potatura può essere effettuata in diversi periodi dell'anno, a seconda delle varietà di castagno e delle tecniche di gestione del castagneto.

- *Irrigazione*: può essere necessaria in alcune zone in cui le precipitazioni sono scarse o irregolari. Tuttavia, il castagno è generalmente una specie resistente alla siccità, e in molti casi non ha bisogno di irrigazione, se non in impianti nuovi intensivi.
- *Controllo delle malattie e dei parassiti*: il castagno è suscettibile ad alcune malattie e parassiti, come la cocciniglia, la tignola, il mal dell'inchiostro, il cancro del castagno e marciume dei frutti. Per prevenire queste malattie, è importante adottare tecniche di gestione del castagneto che favoriscano la salute delle piante, come ad esempio la potatura regolare, la pulizia del terreno e la scelta di varietà resistenti, nonché una buona dotazione di sostanza organica del suolo (Moricca *et al.*, 2018)
- *Raccolta dei frutti*: la raccolta delle castagne avviene generalmente in autunno, quando i frutti sono maturi. Questi vengono raccolti manualmente o con l'ausilio di attrezzature apposite, e vengono poi selezionati e lavorati per la produzione di castagne fresche o prodotti derivati (Zagnoni, 2022).

## **1.5 Principali problematiche fitosanitarie del castagno**

Le problematiche del castagno possono essere causate da fattori biotici (agenti patogeni e insetti parassiti) e da fattori abiotici (condizioni climatiche avverse). Di seguito si riporta una rassegna puntuale delle principali alterazioni descritte in letteratura sul castagno.

### **1.5.1. Alterazioni determinate da cause abiotiche**

Le problematiche abiotiche del castagno sono causate da fattori non biologici, come cambiamenti climatici e condizioni ambientali avverse (siccità, gelate primaverili, elevata umidità, temperature elevate, inquinamento atmosferico) e fattori antropici.

*Siccità*: può causare ingiallimento e caduta precoce delle foglie e dei frutti, la riduzione della produttività e, se prolungata, la morte delle piante. La maggiore suscettibilità delle piante alla siccità si riscontra nel periodo della fioritura e durante la maturazione del frutto. Negli ultimi anni le colture, tra cui anche il castagno, nel Piceno hanno subito danni per siccità relativamente bassi, anche se nelle annate del 2019 – 2020 ci sono stati leggeri cali produttivi dovuti alle scarse piogge primaverili.

*Gelate primaverili*: possono causare la morte dei germogli e dei fiori, impedendo la formazione dei frutti.

*Elevata umidità*: nel periodo primaverile può creare le condizioni favorevoli per la diffusione della ruggine del castagno, che causa lesioni sulle foglie, piccioli e sui rami, determinando una filloptosi anticipata e un calo conseguente delle produzioni nell'annata in corso ma anche in quella successiva. Se questa umidità si riscontra nel periodo della fioritura allora possono verificarsi le condizioni per infezione e diffusione di *Gnomoniopsis* spp. I ristagni idrici, insieme al compattamento del suolo e alla tessitura possono invece essere determinanti per la diffusione degli agenti di marciume radicale determinato da *Phytophthora* spp.

*Elevate temperature*: può causare la caduta precoce delle foglie e dei frutti, la riduzione della produttività e la morte delle piante. Il caldo se prolungato può dare gravi problemi durante la maturazione del frutto che si secca prima della raccolta rimanendo attaccato ai rami.

*Carenze nutrizionali*: sono state soprattutto riscontrate in castagneti pedemontani, dove i suoli, analizzati da un punto di vista chimico, presentavano carenze di ferro e manganese che hanno determinato evidenti ingiallimenti della chioma (Fig. 3a), scarso vigore delle piante e minori produzioni (Bertoldi *et al.*, 2020).

*Inquinamento atmosferico*: può causare la comparsa di lesioni sulle foglie e sui rami, riducendo la produttività delle piante favorendo anche la suscettibilità a patogeni considerati minori per il castagno.

*Dissesto idrogeologico*: il castagno viene spesso coltivato in aree montane, in territori marginali, caratterizzati in genere da elevate pendenze, difficilmente coltivabili con altre colture. La presenza di patogeni agenti di marciumi radicali può facilitare il ribaltamento di tali piante andando a compromettere la stabilità del suolo dei versanti.

*Incompatibilità di innesto*: gli innesti possono essere effettuati in diversi modi, ma alcune tipologie sono più rischiose di altre in quanto c'è il rischio che i due bionti non si saldino perfettamente. L'incompatibilità di innesto (Fig. 3b-c) può essere dovuta anche alla compatibilità genetica tra i due bionti, nonché ad agenti virali come il *Chestnut mosaic virus* (Vai e Apruzzese, 2013).

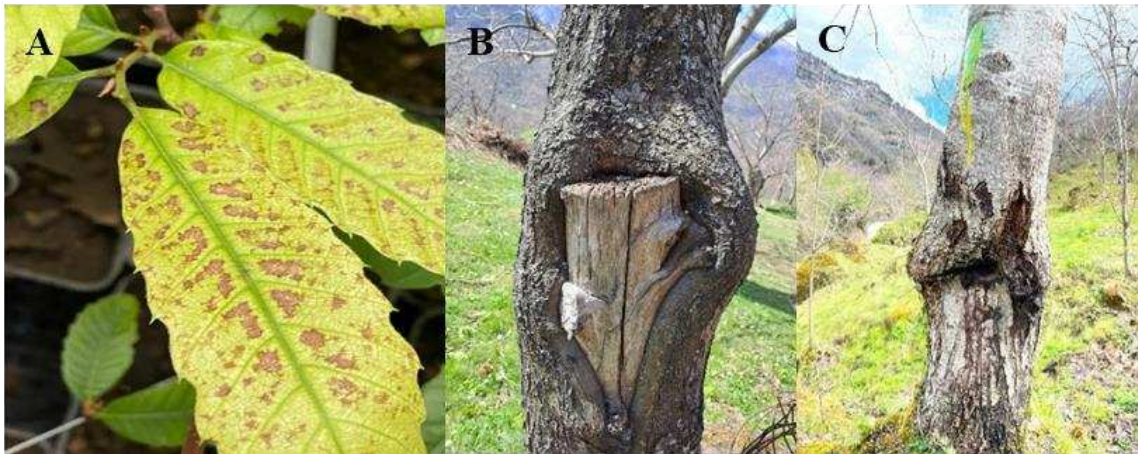


Figura 3 - (a) Sintomo dato dalla carenza di magnesio su foglia di castagno, (b, c) rigonfiamento causato da un parziale incompatibilità di innesto.

*Cipollatura del castagno*: può essere definita in funzione della sua origine. In alcuni casi il difetto si manifesta in concomitanza di tessuti legnosi con evidenti disturbi di origine traumatica (ferite, colorazioni anomale e principi di marciume). A questo tipo di cipollatura, normalmente denominata «traumatica», si contrappone quella «sana», caratterizzata dalla separazione di tessuti apparentemente privi di anomalie (Chanson *et al.*, 1989). Una ulteriore classificazione in base a caratteri morfologici permette la differenziazione in tre categorie: «sovrapposizione», «distacco» e «frattura». La tipologia «sovrapposizione» è caratterizzata dalla totale assenza di saldatura tra i due strati legnosi contigui già al momento della loro formazione. Si tratta di una cipollatura di manifesta origine traumatica, nell'ambito della quale le cellule legnose del nuovo anello di crescita si sono semplicemente sovrapposte alle cellule morte dell'anello danneggiato preesistente. La separazione avviene pertanto per l'assoluta mancanza di coesione tra i due strati di legno. Questa tipologia è originata da eventi antropici o ambientali che hanno lesionato il tessuto cambiale. La tipologia «distacco» consiste invece in uno scollamento a livello di lamella mediana tra le cellule legnose di due anelli contigui. L'origine di questa alterazione non è chiara: solitamente non vi sono relazioni dirette con anomalie visibili legate a un trauma, anche se effetti indiretti sulla coesione del legno da eventi traumatici esterni o da temporanei indebolimenti della pianta (carenze nutrizionali, stress da siccità, attacchi parassitari, ecc.) al momento della formazione del legno non possono essere esclusi. La tipologia nettamente più frequente nel castagno è la «frattura». In questa variante di cipollatura, la separazione avviene a livello dei vasi del legno primaticcio, che

si spezzano longitudinalmente. Questa rottura implica una lacerazione delle pareti cellulari. L'assenza di anomalie evidenti in prossimità della frattura e la sua localizzazione nella zona più debole della struttura legnosa (zona porosa del legno primaticcio), induce a ritenere la sua origine di tipo meccanico (Chanson *et al.*, 1989).

### **1.5.2. Fitofagi del castagno**

Sono diversi gli insetti che possono attaccare il castagno, causando danni alle piante. Alcuni sono più diffusi di altri, ma generalmente causano danni alla produzione evidenti solo se presenti in grande quantità.

**Cinipide del castagno** (*Dryocosmus kuriphilus*) è un insetto parassita originario della Cina che infesta le piante di castagno causando la formazione di galle (Fig. 4) che provocano un'importante perdita di produzione.



Figura 4 - Galle su foglie di castagno ad opera di *Dryocosmus kuriphilus*.

Per contrastare l'infestazione, è stato introdotto l'antagonista naturale della cinipide, ovvero *Torymus sinensis*, che ha dimostrato un'efficacia del 100% nell'attaccare le galle e contenere l'infestazione. La presenza costante di entrambe le specie garantisce la stabilità dell'ecosistema e la liberazione di *Torymus* ha portato a un miglioramento generale della produttività dei castagneti limitrofi, con piante più vigorose e resistenti ad altri patogeni e stress ambientali (Vai e Apruzzese, 2013). Oltre a questo parassita ne sono stati individuati e descritti i seguenti:

**Afidi del castagno** (*Myzocallis castanicola*, *Phyllaphis fagi*) (Fig. 5B, D): questi insetti succhiano la linfa delle foglie del castagno, riducendo la funzionalità delle piante.

Un gruppo di insetti che possono causare danni significativi alle piante di castagno appartengono ai Coleotteri, in particolare al genere *Curculio*. Le specie più comuni che attaccano il castagno sono il balanino del castagno (*Curculio elephas*) (Fig. 5A) e il

balanino del castagno orientale (*Curculio glandium*) (Fig. 5C) (Sabbatini et al., 2012). Sono insetti di piccole dimensioni, di colore marrone scuro o nero. La loro morfologia è caratterizzata da un corpo compatto e una proboscide lunga e curva. Le femmine depongono le uova all'interno delle castagne immature, utilizzando la loro proboscide per praticare fori nella buccia esterna. Le larve si sviluppano all'interno delle castagne, nutrendosi della polpa e dei semi. Il ciclo di vita può durare da uno a due anni, a seconda delle condizioni ambientali. Le larve si sviluppano all'interno delle castagne, completando diverse fasi di sviluppo, e infine emergono come adulti attraverso un piccolo foro nella buccia.

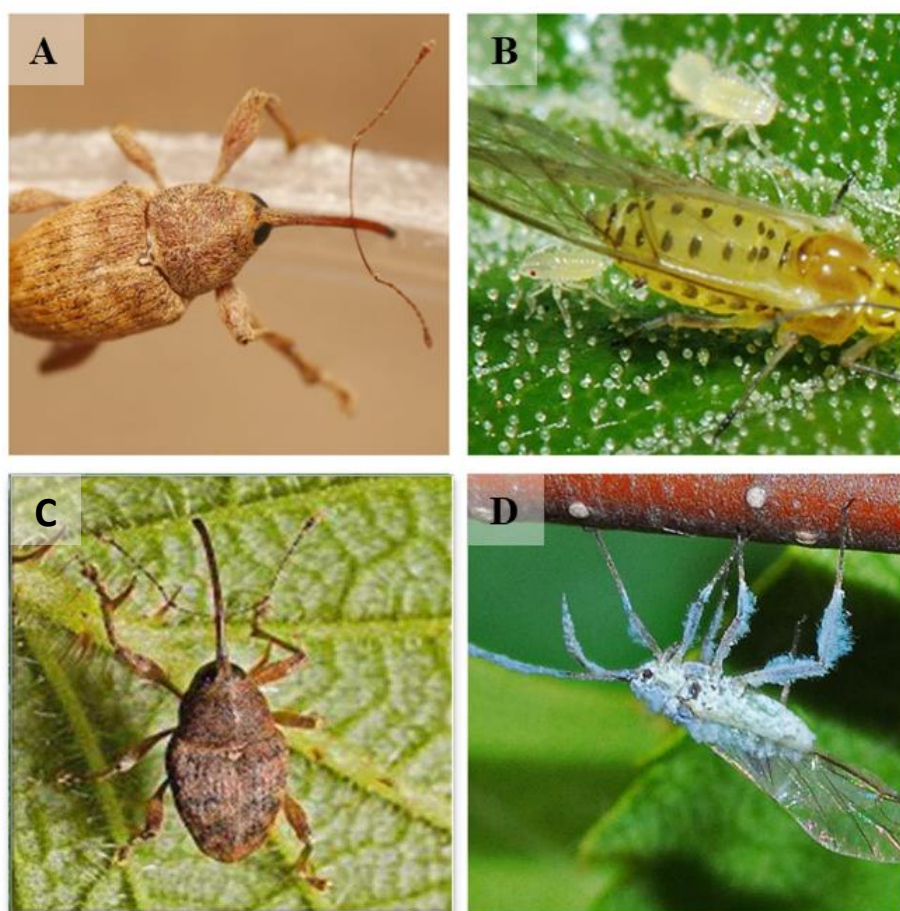


Figura 5 - (a) *Curculio elephas*, (b) *Myzocallis castanicola*, (c) *Curculio glandium*, (d) *Phyllaphis fagi*.

**Gli Scolitidi**, o scarabei della corteccia, sono una vasta famiglia di coleotteri che si nutrono principalmente della corteccia e del legno di varie specie di alberi. Diverse specie di questi coleotteri sono note per infestare il castagno europeo (*Castanea sativa*). *Scolytus*

*intricatus*: Lo scarabeo della corteccia della quercia europea può anche infestare i castagni. Di solito attacca gli alberi debilitati o recentemente abbattuti. *Pityogenes chalcographus*: Conosciuto anche come scarabeo della corteccia del pino a sei denti, è principalmente un parassita dei pini, ma può infestare anche altre specie, compreso il castagno, soprattutto se gli alberi sono debilitati o sotto stress (Schebeck *et al.*, 2022).

In generale, i castagni sani sono piuttosto resistenti agli attacchi degli scarabei della corteccia. Tuttavia, quando gli alberi sono stressati o debilitati, ad esempio a causa di siccità, malattie o vecchiaia, diventano più suscettibili. Gli scarabei della corteccia possono contribuire al declino e alla morte dell'albero. Le infestazioni di questi insetti iniziano spesso nella corteccia e negli strati esterni del legno, dove i coleotteri depongono le uova. Le larve si insinuano poi dentro l'albero per nutrirsi, interrompendo la capacità dell'albero di trasportare acqua e nutrienti. In infestazioni gravi, ciò può portare alla morte dell'albero (Vai ed Apruzzese, 2013).



Figura 6: *Pityogenes chalcographus* (sinistra), *Scolytus intricatus* (destra).

### **1.5.3. Alterazioni determinate da cause biotiche**

Il castagno può essere attaccato da diversi agenti patogeni, che a seconda delle diverse condizioni stagionali, climatiche e fisiologiche della pianta possono determinare danni più o meno intensi alla produzione e nei casi più gravi alla vitalità delle piante stesse. Tra i virus che sono stati segnalati su castagno ricordiamo il virus del mosaico del castagno (ChMV), caratterizzato da tessuti fogliari che alternano in modo irregolare aree gialle ad aree verdi dei tessuti internervali con l'arricciamento della foglia, e con la presenza di necrosi irregolari sui margini. Recentemente sono stati effettuati studi specifici in Italia e Francia e, utilizzando metodiche classiche e innovative di diagnosi è

stato possibile ricostruire il genoma completo di un badnavirus (Murolo *et al.*, 2021), associato alla malattia che i ricercatori francesi avevano denominato “mosaico del castagno”. Oltre al mosaico del castagno, nel 1971 sono stati segnalati in Ungheria sintomi virus-simili su piante di *Castanea sativa* e *Quercus cerris* e attraverso la microscopia elettronica furono individuate su tutte le piante sintomatiche particelle virus-simili con una morfologia caratteristica del genere *Tobamovirus*, e molto simili al *Tobacco mosaic virus*, già segnalato in precedenza su quercia in Germania, Cecoslovacchia e California.

Nel 2002 è stato individuato un nuovo taxon di fitoplasmi con la denominazione di “*Candidatus Phytoplasma castaneae*”, grazie a delle analisi su castagni giapponesi in Corea, che mostravano sintomi ascrivibili alla malattia “Chestnut witches’ broom” (CnWB). Appartenente a questo taxon, anche un altro fitoplasma, riscontrato su piante di *Castanea mollissima* affette da “Chestnut yellow crinkle” (CnYC).

Un ruolo sicuramente predominante è svolto da patogeni fungini che possono attaccare diverse parti della pianta, come le foglie, i rami, il tronco e le radici. Tra le principali malattie ricordiamo l’oidio, la fersa o ruggine, la carie del legno, il marciume radicale fibroso, il cancro corticale del castagno, causato da *Cryphonectria parasitica* e il marciume gessoso delle castagne, causato da *Gnomoniopsis castaneae*. Per queste ultime due malattie seguirà un approfondimento.

**Il cancro corticale del castagno** è causato da *Cryphonectria parasitica*, che penetra nella corteccia dell'albero attraverso ferite o danni causati da insetti o agenti atmosferici. Il cancro si manifesta come lesioni necrotiche che partendo dalla corteccia si approfondiscono andando a interessare anche i tessuti vascolari della pianta (Fig. 7).

I cancri espandendosi all’intera circonferenza della branca o del ramo possono determinare il disseccamento della parte distale interessata. Inizialmente, le lesioni appaiono come piccole escrescenze o creste sulla corteccia, che si allargano col tempo e assumono una forma irregolare. In seguito, le lesioni possono causare la morte dei tessuti dell'albero, causando la necrosi e la caduta dei rami o del tronco. Il patogeno è stato introdotto accidentalmente in Europa dall'Asia alla fine del XIX secolo. Da allora, la malattia ha causato gravi danni ai boschi di castagno in molti paesi europei e in Nord America. Sul mercato sono disponibili castagni ibridi con una certa resistenza al cancro corticale, generati perlopiù attraverso incroci tra il castagno europeo e quello giapponese.

La maggior parte di questi ibridi sono di origine francese. Esistono anche tre varietà (Onangro *et al.*, 2023) prodotte dal programma svizzero di selezione di castagni resistenti che possono entrare in considerazione per impianti amatoriali nelle regioni più miti e con suoli acidi del Nord della Svizzera (Istituto Federale della Ricerca WSL, 2016).

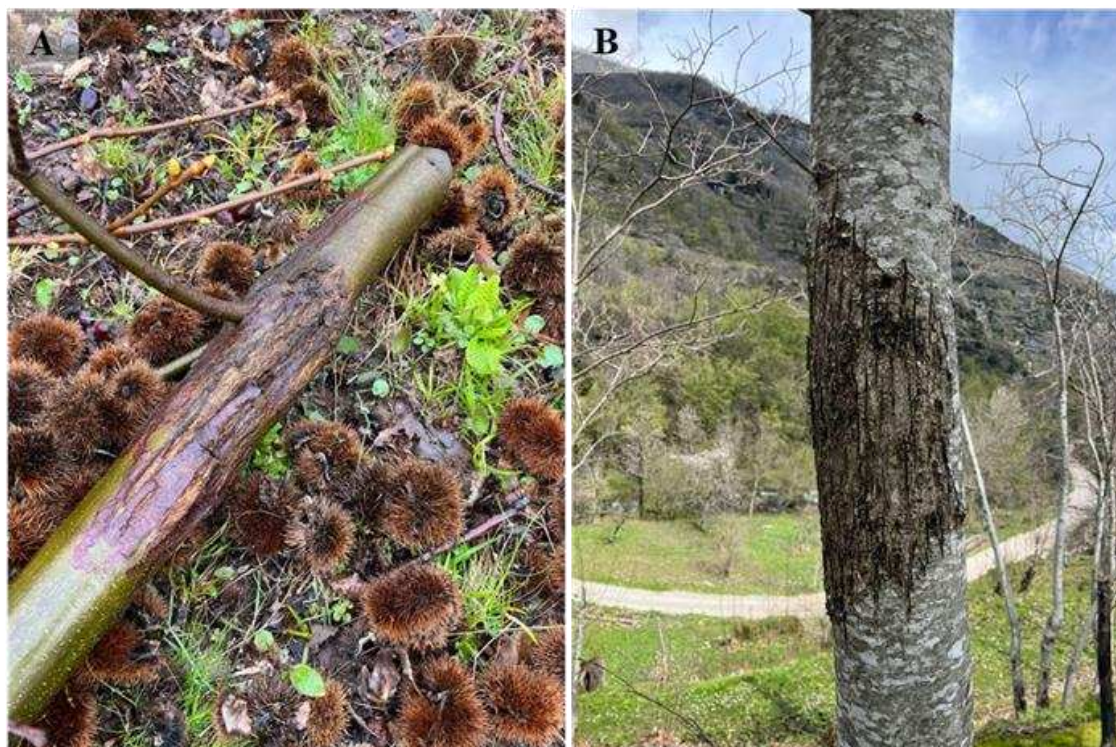


Figura 7- (a) Cancro virulento, (b) cancro ipovirulento cicatrizzato

Un ruolo fondamentale nel contenimento del cancro corticale è stato rivestito dal fenomeno dell'ipovirulenza, che è stato sfruttato per la gestione biologica di tale problematica. Tale approccio si basa sull'utilizzo di ceppi ipovirulenti di *C. parasitica*, che sono iperparassitizzati dal virus *Cryphonectria hipovirus -1* (CHV-1). Ipovirus è in grado di migrare da un ceppo ipovirulento a un ceppo virulento del fungo solo se c'è compatibilità vegetativa e le ife dei due funghi si fonde per anastomosi mettendo in comune il contenuto citoplasmatico in cui sono presenti le particelle virali (Turchetti *et al.*, 2010). Per il controllo di *C. parasitica* virulenta sono anche state effettuate in condizioni controllate prove di antagonismo sia con microrganismi antagonisti isolati sia con formulati commerciali a base di antagonisti microbici (Murolo *et al.*, 2020).

***Il marciume gessoso delle castagne*** è determinato da un fungo *Gnomoniopsis castaneae* che colpisce diversi organi della pianta e in particolare causa il marciume o gessoso (Maresi *et al.*, 2013).

Il fungo si sviluppa come endofita fin dalla fioritura, rimanendo latente sino alla raccolta e commercializzazione per poi evidenziarsi nel momento in cui i frutti vengono consumati. Il danno causato da *Gnomoniopsis castaneae* è visibile al taglio delle castagne, quando l'interno del frutto appare inizialmente bianco gesso, spugnoso e poi vira verso il bruno (Fig. 8) compromettendo i frutti per il consumo fresco in quanto ne altera il sapore. La malattia si è manifestata con gravità e frequenza crescenti negli ultimi anni, causando preoccupazione tra i produttori e ingenti perdite di prodotto. Il fungo differenzia fruttificazioni microscopiche sulle galle del cinipide galligeno del castagno secche e ricche di sostanze zuccherine, oltre che su residui vegetali a terra. Il fungo si diffonde mediante il vento, pioggia e insetti (Moricca *et al.*, 2017).

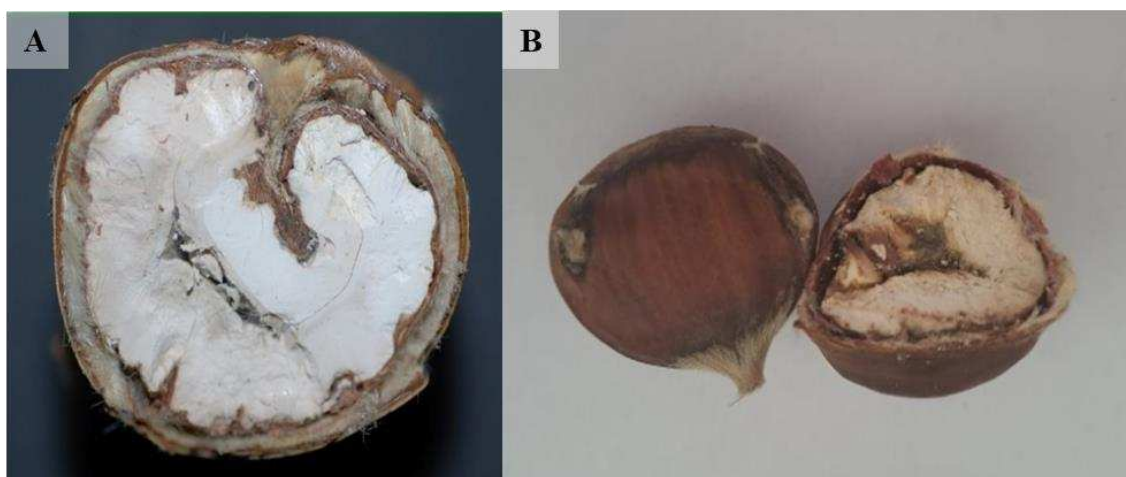


Figura 8 - Marciume gessoso su castagna determinato da *Gnomoniopsis castaneae*.

Oltre alle alterazioni determinate dai funghi, un ruolo molto importante è svolto da patogeni appartenenti al gen. *Phytophthora* spp. che sono associati al mal dell'inchiostro del castagno.

## **1.6 Mal dell'inchiostro del castagno agenti patogeni**

### ***1.6.1. Malattia e sintomatologia***

Il mal dell'inchiostro è oggi considerato una delle peggiori malattie assieme il cancro che può colpire il castagno e rappresenta sempre più un forte elemento di sofferenza per i castagneti marchigiani e più in generale quelli italiani. Questa malattia ha una sintomatologia molto variegata che comprende sia sintomi specifici che aspecifici. I sintomi aspecifici comprendono microfillia e clorosi, il disseccamento di ricci e foglie, che rimangono attaccati alla pianta, l'emissione di rami epicormici i quali, assieme alle branche ed all'intera pianta, vanno in contro a disseccamento. Oltre ai sintomi aspecifici, si hanno i sintomi caratteristici che si manifestano a livello del colletto mediante la necrotizzazione dei tessuti sottocorticali che assumono una a forma a fiamma di colore scuro che si innalza fino ai 30-80 cm di altezza dal colletto (Fig. 9 c-d), spesso accompagnato da produzione di abbondanti essudati scuri, da cui deriva la denominazione di mal dell'inchiostro. Anche le radici risultano prive di radici assorbenti efficienti e sono visibili necrosi sottocorticali anche delle radici principali che hanno funzione di sostegno,

con ripercussioni non solo sull'efficienza di assorbimento, ma anche sulla stabilità delle piante (Montecchio, 2014).

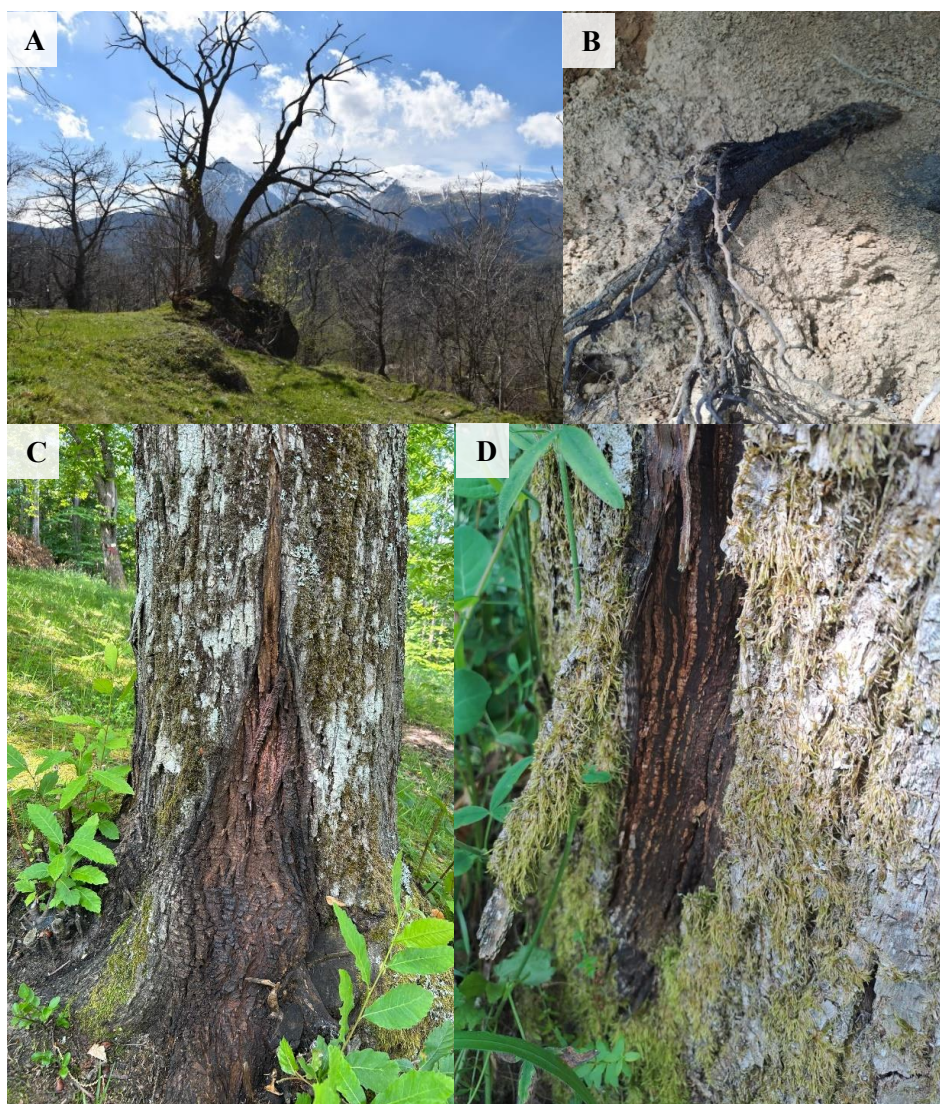


Figura 9 - (a) Piante disseccate, (b) radice imbrunita a causa di infezioni da *Phytophthora*, (c, d) necrosi a fiamma con emissione di essudati.

### ***1.6.2. Agente patogeno associato al mal dell'inchiostro del castagno***

I patogeni del genere *Phytophthora* sono organismi appartenenti alla classe *Oomycetes*, in grado di attaccare diverse specie di piante, causando gravi perdite economiche (Bienapfl *et al.*, 2022). Dal punto di vista morfologico, presentano una struttura filamentosa, simile a quella dei funghi veri e propri. Tuttavia, a differenza di questi, i filamenti (igrofori) di *Phytophthora* sono provvisti di pareti cellulari composte

principalmente da cellulosa, a differenza dei funghi le cui pareti cellulari sono composte principalmente da chitina. Il gen. *Phytophthora* produce strutture riproduttive chiamate sporangi (Fig. 10a), che sono simili a piccole vescicole (zoosporangi) e contengono le zoospore. Si conserva nel suolo e sui residui vegetali differenziando organi di svernamento (clamidiospore) (Fig. 10c).

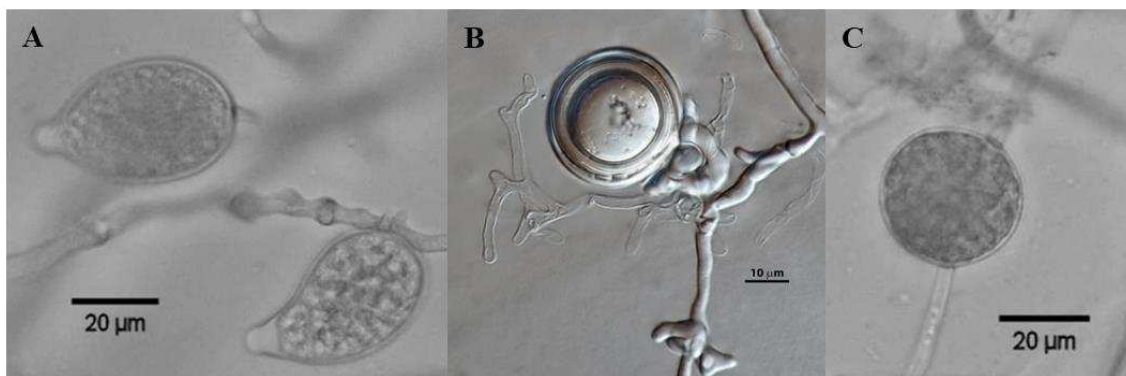


Figura 10 - (a) Sporangio, (b) oogonio, (c) clamidiospore (<https://forestphytophthoras.org>).

Il ciclo vitale di questo patogeno è caratterizzato da diverse fasi che iniziano con la sporulazione dove il patogeno produce spore a forma di pera chiamate sporangi, che si sviluppano all'interno dei tessuti della pianta ospite infetta. Gli sporangi possono essere liberati nell'ambiente attraverso la pioggia. Le spore germinano e formano un tubo germinativo che penetra nella pianta ospite attraverso le ferite e si diffonde nei tessuti, causando la morte delle cellule. La riproduzione sessuale consiste nella fusione di gameti maschili e femminili per formare una struttura chiamata oospora. Le oospore possono rimanere dormienti nel suolo per lunghi periodi di tempo, finché non si verificano le condizioni favorevoli per la germinazione. Inoltre, il patogeno può essere trasportato da una pianta all'altra attraverso il movimento di suolo e scorrimento di acqua (Scanu *et al.*, 2014).

*Phytophthora cambivora* e *P. cinnamomi* (Fig. 11) sono in grado di attaccare diverse specie di piante, tra cui il castagno. Pur appartenendo allo stesso genere, le due specie presentano alcune differenze che riguardano in modo particolare il range di ospiti. La diffusione avviene principalmente attraverso l'acqua, in particolare durante i periodi di pioggia o di irrigazione delle piante. Entrambi i patogeni possono sopravvivere nel terreno per diversi anni, anche in assenza di piante ospiti (Vannini *et al.*, 2014).

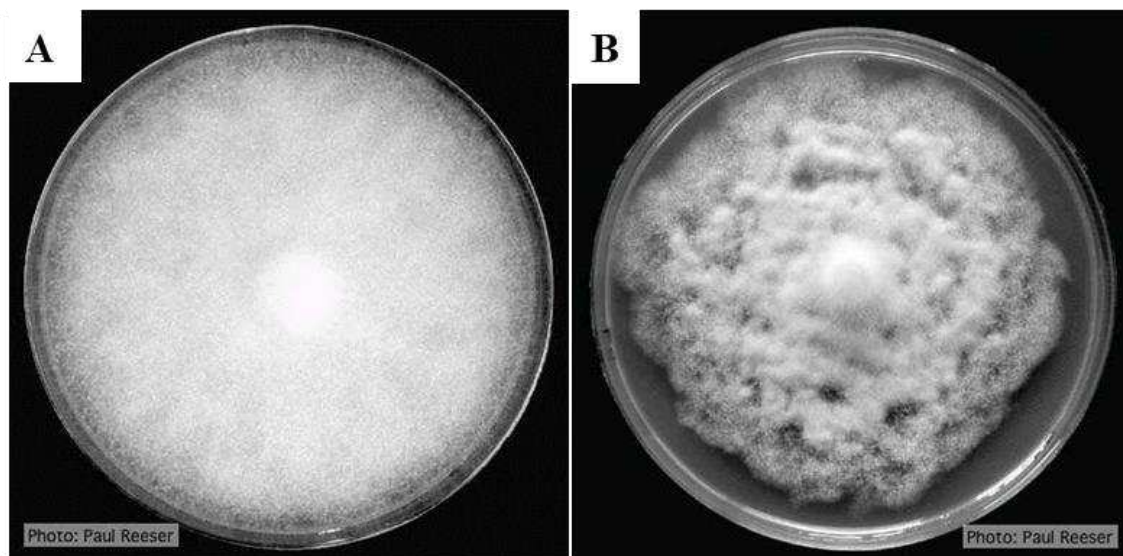


Figura 11 - Colture pure di *Phytophthora cambivora* (a) *Phytophthora cinnamomi* (b) (<https://forestphytophthoras.org>).

### 1.6.3. Fattori predisponenti

Ci sono diversi fattori predisponenti che possono favorire lo sviluppo della malattia, in modo particolare quelli legati alle condizioni e caratteristiche del suolo rivestono una certa importanza. Il gen. *Phytophthora* prospera in terreni acidi, mal drenati e poveri di sostanza organica e nutrienti. I terreni troppo umidi in cui c'è una difficoltà di drenaggio, alternanza di periodi caratterizzati da elevate temperature e penuria di piogge, indeboliscono le piante e le stressano rendendole più vulnerabili agli attacchi di *Phytophthora*. Particolarmente importante è la scelta in cui andare a stabilire i nuovi impianti e l'utilizzo di materiale di propagazione sano e certificato. Le piante mature hanno una maggiore capacità di sopravvivere alla malattia in quanto avendo un apparato radicale molto esteso, difficilmente potrà essere completamente compromesso, a differenza delle giovani piante (Regione del Veneto, 2014).

### 1.6.4. Principali metodi di lotta

Ad oggi sono stati sperimentati diversi sistemi di lotta al patogeno, prediligendo strategie basate sulla prevenzione e in particolare l'utilizzo di formulati a base di microrganismi antagonisti.

**Formulati a base di *Bacillus subtilis*** (Fig. 12a) è un batterio Gram-positivo che si trova comunemente nel suolo. È noto per le sue proprietà benefiche come agente di controllo

biologico contro vari patogeni delle piante. Il batterio è stato studiato come un agente di biocontrollo efficace contro il mal dell'inchiostro nel castagno. Questo batterio produce composti antimicrobici, che possono inibire la crescita dei patogeni fungini, inclusi quelli responsabili del mal dell'inchiostro. L'applicazione di formulazioni contenenti *Bacillus subtilis* sulle piante di castagno può aiutare a ridurre l'incidenza e la gravità della malattia. Il batterio colonizza la superficie delle foglie e dei tessuti dell'albero, entrando in competizione con i patogeni per l'occupazione degli spazi e delle risorse nutritive. Inoltre, i composti antimicrobici prodotti dal *Bacillus subtilis* possono impedire la penetrazione e la diffusione dei patogeni all'interno delle piante (Gobbi *et al.*, 1985).



Figura 12 - (A) prodotto a base di *Bacillus subtilis*, (B) formulato di micorrizze ampiamente usato in campo agricolo, (C) prodotto a base di spore di *Trichoderma*, (D) prodotto a base di fosfiti.

L'uso di *Trichoderma* (Fig. 12c) come agente di controllo biologico sul castagno può contribuire a proteggere l'albero da patogeni fungini e promuovere lo sviluppo complessivo della pianta. *Trichoderma* è stato ampiamente studiato per il suo potenziale

nel controllo di malattie fungine che colpiscono il castagno, come il mal dell'inchiostro e il marciume radicale (causata da *Rhizoctonia* spp. e altri patogeni). Quando applicato al suolo o alle radici delle piante di castagno, *Trichoderma* colonizza la rizosfera, entrando in competizione con i patogeni per le risorse nutritive e producendo enzimi che possono degradare le pareti cellulari dei patogeni. *Trichoderma* può anche stimolare il sistema di difesa delle piante, rendendole più tolleranti alle infezioni dei patogeni. L'applicazione può essere effettuata tramite diverse modalità, come trattamenti del suolo, trattamenti delle radici o applicazioni fogliari. I prodotti commerciali contenenti ceppi specifici di *Trichoderma* sono disponibili sul mercato e le istruzioni di utilizzo possono variare a seconda del prodotto e delle condizioni specifiche (Cristinzio *et al.*, 2002).

**L'uso di formulati a base di funghi micorrizici** (Fig. 12b) sul castagno può offrire diversi benefici in quanto possono avere un impatto sulla salute delle piante e sulla crescita della stessa. Le micorrize sono una simbiosi mutualistica tra le radici delle piante e i funghi del suolo, in cui entrambi i partner traggono vantaggio dalla relazione. Le micorrize formano una rete di filamenti fungini chiamati ife che si estendono nel suolo, aumentando l'area di assorbimento delle radici delle piante. Questo permette alle piante di castagno di accedere a una maggiore quantità di acqua e nutrienti, come il fosforo e l'azoto, che possono essere limitanti in alcuni suoli. Le micorrize migliorano l'efficienza nell'assorbimento di questi nutrienti, favorendo una migliore crescita delle piante di castagno. L'uso delle micorrize sul castagno può essere realizzato attraverso diverse modalità. Una delle opzioni è l'uso di inoculi micorrizici, che sono prodotti commerciali contenenti spore o propaguli di funghi micorrizici. Questi inoculi vengono applicati al suolo o alle radici delle piante durante la semina o il trapianto. È importante assicurarsi di utilizzare inoculi specifici per la specie di castagno e seguire attentamente le istruzioni di utilizzo (Branzanti *et al.*, 1994).

**I fosfiti** (Fig. 12d) sono composti chimici che vengono utilizzati in agricoltura come fertilizzanti che però mostrano un'azione nei confronti degli agenti del mal dell'inchiostro che può colpire il castagno. Tuttavia, va specificato che l'uso di fosfiti contro il mal dell'inchiostro è oggetto di discussione e ricerca in corso. I fosfiti contengono ioni fosfito ( $\text{HPO}_3^{2-}$ ) e vengono spesso impiegati per la loro capacità di stimolare il sistema di difesa naturale delle piante, piuttosto che per la loro azione diretta contro i patogeni. Questi composti possono indurre una risposta di tipo resistenza sistemica acquisita (SAR) nelle

piante, rendendo le piante più resistenti alle infezioni fungine. L'efficacia contro il mal dell'inchiostro del castagno può variare a seconda delle circostanze e delle condizioni locali. Alcuni studi suggeriscono che l'applicazione di fosfiti può ridurre l'incidenza e la gravità delle infezioni di *Phytophthora* spp. sui castagni. Tuttavia, è importante notare che l'uso dei fosfiti dovrebbe essere parte di un programma di gestione integrata delle malattie e non la sola strategia di controllo (Montecchio *et al.*, 2014).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Considerato l'elevato impatto che il mal dell'inchostro può avere sulla vitalità delle piante e sulla produzione di frutti, l'importanza che la coltivazione del castagno ha nelle aree marginali e montane, rimanendo una delle principali fonti di reddito e presidio del territorio, risulta fondamentale approfondire l'eziologia della malattia in relazione ai sintomi riscontrati in modo da poter predisporre piani operativi di gestione attiva al contenimento del mal dell'inchostro. La presente ricerca si contestualizza all'interno del Progetto PSR "Protezione del castagno da frutto dal mal dell'inchostro del castagno (Progetto INKAS) che, come principale obiettivo, ha la salvaguardia del patrimonio castanicolo regionale dall'inesorabile diffusione della malattia.

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di verificare lo stato sanitario in undici castagneti nei comuni di Acquasanta Terme, Montegallo, Rotella, Uscerno, Abetito, Meschia e Faete con particolare riferimento ai sintomi di mal dell'inchostro del castagno. Da un numero rappresentativo di piante sono stati raccolti campioni di suolo dalla rizosfera per verificare la presenza di agenti patogeni appartenenti al genere *Phytophthora*. Gli isolati 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) Scelta delle aree studio;
- II) Monitoraggio fitosanitario delle principali avversità
- III) Raccolta di campioni di suolo e corteccia
- IV) Uso della tecnica del baiting per l'isolamento del patogeno
- V) Trasferimento in coltura pura tramite substrati selettivi per il gen. *Phytophthora*
- VI) Estrazione del DNA e amplificazione genica mediante PCR per identificazione delle specie presenti

### 3 MATERIALI E METODI

#### 3.1 Monti Sibillini e Monti della Laga

Il *Parco Nazionale dei Monti Sibillini* (Fig. 13), istituito con D.P.R. del 6 agosto 1993, si estende su circa 70.000 ha e ricade per circa il 74 % della sua superficie nel settore Sud-occidentale delle Marche e per il restante 26 % nell'Umbria Sud-orientale. I territori comunali compresi nell'area protetta sono 16, inclusi quelli in cui sono state scelte le aree dove effettuare le analisi e i campionamenti (Regione Marche, 2019). Si tratta di un territorio eterogeneo (Castelnovi, 2002) dal punto di vista fisico, biologico e insediativo, caratterizzato da ambiti diversificati negli aspetti geo-morfologici e vegetazionali. Gran parte del territorio del Parco è caratterizzato da valli strette e profonde, alle quali si intercalano ampi interfluvii articolati in dorsali e creste che raggiungono le quote massime in corrispondenza del Monte Vettore (2.476 m s. m.) e del Monte Priora (2.332 m s. m.) (Gentili, 2002).



Figura 13 - Parco nazionale dei Monti Sibillini

Sono oltre 1800 le specie floristiche presenti all'interno del parco, tra le quali la stella alpina dell'Appennino, l'anemone alpino, la silene a cuscinetto, il giglio martagone, l'uva orsina, il ginepro e numerose orchidee. Tra le specie arboree la roverella (*Quercus pubescens*), il carpino nero (*Ostrya carpinifolia*), orniello (*Fraxinus ornus*), il cerro (*Quercus cerris*), il carpino bianco (*Carpinus betulus*), il castagno (*Castanea sativa*), il leccio (*Quercus ilex*), il faggio (*Fagus silvatica*), l'acero montano (*Acer pseudoplatanus*) ([www.sibillini.net](http://www.sibillini.net)). Per quanto riguarda la fauna sono 50 le specie di mammiferi, tra cui il lupo, l'istrice, il gatto selvatico, la sempre più rara martora, l'arvicola delle nevi, il capriolo recentemente reintrodotta. Ben 150 le specie di uccelli, tra le quali l'aquila reale, il falco pellegrino, il gufo reale, l'astore, lo sparviero, la coturnice, il picchio muraiolo, il fringuello alpino, il gracchio corallino. Oltre 20 le specie di rettili e invertebrati: la vipera dell'Orsini e il chirocefalo del Marchesoni, il piccolo crostaceo che vive esclusivamente nel lago di Pilato. ([www.sibillini.net](http://www.sibillini.net)).

I Monti Sibillini offrono una grande varietà di paesaggi e forme. Questa diversità è il risultato di processi morfogenetici che continuamente modellano la superficie terrestre, generati da forze endogene, come i movimenti della crosta terrestre che creano le montagne, e forze esogene, come le acque superficiali, il vento, i ghiacciai e le frane. Un esempio di come l'attività tettonica e i processi esogeni interagiscano per creare paesaggi unici è il bacino di Castelluccio. Qui, la faglia del Monte Vettore-Monte Bove ha causato la crescita del Monte Vettore e l'approfondimento del bacino di Castelluccio. Nel frattempo, i processi morfogenetici fluvio-lacustri, gravitativi e di dissoluzione chimica hanno modellato la superficie terrestre per creare l'attuale paesaggio. L'erosione fluviale lungo le linee di frattura causate dai movimenti tettonici ha contribuito alla creazione di gole come quella del Fiastrone, della Valnerina e dell'Infernaccio. Allo stesso modo, l'azione dei ghiacciai ha modellato la superficie terrestre per creare circhi e valli glaciali con un tipico profilo a U come nella valle del lago di Pilato. Infine, l'erosione chimica delle rocce carbonatiche da parte delle acque meteoriche ha generato paesaggi caratterizzati da grotte, doline e inghiottitoi come l'Inghiottitoio dei Mergani ([www.sibillini.net](http://www.sibillini.net)).

**La Zona di Protezione Speciale “Parco Nazionale Gran Sasso – Monti della Laga”** (Fig. 14) è esteso su un’area di 143.311 ha, che coincide con l’omonima area protetta e interessa le regioni Abruzzo, Lazio e Marche. La porzione marchigiana è relativamente piccola estendendosi per 9.368 ha e comprende 4 aree SIC interamente: IT5340007 “San Gerbone”, IT5340008 “Valle della Corte”, IT5340009 “Macera della Morte” e IT5340010 “Monte Comunitore” ed altre 2 aree SIC solo parzialmente: IT5340012 “Boschi ripariali del Tronto” e IT5340018 “Fiume Tronto tra Favalanciata e Acquasanta”. La parte marchigiana, è caratterizzata da un paesaggio tipicamente montano con vette intorno ai 2.000 m di quota (Macera della Morte, 2073 m s.l.m.). Il substrato marnoso arenaceo ha favorito la conservazione di estese formazioni forestali, probabilmente le più importanti in regione, con ampi tratti di castagneto e faggeta. Le praterie, sia secondarie che primarie, sono molto meno diffuse ed interessano solo le porzioni sommitali del massiccio. Caratteristica è la presenza, a differenza di quanto avviene nei vicini Monti Sibillini, di numerosi piccoli corsi d’acqua e di cascate che scorrono sulle rocce impermeabili. L’area riveste un grandissimo interesse sia botanico vegetazionale che faunistico anche perché rappresenta l’elemento di continuità tra l’Appennino umbro-marchigiano e quello abruzzese (RETE NATURA 2000).

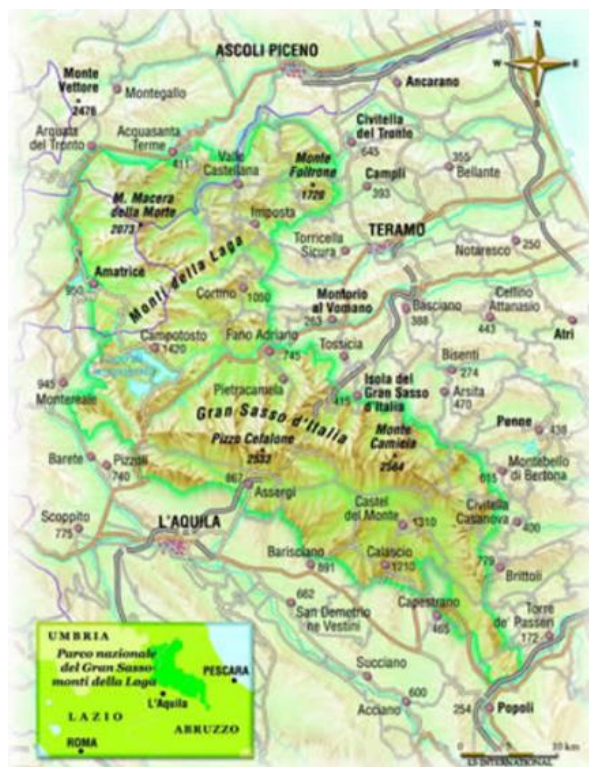


Figura 14 - Parco nazionale del Gran Sasso monti della Laga

Il Parco dei Monti della Laga presenta 2364 specie arboree ed erbacee censite che lo rendono una delle aree protette con la maggiore biodiversità in Europa; tra queste 139 sono endemiche italiane, 12 endemiche del parco, 73 protette da convenzioni internazionali, 67 protette da leggi regionali, 59 orchidee spontanee e 2 piante carnivore. Specie floristiche di grande interesse naturalistico si rinvencono anche nei campi coltivati secondo tecniche tradizionali, come il *gittaione*, il *fiordaliso*, entità floristiche rarissime come la *Falcaria comune*, la *Ceratocephala* e l'*androsace maggiore*. Tra i 1000 e i 1800 mt di altitudine, si estendono le faggete, cui si associano il tasso e l'agrifoglio, mentre aceri, tigli, frassino ed olmo montano rivestono le forre. I Monti della Laga rivelano anche preziosi nuclei di abete bianco e di betulla, mentre tra i boschi ed i pascoli d'altura, un'atmosfera nordica viene evocata dalla presenza di un'estesa brughiera a mirtillo. Sul versante faunistico, l'animale simbolo del Parco è il camoscio appenninico che è stato reintrodotta e ad oggi conta circa 500 esemplari, in seguito troviamo il cervo, il camoscio e il lupo appenninico. Sono presenti, inoltre: la martora, il gatto selvatico, il tasso, la faina, la puzzola, l'istrice, mentre alle alte quote vive l'arvicola delle nevi, un piccolo roditore, relitto dell'ultima glaciazione. L'avifauna vede la presenza di rapaci rari come: l'aquila reale, l'astore, il falco pellegrino, il lanario, il gufo reale; il fringuello alpino, lo spioncello, la pispola, la coturnice, il corvo imperiale, il gracchio alpino e quello corallino. Sono inoltre presenti molti anfibi endemici come la *Salamandrina di Savi*, il *Geotritone italico* ed il *tritone alpestre* ([www.gransassolagapark.it](http://www.gransassolagapark.it)).

Morfologicamente il parco comprende tre gruppi montuosi: la catena del Gran Sasso d'Italia, il massiccio della Laga e i Monti Gemelli. La catena del Gran Sasso, costituita principalmente da calcari e dolomie, presenta un aspetto maestoso con pareti verticali. La natura calcarea delle rocce favorisce la formazione di fenomeni carsici come doline, inghiottitoi, conche, grotte, gole e forre. La catena del Gran Sasso ospita l'unico ghiacciaio appenninico, il Calderone. I Monti della Laga sono costituiti da arenarie e marne e presentano cime più arrotondate rispetto alla catena del Gran Sasso. La natura geologica di queste montagne influenza la loro morfologia, caratterizzata da numerose valli incise e profonde. Grazie alla costituzione marnoso-arenacea, l'acqua scorre impetuosa in superficie, raccogliendosi in ruscelli, torrenti e fiumi che formano numerosissime cascate ([www.gransassolagapark.it](http://www.gransassolagapark.it)).

### 3.2 Le zone protette e Rete Natura 2000

La direttiva n. 92/43/CEE del Consiglio del 21 maggio 1992, relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche, comunemente denominata direttiva “Habitat” e la direttiva n. 2009/147/CE del Consiglio del 30 novembre 2009 denominata direttiva “Uccelli”, relativa alla conservazione degli uccelli selvatici, contribuiscono a salvaguardare la biodiversità attraverso l’istituzione della rete ecologica europea “Natura 2000”, formata da siti di rilevante valore naturalistico denominati Zone Speciali di Conservazione (ZSC), Siti di Importanza Comunitaria (SIC) e Zone di Protezione Speciale (ZPS) (Giunta regionale n. 356, in data 23/03/2015).

Le ZPS sono siti proposti a norma della direttiva Uccelli, mentre SIC e ZSC sono siti designati a norma della direttiva Habitat (Fig. 15) (Parco Nazionale dei Monti Sibillini, 2022).

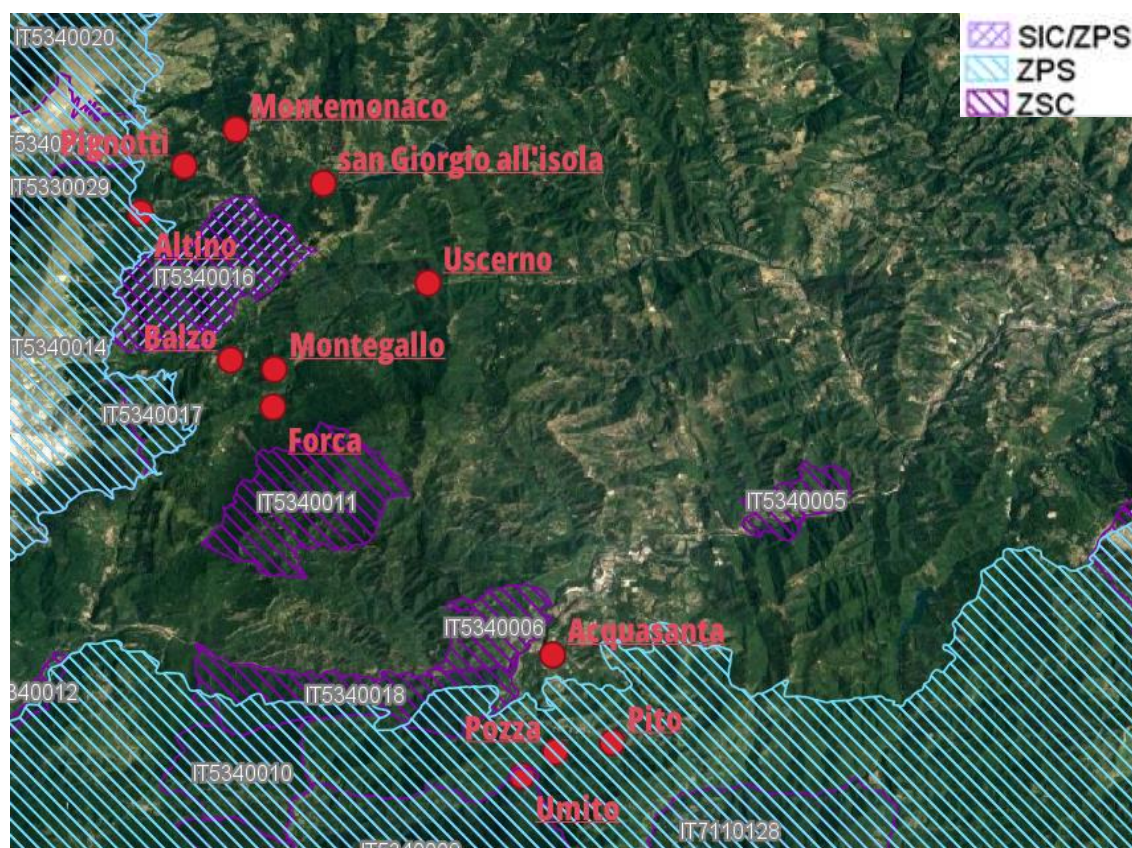


*Figura 15 - Zone protette (rete Natura 2000) nei comuni di Montemonaco, Montegallo ed Acquasanta Terme.*

Nelle aree del comprensorio dei Monti Sibillini, i comuni di Montegallo e Montemonaco appartengono all'area "SIC – ZPS cod. IT5340016 MONTE OIALONA E COLLE PROPEZZANO" per la superficie complessiva di 969 ha e il comune di Arquata del Tronto in "SIC cod. IT5340012 BOSCHI RIPARIALI DEL TRONTO" per una superficie di 153 ha. Gli habitat presenti (Fig. 16) sono:

- **6210\*** - Formazioni erbose secche seminaturali e facies coperte da cespugli su substrato calcareo (*Festuco-Brometalia*) (\*stupenda fioritura di orchidee): Praterie secondarie polispecifiche perenni da aride a semimesofile, a dominanza di graminacee emicriptofitiche, con una componente camefitica più o meno consistente, sviluppate su substrati calcarei e calcareo-marnosi, nei piani collinare e montano.

- **91E0\*** - Foreste alluvionali di *Alnus glutinosa* e *Fraxinus excelsior* (*Alno-Padion*, *Alnion incanae*, *Salicion albae*): boschi meso-igrofilo di ontano nero (*Alnus glutinosa*), frassino maggiore (*Fraxinus excelsior*) e salice bianco (*Salix alba*), cui possono associarsi pioppo nero (*Populus nigra*) e olmi (*Ulmus minor*, *U. glabra*), con strato arbustivo poco sviluppato, composto prevalentemente da sambuco nero (*Sambucus nigra*), sanguinella (*Cornus sanguinea*) e rovi (*Rubus ulmifolius*, *R. caesius*).

- **92A0** - Foreste a galleria di *Salix alba* e *Populus alba*: Boschi igrofilo ripariali a dominanza di *Salix alba*. e/o *Populus* sp. pl., cui si associano *Sambucus nigra*, *Fraxinus oxycarpa* ed *Ulmus minor*, con *Cornus sanguinea*, *Salix purpurea*, *Euonymus europaeus*, *Rubus ulmifolius* tra gli arbusti e strato lianoso composto da *Humulus lupulus*, *Vitis vinifera* s.l., *Clematis vitalba*, *Hedera helix* e, nelle aree a bioclimate mediterraneo, *Rubia peregrina*.

- **5130** - Formazioni a *Juniperus communis* su lande o prati calcicoli: Formazioni arbustive a dominanza di ginepro comune (*Juniperus communis*), spesso aperte, che formano un mosaico con le fitocenosi di prateria. Al ginepro spesso si associano altre specie arbustive, tra cui *Rosa* sp. pl., *Crataegus monogyna*, *Prunus spinosa*, *Rubus* sp. pl. Si sviluppano in prevalenza su substrati calcarei nei piani collinare e montano, su suoli relativamente profondi e freschi.

*Quercus-Fagetea* Br. -Bl. & Vlieger in Vlieger 1937:

-*Lathyro veneti-Fagetum sylvaticae* Biondi, Allegrezza, Pinzi, Casavecchia et Baldoni 2002 e *Hieracio racemosi-Fagetum sylvaticae* Allegrezza 2003 (alleanza *Geranio versicoloris-Fagion sylvaticae* Gentile 1970);

-*Solidagini-Fagetum sylvaticae* (Longhitano et Ronsisvalle 1974) Ubaldi et al. 1987 ex Ubaldi 1995 e *Dactylorhiza fuchsii-Fagetum sylvaticae* Biondi, Ballelli, Allegrezza, Taffetani et Gujtian 1989 ex Izco et Biondi 1992 (alleanza *Aremonio-Fagion sylvaticae*);

- *Cardamino kitaibelii-Fagetum sylvaticae* Ubaldi, Zanotti, Puppi, Speranza et Corbetta ex Ubaldi 1995 (alleanza *Aremonio-Fagion sylvaticae* Horvat 1938, Torok, Podani et Borhidi 1989.

- **9260** -l'habitat di interesse della seguente tesi: Foreste umide di castagno (*Castanea sativa*), regolate da pratiche di taglio rinnovato o gestite come alberature ad alto sviluppo, occasionalmente con alberi secolari, favoriti dall'intervento umano. Si sviluppano su terreni che variano da neutrali ad acidi (calcarei decalcificati, calcari con selce, arenarie), su suoli profondi e freschi, nelle zone collinari superiori e montane inferiori. Queste sono foreste miste con una presenza abbondante di castagno e castagneti promossi dall'uomo per scopi produttivi (frutta e legname), con una copertura erbacea costituita principalmente da specie appartenenti alla classe *Quercus-Fagetea*, una condizione che di solito si verifica quando le chiome degli alberi da frutto sono abbastanza vicine ma non si sovrappongono. Al castagno si uniscono, nel sottobosco arboreo, *Quercus cerris*, *Ostrya carpinifolia*, *Carpinus betulus*, *Fagus sylvatica*, *Fraxinus excelsior*, *Acer opalus* subsp. *obtusatum*, *A. campestre*, *A. pseudoplatanus* e *Prunus avium*. *Corylus avellana*, *Sorbus torminalis*, *S. domestica*, *Cornus sanguinea*, *Juniperus communis*, *Crataegus monogyna*, *Rubus hirtus*, *Emerus majus* subsp. *emeroides* sono le specie più comuni nel sottobosco arbustivo, mentre il sottobosco erbaceo è caratterizzato da specie come *Anemone nemorosa*, *Brachypodium sylvaticum*, *Carex digitata*, *Dactylorhiza maculata* subsp. *fuchsii*, *Festuca heterophylla*, *Hieracium racemosum*, *H. sabaudum*, *H. sylvaticum*, *H. virgaurea*, *Listera ovata*, *Luzula forsteri*, *L. sylvatica*, *Melica uniflora*, *Platanthera chlorantha*, *Polygonatum multiflorum*, *P. odoratum*, *Pteridium aquilinum*, *Pulmonaria apennina*, *Salvia glutinosa*, *Sanicula europaea*, *Viola alba* subsp. *dehnhardtii* e *V. reichenbachiana*.

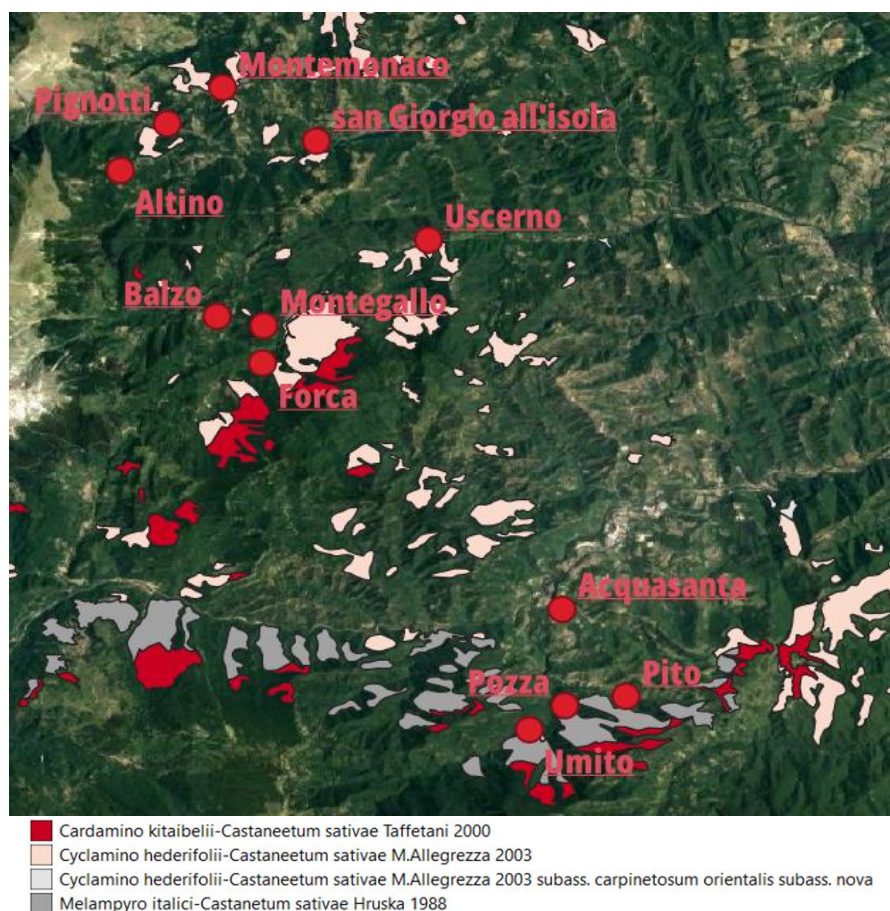


Figura 16 - Associazioni presenti nei comuni di Montemonaco, Montegallo ed Acquasanta.

### 3.3 Monitoraggio fitosanitario

Tra maggio e giugno del 2023 è stato effettuato un rilievo fitosanitario delle piante di castagno all'interno di 11 aree studio (Ar1-Ar11); tali aree sono state scelte come aree pilota per il progetto INKAS. Il rilievo fitosanitario è consistito nel verificare la presenza di sintomi di malattia (fersa, oidio, cancro corticale, mosaico del castagno, marciumi radicali, carie del legno) riconducibili ai principali agenti patogeni. Per la valutazione della presenza di mal dell'inchiostro sono stati considerati alcuni parametri aspecifici (ingiallimento chioma, microfilia, necrosi dei tessuti) e altri specifici (necrosi a fiamma e produzione di essudati scuri). Per quanto riguarda l'ingiallimento della chioma e la percentuale di tessuto morto è stato effettuato un rilievo più approfondito in cui sono state stabilite 4 classi patometriche che prevedevano: 0= pianta priva di ingiallimenti, 1 = fino a 30%, 2 = da 31% al 50% e 3 = >50%; mentre per la percentuale di tessuto morto le classi sono 6: 0 = pianta priva di necrosi, 1 = fino al 10%, 2 = fino al 30%, 3 = dal 31 al

50%, 4= > 50% e 5 = pianta morta. Tali sintomi insieme alla presenza di necrosi a livello del colletto e presenza di essudati nerastri rappresentano degli indicatori attendibili della possibile infezione da *Phytophthora* spp.

Oltre alla valutazione fitosanitaria delle singole piante, su cui è stato apposto un cartellino per il riconoscimento dell'individuo, è stato misurato il diametro ad 1,30 m mediante cavalletto dendrometrico o rotella metrica, a seconda della dimensione.



Figura 17 - (a) Cordella metrica, (b) cartellino con sito e numero di pianta, (c) cavalletto dendrometrico, (d) bomboletta spray, (e) scheda di valutazione fitosanitaria.

Sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- rotella metrica (Fig. 17a): metro a nastro in metallo che è stato utile per la misurazione della circonferenza dei singoli alberi
- cartellini identificativi (Fig. 17b)
- Cavalletto dendrometrico (Fig. 17c): per la misurazione dei diametri
- bomboletta vernice spray (Fig. 17d) e successivamente apposti cartellini: utilizzati per marcare ogni pianta allo scopo di facilitare il riconoscimento per futuri rilievi
- Scheda di rilevamento per la registrazione dei dati per ogni singolo campione (Fig. 17e)

### 3.4 Raccolta dei campioni di suolo

Per ognuno dei siti monitorati sono stati prelevati campioni di suolo e di corteccia. Per la raccolta dei campioni, di suolo e radici, abbiamo utilizzato buste di plastica trasparenti per alimenti, su cui è stata apposta specifica etichetta per identificare il campione (Fig. 18a), che è stato prelevato mediante una piccola vanga e un piccolo rastrello. Per una corretta raccolta del campione di suolo, in corrispondenza della pianta selezionata, 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. Raggiunte le radici è stato raccolto circa 1 kg di suolo corrispondente alla rizosfera. In un sacchetto “gemello” è stato raccolto un campione di radici, prevalentemente assorbenti, in modo da poter fare analisi micologiche specifiche.

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. L’intera operazione di campionamento di suolo e radici ha portato alla raccolta di 24 campioni.

### 3.5 Isolamento di *Phytophthora* mediante tecnica baiting

Per isolare *Phytophthora* da campioni di suolo ci si è avvalsi della tecnica del baiting. Ogni campione di suolo (300 g) (Fig. 18b) è stato posto all’interno di recipienti successivamente riempiti con acqua distillata (2 litri). Dopo aver atteso che il suolo sedimentasse sul fondo del contenitore e dopo aver ripulito il pelo libero dell’acqua da residui galleggianti in superficie sono state aggiunte numerose foglie molto tenere di specie diverse, che fungessero da attrattivo e trappola per le zoospore e/o zoosporangi di *Phytophthora* presenti nel suolo. Per favorire la risalita e la colonizzazione da parte dell’organismo sono state utilizzate foglie giovani in quanto sono più appetibili per il patogeno. Le specie e i rispettivi organi utilizzati sono stati: *Rosa sempervirens* (petali), *Sambucus nigra* (foglie), *Vitis* (foglie), *Parthenocissus tricuspidata* (foglie), *Quercus robur* (foglie), *Q. suber* (foglie), *Persea americana* (foglie), *Castanea sativa* (foglie) e *Fraxinus ornus* (foglie).

Una volta messe le foglie sulla superficie dell'acqua aggiunta, i campioni sono stati lasciati a riposo per circa 2 gg (fino a max 5 gg) in attesa della comparsa di macchie necrotiche che indicassero la positività del campione.

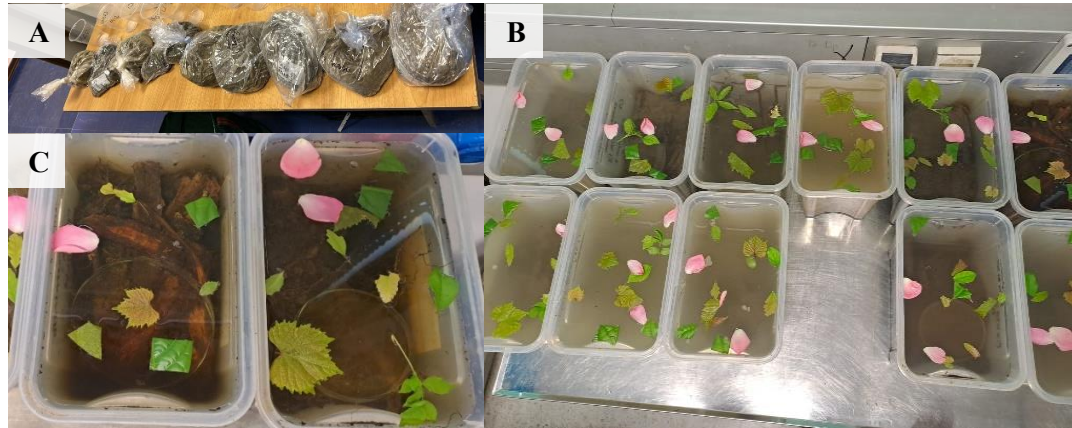


Figura 18 - Tecnica del baiting utilizzata per l'isolamento di *Phytophthora*.

Una volta passati due giorni sono state controllate le foglie, prelevate quelle che presentavano evidenti necrosi (Fig. 19b), lavate con acqua distillata e frammentate in porzioni più piccole e sono state inserite all'interno della piastra Petri contenenti il terreno di coltura selettivo per il patogeno (Fig. 19a).

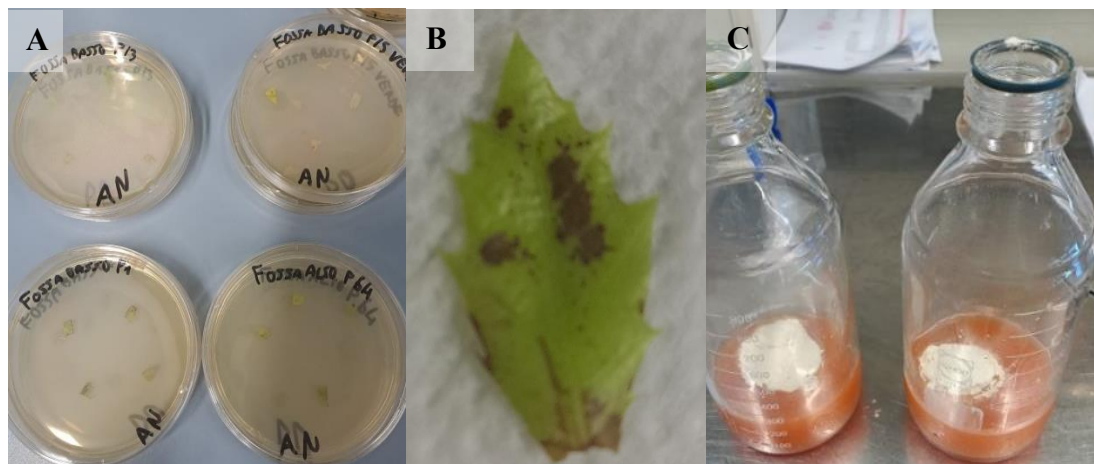
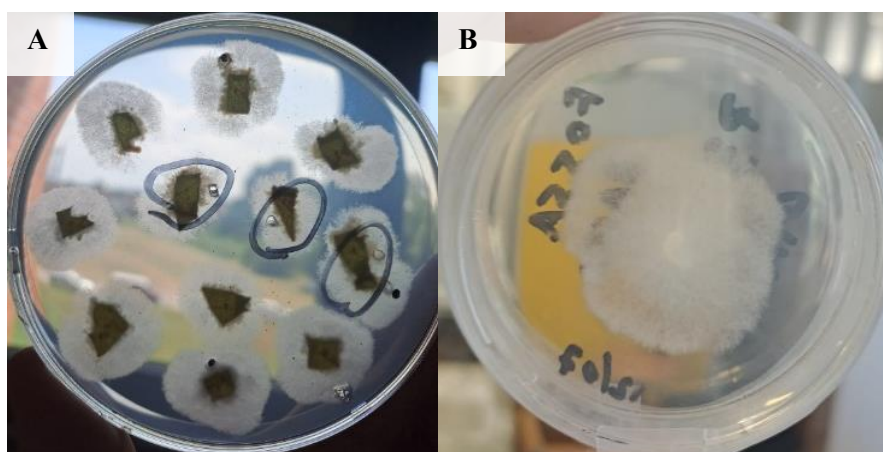


Figura 19 - (a) Piastre Petri con frammenti di foglia, (b) foglia prelevata da una bacinella con evidenti macchie necrotiche, (c) succo di carota con agar per produrre il substrato.

Il terreno di coltura (carrot agar) è selettivo ed è stato preparato utilizzando (Fig. 19c): 200 ml di succo di carota, 30 g di PDA, circa 800 ml di acqua distillata. Una volta

ottenuto il carrot-agar è stato sterilizzato in autoclave per 15 minuti a 121 gradi. Quando ha raggiunto la temperatura di circa 50°C è stata aggiunta una soluzione antibiotica costituita da 0,013 g/litro di Pimaricina e 0,05 g/litro di Hymexazolo.

Una volta inseriti i frammenti di foglie su substrato selettivo sono state lasciate a incubare per 12 h in termostato a 20°C, temperatura ottimale per lo sviluppo del patogeno. Alcune problematiche riscontrate in questa fase sono imputabili a contaminazione da batteri che nonostante il substrato selettivo in certi casi hanno impedito lo sviluppo di *Phytophthora*. Alle 12 h ciascun frammento di foglia è stato osservato allo stereomicroscopio in modo da verificare la presenza di ife caratteristiche di *Phytophthora* (Fig. 20a) e successivamente sotto cappa a flusso laminare mediante ansa sterile è stato prelevato un tassello contenente il micelio allo stadio iniziale e trasferito su nuove piastre per ottenere una colonia pura. Le colonie allevate in coltura pura (Fig. 20b) sono state osservate e verificati i caratteri morfologici sia macroscopici che microscopici, ipotizzandone l'identità.



### 3.6 Diagnosi molecolare

L'identità delle diverse specie di *Phytophthora* isolate, dopo essere stata ipotizzata mediante analisi morfologica, è stata verificata attraverso l'amplificazione genica e il successivo sequenziamento dell'intera regione degli spaziatori interni trascritti (ITS1 e ITS2) incluso il gene 5.8S del rDNA. L'estrazione del DNA è stata effettuata, partendo dalla polverizzazione in azoto liquido del micelio da colonie pure allevate su PDA di 4-7 giorni di età, utilizzando il kit Instagene Matrix (BioRad Laboratories, Hercules, CA), seguendo le istruzioni della casa produttrice. Gli estratti sono stati quindi conservati a -

20°C fino al loro successivo utilizzo. Con la reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata amplificata la regione ITS utilizzando i primers universali ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). La reazione è stata realizzata in un volume totale di 50 µl contenente: 18,7 µl di H<sub>2</sub>O, 10 µl di Buffer 5×, 5 µl di dNTPs, 5 µl di BSA, 5 µl di ciascun primer, 0,3 µl di GoTaq polymerase (Promega) e 1 µl di DNA. La reazione di amplificazione è stata eseguita all'interno di un termociclatore (Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler), utilizzando i cicli termici riportati da (Linaldeddu *et al.* 2013). Aliquote di 5 µl di ciascun prodotto di amplificazione e dello standard costituito dal 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™) sono stati fatti migrare mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% in tampone TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3), usando come tracciante molecolare il SYBR-Safe (Invitrogen™). La dimensione degli ampliconi (pb) così come la loro concentrazione (ng/µl) è stata determinata attraverso il Gel documentation systems, VWR® Imager2. I prodotti PCR sono stati quindi purificati utilizzando il Kit EUROGOLD Gel Extraction (EuroClone), seguendo le istruzioni riportate dalla casa produttrice. I purificati sono stati quindi quantificati e una aliquota è stata spedita presso i laboratori della BMR Genomics s.r.l. ([www.bmr-genomics.it](http://www.bmr-genomics.it)), spin-off dell'Università di Padova per essere sequenziati. Gli elettroferogrammi delle sequenze ottenute sia in forward che in reverse sono stati letti separatamente e poi confrontati, al fine di ottenere una sequenza consenso attraverso il programma FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc.; <http://www.geospiza.com/finchtv>). La sequenza consenso di ciascun isolato è stata infine confrontata con le sequenze disponibili nel database online GenBank utilizzando il programma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). La sistematica delle specie di *Phytophthora* è stata chiarita attraverso l'analisi filogenetica delle sequenze ITS dell'rDNA. Le sequenze sono state allineate utilizzando il programma ClustalX v 1.83 (Thompson *et al.*, 1997), con i seguenti parametri: pairwise alignment parameters (gap opening = 10, gap extension = 0,1) e multiple alignment parameters (gap opening = 10, gap extension = 0,2, transition weight = 0,5, delay divergent sequences = 25 %). La ricostruzione filogenetica è stata eseguita secondo il principio della massima verosimiglianza o Maximum Likelihood (Felsenstein, 1981) utilizzando il programma MEGA-X (Kumar *et al.*, 2016). All'analisi è stato applicato il general time- reversible model (Rodriguez *et al.*, 1990), che include la stima dei siti invariabili assumendo una distribuzione gamma discreta con sei categorie (GTR + G + I). Tutti i gaps sono stati

inclusi nelle analisi. La robustezza degli alberi ML è stata testata tramite 1000 repliche di bootstrap (Felsenstein, 1985).

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

I dati climatici presi in considerazione sono quelli misurati nell'arco degli ultimi 30 anni, registrati ed elaborati dall'AMAP, riguardanti la stazione meteorologica di Montefortino (FM), situata nelle vicinanze delle diverse aree studio (Fig. 21). Per quanto riguarda le precipitazioni, queste sono maggiormente concentrate nei mesi invernali e primaverili, con massima incidenza di eventi piovosi nei mesi di novembre, aprile e marzo in cui le precipitazioni medie sono rispettivamente di 140, 120 e 115 mm. Le temperature medie mensili oscillano da 2,8 a 13,6 °C da gennaio a maggio e diminuiscono in media da 15,6 e 3,7 °C da settembre a dicembre. Il picco è registrato nel mese di luglio con 21,2 °C. Si è osservato inoltre che l'andamento climatico è in costante cambiamento in quanto la quantità di anni 'speciali' è aumentata e con essa anche le problematiche relative a stress climatici. Le stagioni vegetative del 2006, 2007 e 2011 risultano più secche della media e questo ha compromesso la tolleranza delle piante a che sono risultate più suscettibili ad attacchi parassitari.

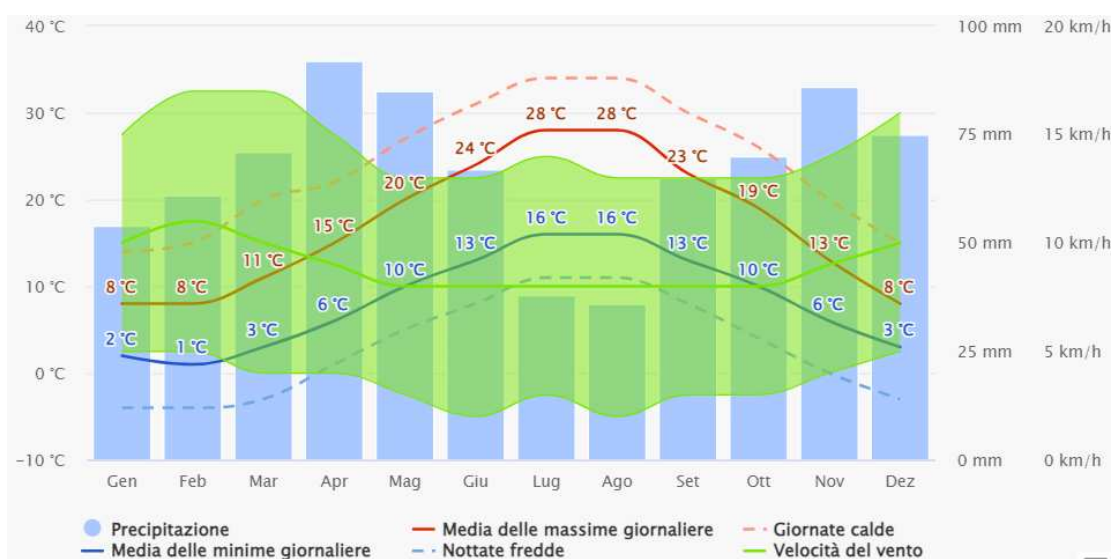


Figura 21 - Andamento climatico (media delle precipitazioni e temperature medie mensili, velocità del vento, linee di massima e di minima delle temperature) registrato presso la stazione meteorologica di Montefortino.

Dai rilievi effettuati tra maggio e giugno 2023 (**Tab. 1**) è stato analizzato lo stato fitosanitario di 605 individui ripartiti in 11 aree studio. Dall'analisi complessiva dei dati è emerso che nelle 11 aree pilota delle Marche, nei castagneti è presente in modo

particolare il cancro corticale del castagno (39,8%), causato da *C. parasitica* e il mal dell'inchiostro del castagno con la presenza di 190 piante che mostravano necrosi a fiamma e 60 piante con produzione di essudati. Per quanto riguarda il cancro corticale è stato possibile distinguere due tipologie di cancri (virulenti attivi e ipovirulenti cicatrizzati) (Turchetti e Maresi, 2010; Rigling e Prospero, 2018).

Tabella 1 - Quadro epidemiologico completo delle aree studio

|             | NUMERO DI PIANTE SINTOMATICHE E CON PRESENZA DI ALTRE PROBLEMATICHE FITOSANITARIE |                  |       |          |                  |         |          |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------|----------|------------------|---------|----------|
| AREA STUDIO | INDIVIDUI                                                                         | NECROSI A FIAMMA | OIDIO | CINIPIDE | CANCRO CORTICALE | MOSAICO | ESSUDATI |
| A1          | 83                                                                                | 21               | 1     | 0        | 31               | 10      | 7        |
| A2          | 29                                                                                | 7                | 0     | 0        | 11               | 3       | 1        |
| A3          | 66                                                                                | 23               | 0     | 0        | 41               | 2       | 15       |
| A4          | 16                                                                                | 4                | 0     | 0        | 0                | 0       | 0        |
| A5          | 94                                                                                | 48               | 0     | 0        | 65               | 17      | 10       |
| A6          | 104                                                                               | 35               | 1     | 0        | 67               | 14      | 4        |
| A7          | 25                                                                                | 14               | 0     | 0        | 24               | 2       | 3        |
| A8          | 39                                                                                | 0                | 0     | 11       | 1                | 0       | 0        |
| A9          | 56                                                                                | 1                | 0     | 0        | 0                | 0       | 0        |
| A10         | 45                                                                                | 20               | 0     | 0        | 1                | 3       | 11       |
| A11         | 48                                                                                | 17               | 1     | 1        | 0                | 4       | 9        |
|             | 605                                                                               | 190              | 3     | 12       | 241              | 55      | 60       |

*Cryphonectria parasitica* ceppo virulento, attacca la corteccia dei tronchi e dei rami andando a conferire inizialmente una colorazione rossastra e un aspetto depresso che porta poi a una fessurazione longitudinale. Allorché il fungo ha colonizzato tutta la circonferenza di un tronco o di un ramo, la porzione distale della parte colpita dissecca. Al di sotto del cancro l'albero reagisce emettendo rametti epicormici. La tipologia di cancri più ricorrente è stata quella ipovirulento cicatrizzato, caratterizzato da lesione cancerosa superficiale che non determina alcun danno alla pianta (Murolo *et al.*, 2018).

L'altra malattia individuata con maggiore frequenza è il mal dell'inchiostro del castagno, causato da *Phytophthora* spp. I sintomi sono stati riscontrati sulla chioma sotto forma di ingiallimento diffuso, microfillia e disseccamenti di porzione del cimale. Su alcune piante sono stati riscontrati improvvisi disseccamenti di parti della chioma, con persistenza di foglie secche e presenza di polloni con evidenti sintomi di necrosi a fiamma al colletto e che tendono a disseccare, dimostrando chiaramente che l'apparato radicale è

insofferenza perché infetto (Montecchio, 2010). Scortecciando il colletto, in corrispondenza delle necrosi, è stato possibile osservare una alterazione cromatica dei tessuti cambiali e dell'alburno causata dall'ossidazione dei tannini a opera degli enzimi secreti dal micelio patogeno. Questa area nerastra sottocorticale, a forma di fiammata, accompagnata dalla produzione di essudati scuri, è stata riscontrata in diverse piante a partire dalla base del colletto per raggiungere anche gli 80 cm di altezza (Cristinzio *et al.*, 2005).

Di seguito si riporta la situazione fitosanitaria registrata nelle 11 aree studio e in particolare la presenza di mal dell'inchiostro del castagno e l'identificazione morfologica e molecolare degli agenti coinvolti.

### Area di studio A1 – Montemonaco (AP)

A1 è situata nel comune di Montemonaco (AP) a un'altitudine che va dai 900 ai 980 m.s.l.m. la zona è raggiungibile facilmente da una strada che parte direttamente dal paese e questo rende la gestione meno complessa. Le piante su cui è stata effettuata l'analisi sono 83 e vanno a coprire parte del castagneto che è di diversi proprietari. Il diametro medio delle piante è di 50 cm (Fig. 22) anche se non tutte le piante sono state misurate a causa della posizione e della dimensione; hanno un'età stimata che oscilla tra i 35 ed i 155 anni con la maggior parte degli individui che ha circa 115 anni (Fig. 22).

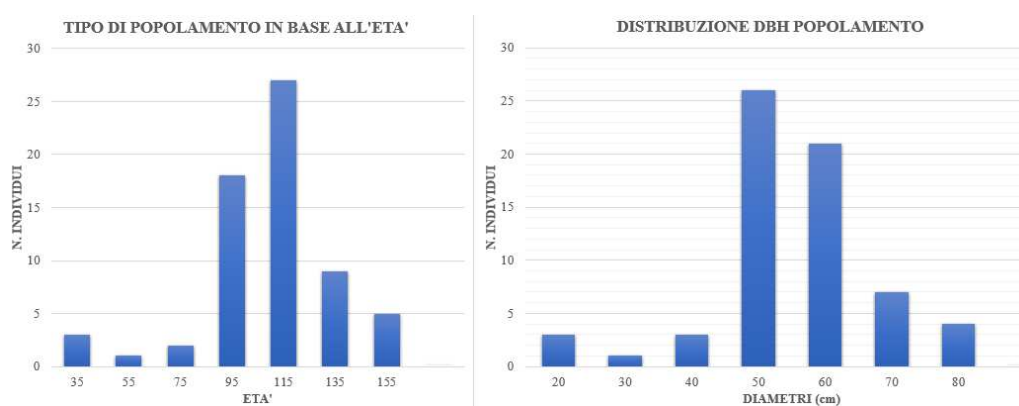


Figura 22 - Distribuzione in base all'età e al diametro di castagni coltivati a Montemonaco.

Il rilievo fitosanitario effettuato (Fig. 23) ha mostrato che il 44% delle piante monitorate presentavano cancri corticali, la maggior parte dei quali di tipo ipovirulento, una percentuale bassa mostrava attacchi di oidio (2%). Il 14% delle piante presentavano

sintomi ascrivibili al virus del mosaico del castagno. Il 40% delle piante mostrava sintomi ascrivibili a mal dell'inchiostro (necrosi a fiamma e d essudati), accompagnati da sintomi aspecifici come ingiallimento della chioma (58%) e disseccamento di porzioni di cimale

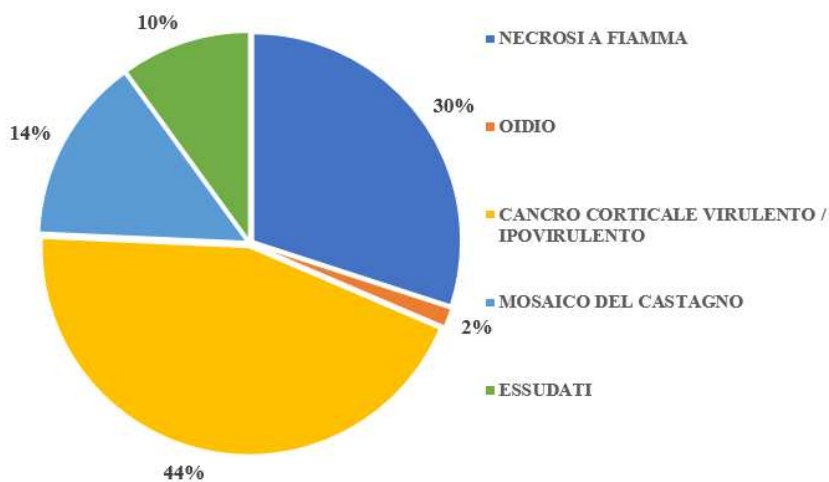


Figura 23 – Principali quadri sintomatologici rilevati nell'area di Montemonaco.

(100%).

Grazie alla tecnica del baiting, è stato possibile isolare in purezza, identificare da un punto di vista morfologico e molecolare *P. cambivora* (4 isolati) e *P. plurivora* (2 isolati) (Fig. 24). *P. plurivora* è un organismo identificato per la prima volta da Schena *et al.* (2020) su conifere in Germania. Questa specie può causare un forte deperimento delle radici e del colletto che a sua volta genera un indebolimento generalizzato della pianta. Le radici colpite dal patogeno spesso mostrano necrosi diffuse e tessuti scuri e marcescenti. Inoltre, è fortemente correlata alla produzione di essudati scuri che fuoriescono dai tessuti infetti (Prospero *et al.*, 2014).

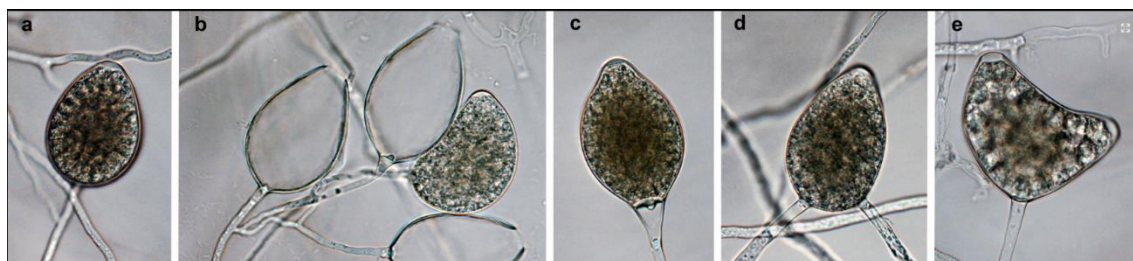


Figura 24 - sporangi semipapillati maturi formati su agar V8 inondato con estratto di terreno: (a) ovoidale, (b) sporangio maturo inserito lateralmente con apice marcatamente ricurvo e simpodio denso di sporangia ovoidali vuoti, (c) limoniforme con base affusolata, (d) ovoide, intercalare inserito, (e) sporangio maturo bipapillato; barra della scala = 25 µm; foto di T. Burgess).

## Area di studio A2 – Altino di Montemonaco (AP)

A2 è situata ad Altino di Montemonaco (AP), presenta una morfologia particolare in quanto parte del castagneto è in piano mentre la porzione più estesa è caratterizzata da una pendenza molto elevata (30%). All'interno di questa area studio sono state censite tutte le 30 piante della particella caratterizzate da un diametro medio di 30 cm (Fig. 25); presentano una struttura disetanea con un'età media di 60 anni con individui che raggiungono i 180 anni.

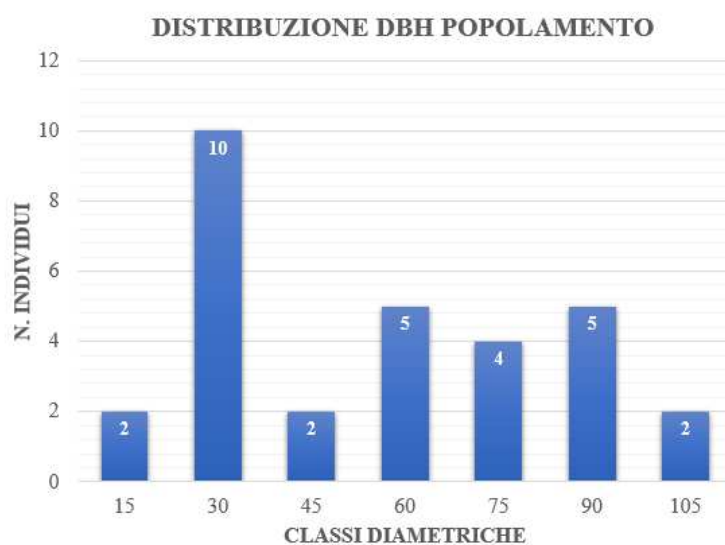


Figura 25 - Distribuzione in base al diametro di castagni coltivati a Montemonaco sito A2

Il rilievo fitosanitario ha mostrato che il 92% degli individui non presentano ingiallimenti fogliari ma la percentuale di tessuto morto è presente sull'80% delle piante (il 52% di questi solo sul 10% della chioma), delle 2 piante morte presenti una mostra la necrosi a fiamma. Undici individui presentano il cancro corticale e sette la necrosi a fiamma, mentre l'oidio ed il cinipide risultano assenti (Fig. 26). La diffusione dell'antagonista mediante lanci di *Torymus sinensis* negli anni passati ha reso la problematica del cinipide quasi assente in tutte le Marche anche se una debilitazione prolungata degli individui potrebbe causare un aumento dei casi a lungo termine. Il mosaico del castagno risulta presente sul 14% degli individui e non ha una grande rilevanza in quanto la malattia non sembra avere almeno in questo sito un impatto negativo.

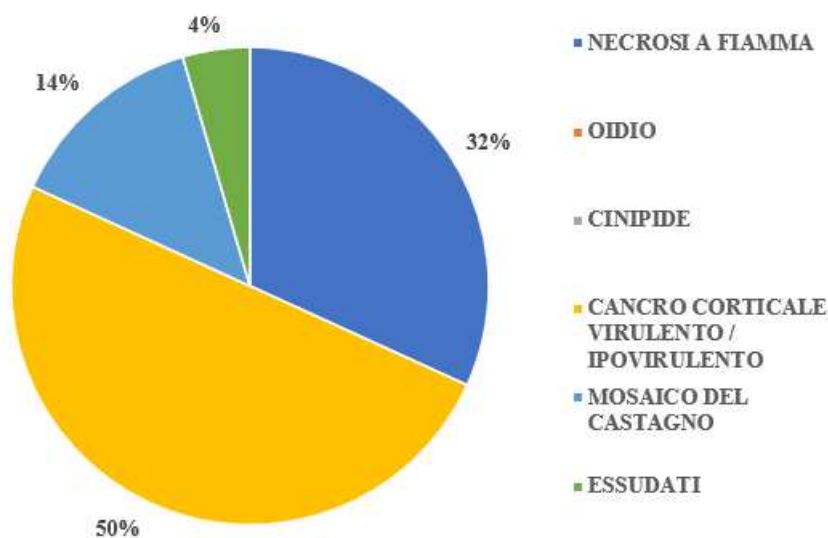


Figura 26 - Quadro sintomatologico delle piante rilevate nell'area di Altino di Montemonaco

Dal baiting, è stata isolata in purezza *Phytophthora pseudocryptogea* che è stata identificata e descritta per la prima volta nel 1928 da Waterhouse G. M., un fitopatologo australiano. Questo patogeno è fortemente cosmopolita ed è in grado di infettare una vasta gamma di specie di piante andando a causare una necrosi diffusa sia delle radici che sul colletto determinando necrosi a fiamma e progressivo deperimento dell'individuo. È caratterizzata da un micelio bianco e filamentoso con sporangi di forma sferica o ellissoidale che possono contenere un gran numero di spore: possono essere incolori oppure leggermente colorati, a seconda delle condizioni di crescita. Presenta delle spore biflagellate in grado di muoversi spontaneamente in ambiente acquatico (lunghe circa 25  $\mu$ m). Durante la germinazione delle spore, può formarsi una struttura prominente chiamata papilla all'estremità della spora, che funge da punto di ancoraggio per il tubetto germinativo (Safaiefarahani *et al.*, 2015).

### Area di studio A3 – Montegallo (AP)

A3 è situata nel comune di Montegallo a 870 m.s.l.m facilmente raggiungibile da strade forestali. La particella è separata dalle altre da una recinzione ed è un castagneto di facile percorrenza non avendo una giacitura particolarmente inclinata. Le piante

presentano un DBH medio di 50 cm (Fig. 27) con alcuni individui che però superano il metro e mezzo; l'età stimata oscilla tra i 50 anni fino a superare i 250 anni.

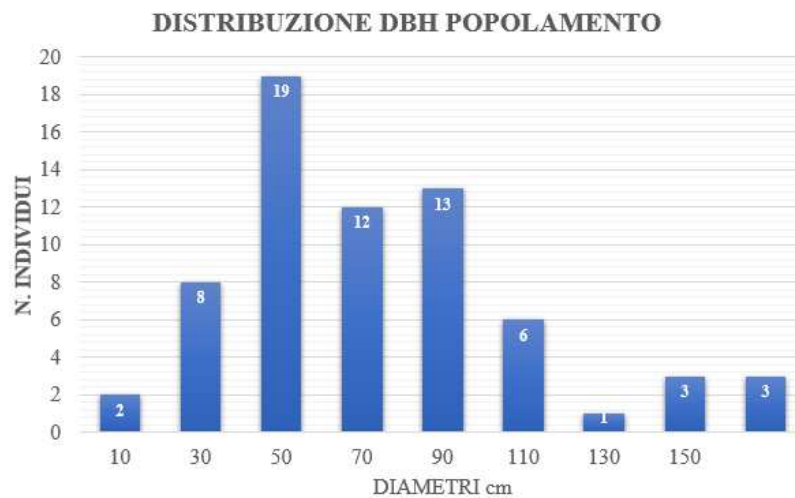


*Figura 27 - Distribuzione in base al diametro di castagni coltivati nell'area di studio di Montegallo*

Il quadro sintomatologico mostra una quasi totale assenza di ingiallimento della chioma riscontrato solo sul 6% degli individui. La percentuale di tessuto morto risulta presente invece sul 90% degli individui; il problema principale è che anche individui con un diametro estremamente ridotto presentano rami e branche secche: 4 individui sono disseccati per oltre il 50% e 6 sono morti. Il 51% del popolamento manifesta il cancro corticale e il 28% la necrosi a fiamma mentre gli essudati interessano il 19% delle piante dimostrando che il mal dell'inchiostro coinvolge buona parte della superficie (Fig. 28).

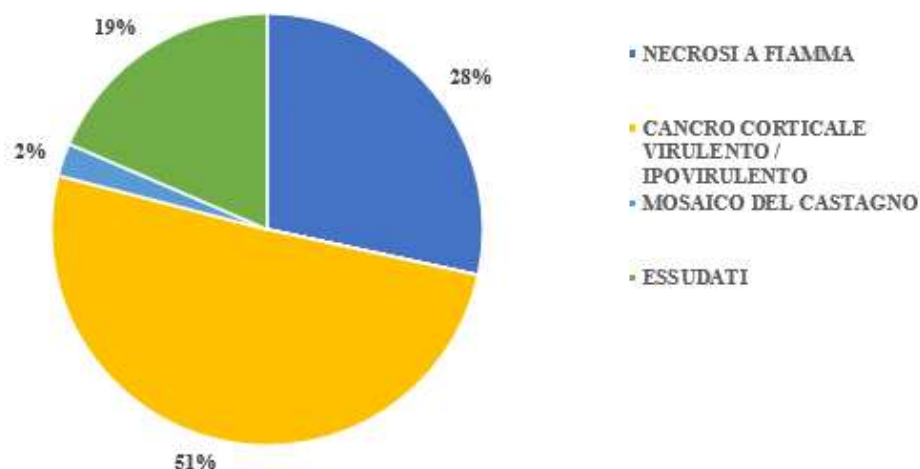


*Figura 28 - Percentuali di tessuto morto negli individui del popolamento.*

In questo sito, grazie al baiting e alla successiva identificazione morfologica è stata individuata *Phytophthora cactorum*, che è l'agente causale del marciume delle radici di alberi da frutto. Questo patogeno può causare gravi danni alle piante ospiti, in particolare agli alberi da frutto come mele, pere, ciliegie e anche il castagno. *P. cactorum* è stata scoperta e descritta per la prima volta nel 1878 da Berlese e De Toni, due micologi italiani. Il micelio tende a essere filamentoso e pallido e tende a svilupparsi rapidamente nelle radici e nel colletto delle piante ospiti; presenta sporangi sferici o leggermente ovati che contengono molte spore biflagellate, con dimensioni di circa 30/60 µm; in determinate condizioni può formare oospore, che sono spore di resistenza con una parete spessa (Schröt *et al.* 1889).

#### Area di studio A4 – Montegallo 2 (AP)

A4 è situato nel comune di Montegallo a un'altitudine leggermente maggiore rispetto al precedente, facilmente raggiungibile e quindi di facile manutenzione; ha una dimensione piuttosto ridotta e la particella presa in considerazione presenta 17 individui in cui sono state valutate solo la percentuale di tessuto morto e l'eventuale presenza di necrosi a fiamma. I soli 2 criteri di valutazione fitosanitaria evidenziati sono dovuti al fatto che il castagneto presenta individui in buone condizioni vegetative: il diametro medio è di 70 cm (Fig. 29), con un solo albero che raggiunge i 124 cm. L'età del popolamento stimata è 120 anni di media con 5 individui che hanno meno di 100 anni.

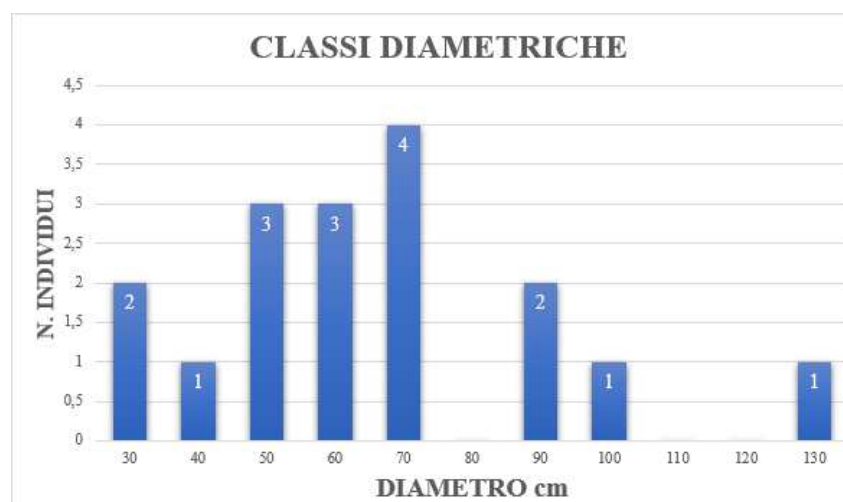


Figura 29 - Distribuzione in base al diametro di castagni coltivati nell'area di studio A4.

Dalle analisi dei campioni di suolo è stato possibile isolare e identificare *Phytophthora castanetrum*, che è caratterizzata da presenza di sporangi semipapillati o non papillati. Gli sporangi possono essere ovoidali, da subglobosi a globosi, obpiriformi, ellissoidali ( $44,2\text{--}48,1 \times 35,4\text{--}38,3 \mu\text{m}$ ). Tale specie è diffusa in Italia e Portogallo e sembra essere esclusiva di *Castanea sativa* (Jung *et al.*, 2017).

#### Area di studio A5 – Pozza di Acquasanta Terme (AP)

A5 è situata nel comune di Acquasanta Terme (AP) nella frazione di Pozza. Raggiungibile tramite una strada camionabile ma con gestione difficoltosa dovuta alla particolare morfologia del castagneto che presenta una zona inferiore situata a ridosso di un torrente e con la maggior parte delle piante disposte a gradoni nella porzione superiore. Il castagneto è tenuto in ottime condizioni e viene effettuata ripulitura annuale. In questa zona una grande problematica è causata dai cinghiali che non sono bloccati da recinzioni e che danneggiano le radici delle piante e, venendo in contatto con l'inoculo di *Phytophthora* presente nella rizosfera, diventano possibili vettori su più ampia scala. Le piante campionate sono 96, con diametro medio di 30 cm (Fig.31); l'età media stimata del popolamento è di circa 65 anni con un solo individuo che raggiunge presumibilmente i 165 anni.

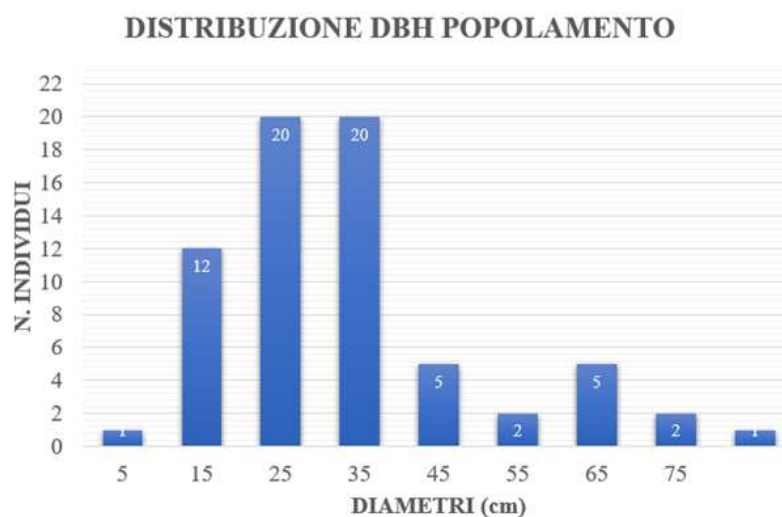


Figura 30 - Distribuzione in base al diametro di castagni coltivati nell'area di studio A5.

La situazione fitosanitaria mostra che la maggior parte degli individui non presenta ingiallimento, anche se sulla restante parte tale anomalia non supera il 50% della chioma. Il tessuto morto è presente su quasi tutti gli individui e per la maggior parte dei casi raggiunge il 50% con 10 piante morte che presentano anche la necrosi a fiamma (Fig. 32). L'età ridotta del popolamento non garantisce la vigoria delle piante che sono molto debilitate e che presentano sempre almeno un sintomo. Delle 96 piante, 48 mostrano la necrosi a fiamma e 65 il cancro; inoltre, in questo castagneto è stata individuata la presenza della fersa.

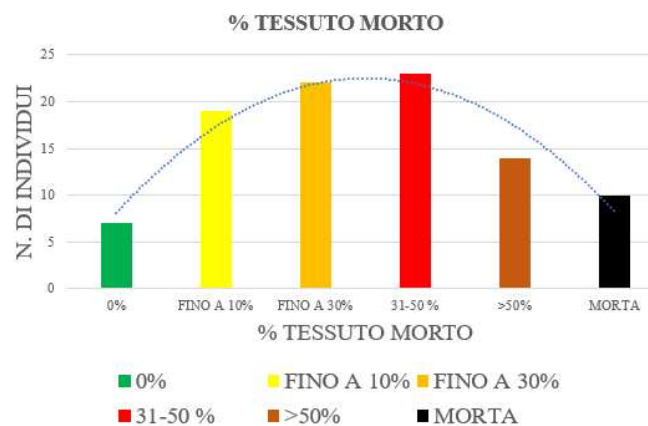


Figura 31 - Percentuale di tessuto morto riscontrato nel castagneto A5.

Dagli isolati sono state individuate 4 specie diverse di *Phytophthora*: *P. cambivora* (8 isolati), *P. castanetorum* (4 isolati), *P. pseudosyringae* (1 isolato) e *P. plurivora* (2 isolati). *P. pseudosyringae* (Fig. 32) è stata isolata per la prima volta dalla rizosfera di *Quercus robur* in Baviera, Gerolzhofen, nel novembre 1997 da T. Jung. Gli sporangi sono semipapillati con pedicelli medio-corti con forme limoniformi, ellissoidali, ovoidali, piriformi o irregolari (20–95 L x 18–45 W µm).

*P. pseudosyringae* è un patogeno diffuso in Europa, Nord America e sud America e può attaccare diversi ospiti come *Ilex aquifolium*, *Quercus spp.*, *Fagus sylvatica*, *Alnus glutinosa* (Jung *et al.*, 2003).

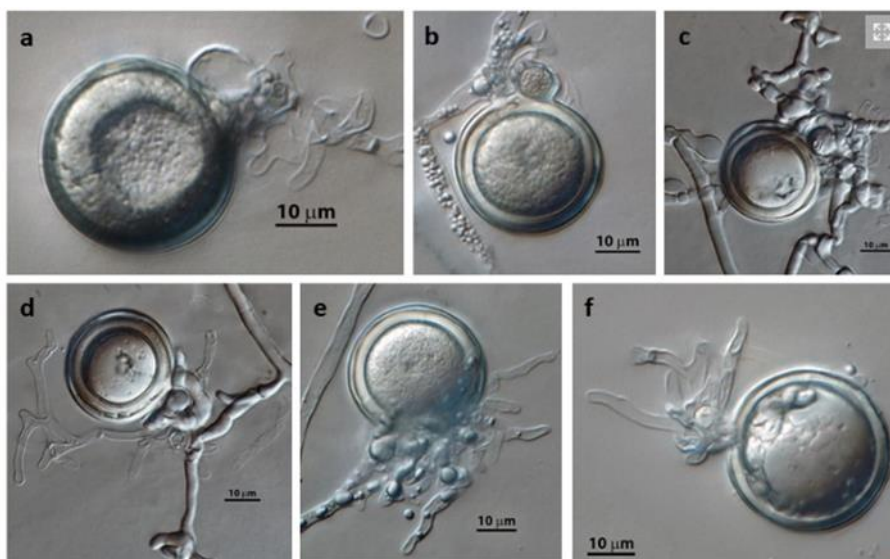


Figura 32 - *Phytophthora pseudosyringae* (ex tipo CPHST BL 51G) fase sessuale: gametangi con oospore plerotiche o leggermente aploeritiche (a-f), anteridi paraginici (a, b) e con ife annodate (c-f); foto di Vickie Brewster.

#### Area di studio A6 – Acquasanta terme (AP)

A6 è situata nel comune di Acquasanta Terme (AP) è il castagneto più difficile da raggiungere in quanto la strada è estremamente danneggiata e la mancata manutenzione del comune ha causato il cedimento dell'asfalto. Il castagneto è situato a circa 450 m.s.l.m si trova sul versante del monte che lo rendono interamente scosceso. Le piante analizzate sono 106 con un diametro medio di 25 centimetri (Fig. 33) e con 19 individui che non raggiungono i 16 cm; l'età del popolamento varia dai 10 ai 170 anni con età media di 50 anni.

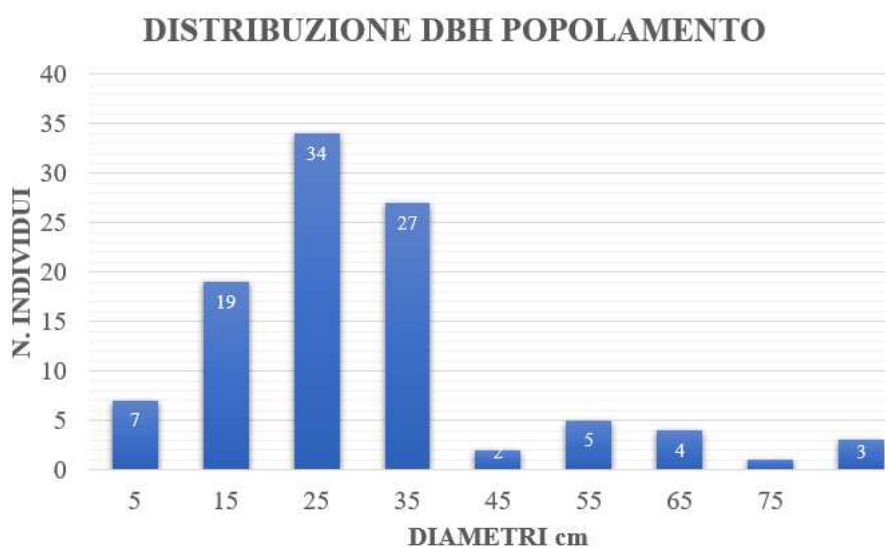


Figura 33 - Distribuzione in base al diametro di castagni coltivati nell'area di studio.

L'83% degli individui non mostra ingiallimenti sulla chioma, il tessuto morto è presente nel 32% degli individui e solo 2 piante sono morte. In quest'area il cancro interessa il 55% delle piante e la necrosi a fiamma il 29% (Fig. 34). Un individuo manifesta la presenza di oidio mentre il cinipide risulta totalmente assente.

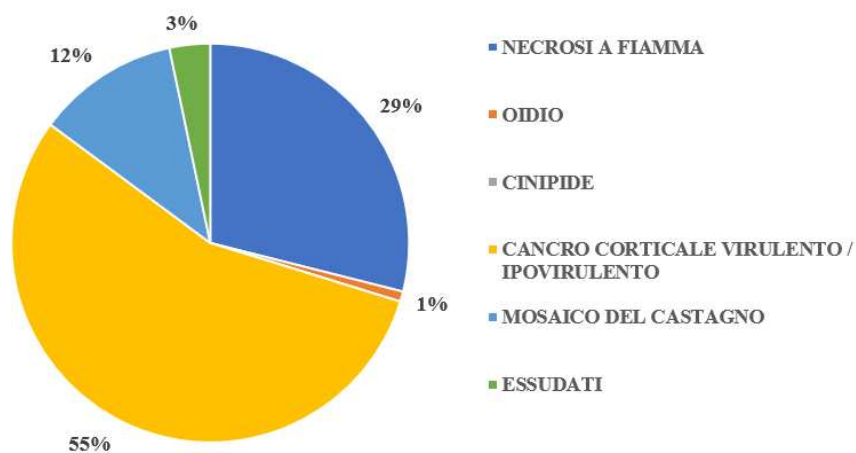


Figura 34 - Situazione fitosanitaria delle piante nell'area studio A6.

In questo sito sono state isolate 2 specie di *Phytophthora*: *P. cambivora* (2 isolati) e *P. cinnamomi* (3 isolati), le due principali specie tradizionalmente legate al mal dell'inchiostro del castagno (Fig. 35).

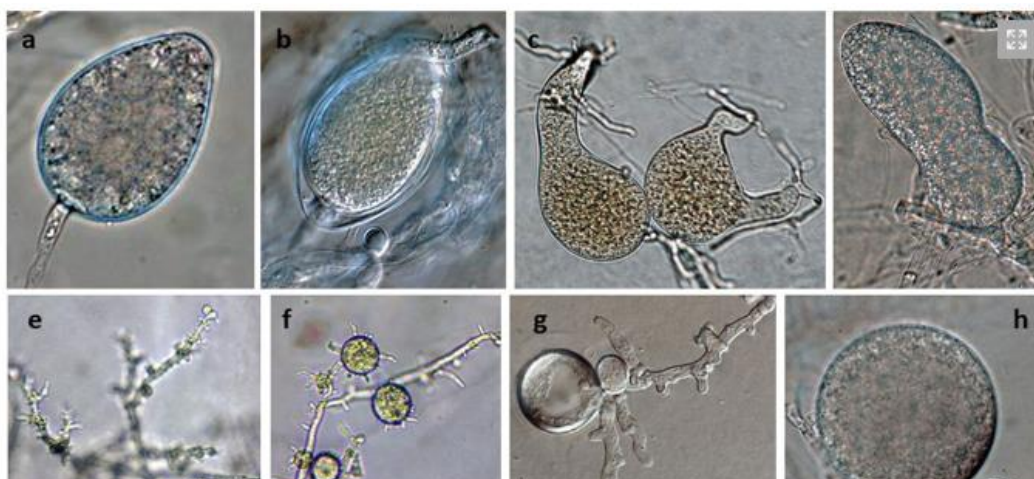


Figura 35 - *Phytophthora cinnamomi* campione selezionato P6490 fase asessuata (ah): (ad) diverse forme di sporangi persistenti, (e) tipico micelio coralloide, (f, g) rigonfiamenti ifali, (h) clamidospore e rigonfiamenti ifali; foto di Gloria Abad, USDA-APHIS-PPQ.

### Area di studio A7 – Colle San Marco (Ascoli Piceno) Ranelli

Nell'area di studio A7 sono state considerate 26 piante di età compresa tra i 70 e i 170 anni con assenza di rinnovazione.

Le piante mostrano una vigoria piuttosto bassa: ingiallimento della chioma presente sul 27% delle piante in maniera comunque ridotta; la percentuale di tessuto morto è invece presente su tutti gli individui, la maggior parte dei quali con oltre metà della chioma morta e solo 2 alberi con una situazione sotto il 10%. La necrosi a fiamma è presente nel 32% degli individui e il 56% di essi mostra almeno un cancro sulle branche principali (Fig. 36). I campioni di suolo raccolti da questo castagneto non sono ancora stati processati, per cui non si conoscono gli agenti coinvolti nel mal dell'inchiostro in questa area di studio.

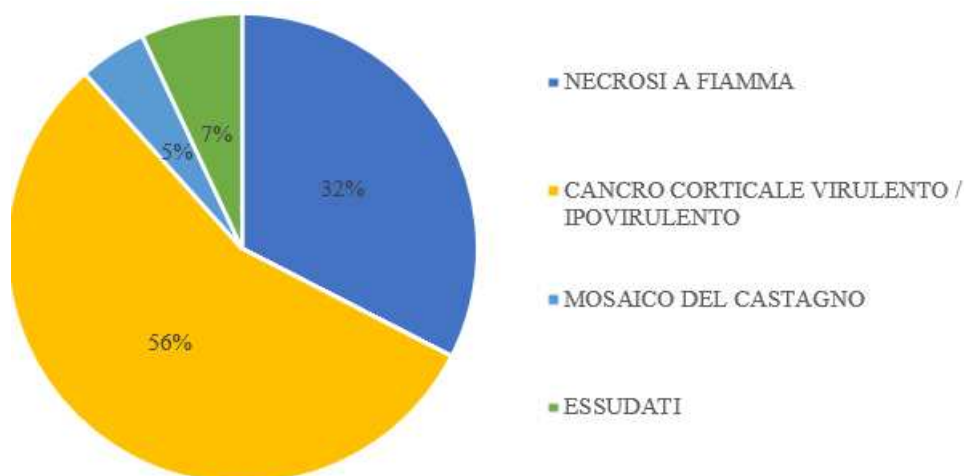


*Figura 36 - Situazione fitosanitaria delle piante nell'area studio A7.*

### Area di studio A8 – Faete di Arquata del Tronto (AP)

Area situata nella frazione di Faete nel comune di Arquata del Tronto (AP) a un'altitudine di circa 800 m.s.l.m. Il diametro medio delle piante è di 40 cm e l'età media è di 75 anni con due individui secolari di circa 235 anni.

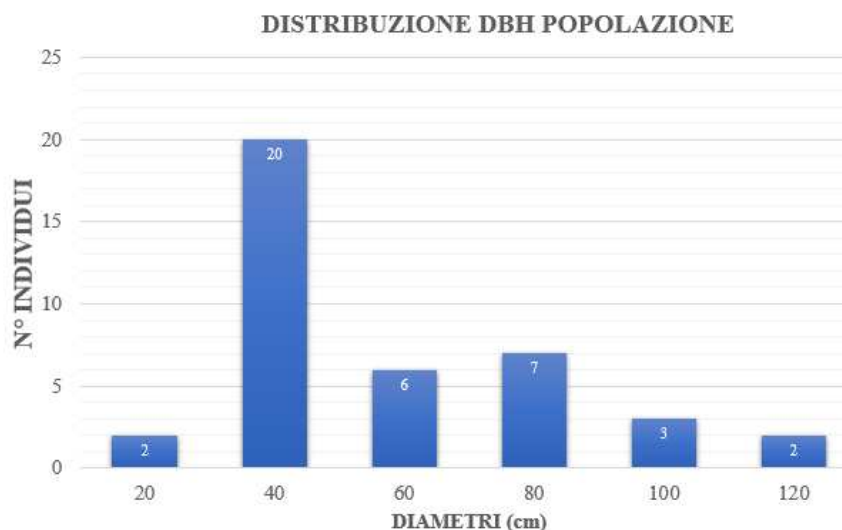


Figura 37 - Distribuzione in base al diametro di castagni coltivati nell'area di studio di Faete (A8).

La percentuale di tessuto morto interessa il 98% del popolamento (tasso di mortalità del 17%, dato nettamente più alto rispetto agli altri castagneti oggetto di studio); il 28% manifesta, inoltre, un disseccamento diffuso su oltre il 50% della chioma (Fig. 38).

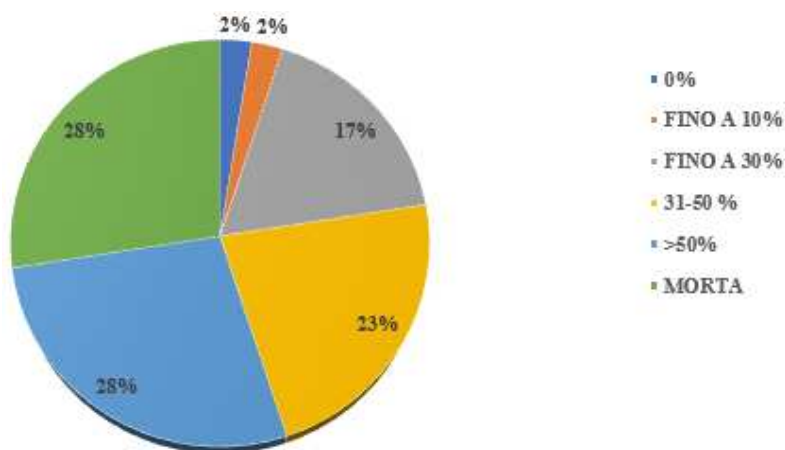


Figura 38 - Percentuale di tessuto morto delle piante dell'area studio A8

Per quanto riguarda la sintomatologia un individuo mostra il cancro corticale e undici la presenza del cinipide del castagno.

Dagli isolamenti effettuati a partire dalla rizosfera sono state individuate *P. cambivora* (4 isolati) e *P. pseudosyringae* (2 isolati).

#### **Area di studio A9 – Spelunga di Arquata del Tronto (AP)**

Questo sito è limitrofo all'area di studio A8 ed è situata nella frazione di Spelunga di Arquata del Tronto (AP). Ha un'altitudine compresa tra 900 e 950 m.s.l.m. e la classe diametrica più numerosa è quella di 60 cm (Fig. 39), e il popolamento può essere considerato coetaneo, con un'età media stimata di 100 anni.

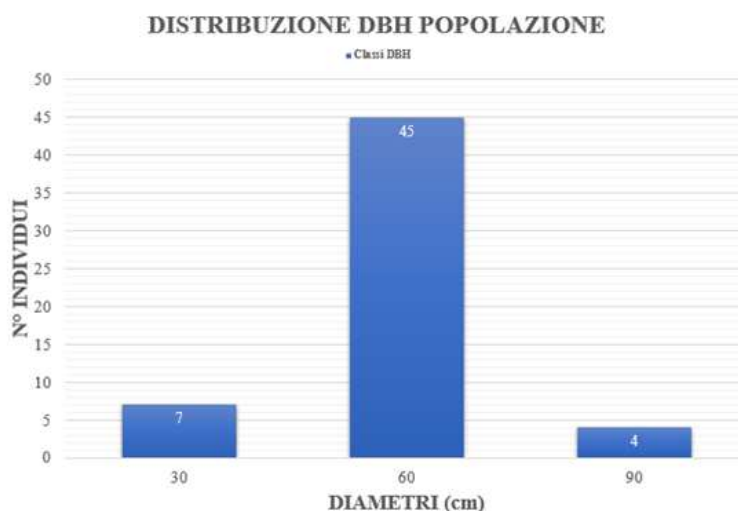


Figura 39 - Distribuzione in base al diametro di castagni coltivati nell'area di studio di Spelunga A9.

Dall'analisi dello stato fitosanitario emerge che il tessuto morto è stato rilevato sul 53% degli individui (56 piante in totale) con una porzione di chioma disseccata pari al 30%. Tale sintomo dimostra lo stato di stress in cui riversano le piante, che sono risultate infette da *P. cambivora*.

#### **Area di studio A10 – Altino di Montemonaco 2 (AP)**

Situata ad Altino di Montemonaco (AP) a sud della località Pignotti, a un'altitudine di circa 850 m.s.l.m. Il tipo di popolamento è disetaneo con età compresa tra i 90 ed i 150 anni; i diametri variano dai 40 ai 120 cm (Fig. 40), con la maggior parte di essi che presentano diametro di circa 60 cm.

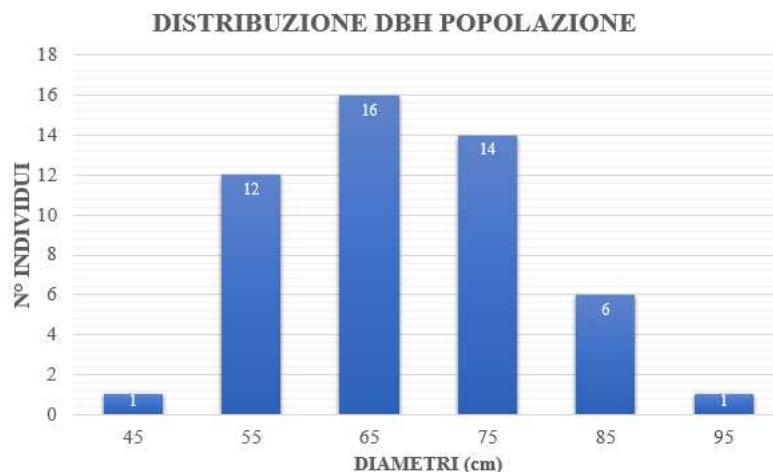


Figura 40 - Distribuzione in base al diametro di castagni coltivati nell'area di studio di Montemonaco (A10).

Il popolamento mostra tutti gli individui con almeno il 30% della chioma disseccata e di questi la metà supera il 50%, 3 individui sono morti con presenza di evidente necrosi a fiamma. Tale sintomo è molto frequente, essendo presente sul 34% degli alberi ed inoltre sul 27% sono visibili gli essudati. Il mosaico del castagno è presente limitatamente ai ricacci basali delle piante.

Dall'analisi morfologica e molecolare è stato possibile rilevare un'alta incidenza di *P. cambivora* (12 isolati) e di *P. pseudosyringae* (3 isolati). *P. cambivora* viene riconosciuta a livello morfologico in quanto presenta nella sua fase asessuata degli sporangi non papillati, persistenti, ovoidali, obpiriformi o elipsoidi (55–65  $\mu\text{m}$  x 40–45  $\mu\text{m}$ ), differenziati su sporangiofori semplici e non ramificati (Fig. 41).

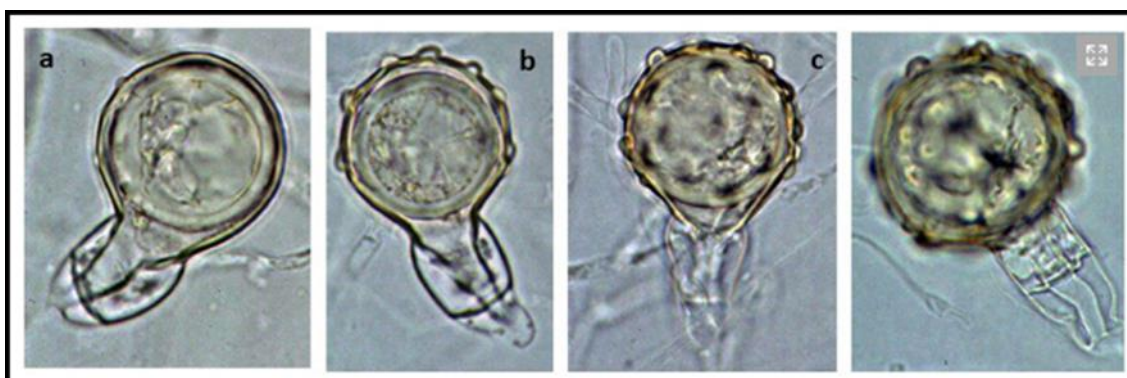


Figura 41 - *Phytophthora cambivora* (Abad PH197) fase sessuale dell'esemplare selezionato: (ad) morfologia di oogonia, anteridi e oospore dopo l'accoppiamento con il tipo opposto; foto di G. Abad, USDA-APHIS-PPQ

### Area di studio A11 – Uscerno di Montegallo (AP)

Area situata in frazione di Uscerno nel comune di Montegallo (AP), a un'altitudine compresa tra 500 e 550 m.s.l.m. L'area non presenta una popolazione omogenea con classi diametriche molto variabili da 45 a 145 cm con una massima rappresentazione nelle classi di 45 e 65 cm (Fig. 42). L'età media è di 135 anni con 15 individui (su un totale di 48) aventi circa 105 anni.

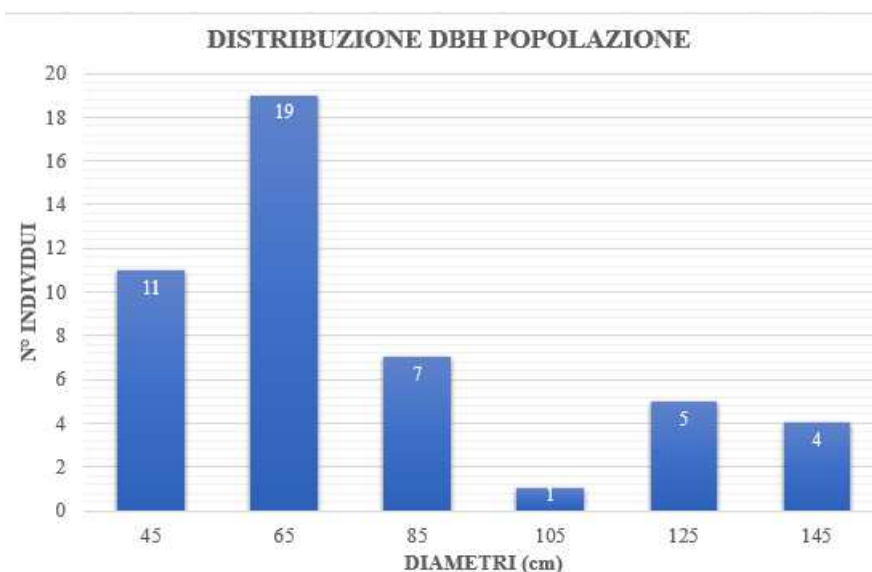


*Figura 42 - Distribuzione in base al diametro di castagni coltivati nell'area di studio di Uscerno (A11).*

Il tessuto necrotico è presente su tutti gli individui interessando maggiormente il 30 ed il 50% della chioma; anche la necrosi a fiamma è molto diffusa andando a interessare il 44% degli individui, assieme al mosaico che si trova sul 18% e agli essudati presenti nel 24% dei casi; risulta invece assente il cancro corticale. I campioni di suolo prelevati dalla rizosfera delle piante di questa area studio devono ancora essere processati.

## CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi, oltre a verificare lo stato fitosanitario dei castagneti presenti all'interno di zone vocate alla castanicoltura e che oggi stanno subendo una notevole riduzione spaziale, ha permesso di individuare le principali specie di *Phytophthora* che sono associate a sintomi di mal dell'inchiostro del castagno. È stato possibile dimostrare come il mal dell'inchiostro nei castagneti della regione Marche sia determinato da *P. cinnamomi*, che risulta essere la meno frequente, e da *P. cambivora* associata ad altre specie. Lo studio ha permesso di verificare come nel corso degli anni lo stato sanitario delle aree studio sia andato via via peggiorando e come tale problematica si stia propagando approfittando dello stato di stress generalizzato delle piante. Le analisi di laboratorio hanno confermato la presenza di *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. plurivora*, *P. pseudosyringae*, *P. castanetorum*, *P. cactorum* e *P. pseudocryptogea* negli 11 siti di studio fornendo importanti informazioni sull'eziologia e sulla diffusione di queste specie.

Tabella 2 - *Phytophthora* spp. isolata dalle 11 aree studio e identificata su base morfologica e molecolare.

|                           | Aree di studio |    |    |    |    |    |    |    |     |
|---------------------------|----------------|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| <i>Phytophthora</i> spp.  | A1             | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A8 | A9 | A10 |
| <i>P. cambivora</i>       | 4              |    |    |    |    | 2  | 4  | 2  | 12  |
| <i>P. cinnamomi</i>       |                |    |    |    |    | 3  |    |    |     |
| <i>P. plurivora</i>       | 2              |    |    |    | 2  |    |    |    |     |
| <i>P. pseudosyringae</i>  |                |    |    |    | 1  |    | 2  |    | 2   |
| <i>P. castanetorum</i>    |                |    |    | 1  | 4  |    |    |    |     |
| <i>P. cactorum</i>        |                |    | 1  |    |    |    |    |    |     |
| <i>P. pseudocryptogea</i> |                | 2  |    |    |    |    |    |    |     |

Sulla base di queste informazioni, grazie al Progetto INKAS si procederà ad azioni mirate per il controllo del mal dell'inchiostro del castagno nelle Marche.

## BIBLIOGRAFIA

- A. Catorci, A. Vitanzi, B. Paura, M. Iocchi & S. Ballelli, 2008 *La vegetazione forestale dei substrati arenacei della Val d'Aso*. Dipartimento di Scienze Ambientali, Sezione di Botanica ed Ecologia, Università di Camerino
- Allegato B alla deliberazione di Giunta regionale n. 356, in data 23/03/2015;
- Apruzzese A., Vai N., Supplemento n. 54 rivista Agricoltura - ottobre 2013 *La gestione biologica del castagno da frutto*;
- ASSAM - meteoblue stazione meteorologica di Montefortino dati relativi all'anno 2023;
- Ballelli S., Lucarini D., Orsomando E., 2001 *Flora vascolare della Selva di Castelfidardo e del territorio circostante*. 109;
- Bertoldi D., Miorelli P., Pedrazzoli F., Deromedi M., Maresi G., 2020, *Il giallume del castagno: alcune esperienze in Trentino*;
- Biondi E., Ballelli S., Allegrezza M., Zuccarello V., 1995. *La vegetazione dell'ordine Brometalia erecti Br. -Bl. 1936 nell'Appennino (Italia)*. Fitosociologia 30: 3-45;
- Biondi E., Casavecchia S., Pinzi M., Allegrezza M. & Baldoni M., 2002. *The syntaxonomy of the mesophilous woods of the Central and Northern Appennines (Italy)*. Fitosociologia 39 (2): 71-93;
- Biondi E., S. Casavecchia, A. R. Frattaroli, S. Pesaresi, e G. Pirone. 2010. *La Vegetazione Forestale Del Parco Nazionale Del Gran Sasso e Monti Della Laga*. L'Italia Forestale e Montana, 699–735;
- Bounous G., 2002, *Il castagno. Coltura, ambiente ed utilizzazioni in Italia e nel mondo*; 14-18, 23-26;
- Branzanti M.B., Gentili M., 1994, *le micorrize come agenti di bioprotezione nei confronti del mal dell'inchiostro del castagno*
- Castelnovi P.; 2002 - *Il paesaggio e il Parco Nazionale dei Monti Sibillini*. Collana dei Quaderni scientifico-divulgativi del Parco Nazionale dei Monti Sibillini;
- Catorci A., Vitanzi A., Paura B., Iocchi M. & Ballelli S., 2008 *La vegetazione forestale dei substrati arenacei della Val d'Aso*. Dipartimento di Scienze Ambientali, Sezione di Botanica ed Ecologia, Università di Camerino;

- Chanson B, Leban JM., Thibaut B., 1989, *La roulure du ch'taigner (Castanea sativa Mill.). For. Méd. XI (1): 15 - 34.*
- Cristinzio G., Scalise A., Scalzi T., Manna P., Gracea A., grassi G., 2002, prove di lotta chimica e biologica al mal dell'inchiostro del castagno, 4-7;
- Conedera M., 1993, *cancro corticale del castagno - Principali caratteristiche epidemiologiche e misure pratiche di controllo*, der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft 335;
- Daniel Rigling, Sarah Schütz-Bryner, Ursula Heiniger e Simone Prospero, 2016, *Cancro corticale del castagno Sintomatologia, biologia e misure di lotta*, Istituto federale di ricerca WSL CH-8903 Birmensdorf;
- Felsenstein J., 1981, *Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 17: 368-376.* 84
- Felsenstein J., 1985, *Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.*
- Gobbi E., Intropido M., Bisiach M. e Locci R., 1985 *indagini su fenomeni di eteroauxonia delle colonie di ceppi virulenti di endothia parasitica (murr.) Anderson* 79-88;
- Gentili B.; 2002 - *Note di Geomorfologia del Parco Nazionale dei Monti Sibillini*. Collana dei Quaderni scientifico-divulgativi del Parco Nazionale dei Monti Sibillini;
- GEOPORTALE NAZIONALE WMS - Rete Natura 2000 (SIC/ZSC e ZPS);
- Guitian j., Guitián P., Magrach A., 2012 *The varietal characterization of Castanea sativa Mill. germplasm*, 8-9;
- IPCC 2014. Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. Part A: global and sectoral aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 1435;
- Jung T., Horta Jung M., Cacciola S.O., Cech T., Bakonyi J., Seress D., Mosca S., Schena L., Seddaiu S., Pane A., Magnano di San Lio G., Maia C., Cravador A., Franceschini A., and Scanu B., 2017, *Multiple new cryptic pathogenic Phytophthora species from Fagaceae forests in Austria, Italy and Portugal. IMA Fungo 8 (2): 219–244.*
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016, MEGA7: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874*

- Linaldeddu B.T., Bregant C., Montecchio L., Favaron F. e Sella L., 2020, *First Report of Phytophthora acerina, P. pini, and P. plurivora Causing Root Rot and Sudden Death of Olive Trees in Italy*. *Plant Disease* 104 (3): 996;
- Marco Conedera, 1993, *cancro corticale del castagno - Principali caratteristiche epidemiologiche e misure pratiche di controllo*, der Eidgenössischen Forschungsanstalt fUr Wald, Schnee und Landschaft 335;
- Montecchio L., 2009, *il mal dell'inchiostro nel Veneto; indagine preliminare nel primo focolaio di rinvenimento*;
- Montemartini L., 1913., *rivista di patologia vegetale il cancro corticale del Castagno* 24-30;
- Moricca S, Benigno A., aglietti C., 2022, *Nuovi strumenti per la diagnosi dei parassiti del castagno*;
- Murolo S., 2018, Corso di Patologia forestale AA 2022-2023 – Patologia speciale “cancri”;
- Murolo S., Khidr Osman V., 2019, *Nuove problematiche fitosanitarie delle Marche*;
- Onangro S., Lione G., Gonthier P., Rollet I., 2023, *Effetti del clima e della stagionalità sul cancro del castagno*;
- PARCO NAZIONALE DEI MONTI DELLA LAGA, PARCO NAZIONALE DEI MONTI DELLA LAGA, sic/zps it5210071, monti sibillini;
- Raimondi M., 2019, *Il Castagno per il territorio: dalla sentieristica al paesaggio» Caratteristiche, qualità e problemi del legno di castagno, zone di provenienza, caratterizzazione dell'attuale castagno locale*. 12-20;
- Rigling D., Schütz-Bryner S., Heiniger U. e Prospero S., 2016, *Cancro corticale del castagno Sintomatologia, biologia e misure di lotta*, Istituto federale di ricerca WSL CH-8903 Birmensdorf;
- REGIONE MARCHE.; 2019, *piano delle attività di previsione, prevenzione e lotta attiva contro gli incendi boschivi*, Periodo di validità 2019-2023;
- REGIONE VENETO, gestione forestale, 2019, Prescrizioni di Massima e Polizia Forestale
- RETE ECOLOGICA (REM)- *arta degli Habitat di interesse comunitario (All.I dir 92/43/CEE) per l'intero territorio regionale scala 1: 50.000*;

- RETE NATURA 2000 - Codice Natura 2000: IT5340019 Compreso nella ZPS: IT5330029;
- RETE NATURA 2000: habitat 9260 - IT5340012 - Boschi ripariali del Tronto habitat 9260 - Boschi di *Castanea sativa*;
- RETE NATURA 2000 - IT5340012 - Boschi ripariali del Tronto – habitat 6210\* - Formazioni erbose secche seminaturali e facies coperte da cespugli su substrato calcareo (*Festuco-Brometalia*) (\*stupenda fioritura di orchidee);
- RETE NATURA 2000- IT5340012 - Boschi ripariali del Tronto – habitat 92A0 - Foreste a galleria di *Salix alba* e *Populus alba*;
- RETE NATURA 2000- IT5340012 - Boschi ripariali del Tronto – habitat 5130 - Formazioni a *Juniperus communis* su lande o prati calcicoli;
- RETE NATURA 2000 - IT5340012 - Boschi ripariali del Tronto – habitat 91E0\* - Foreste alluvionali di *Alnus glutinosa* e *Fraxinus excelsior* (*Alno-Padion*, *Alnion incanae*, *Salicion albae*);
- Rodriguez F., Oliver J.F., Marin A., Medina J.R., 1990, *The general stochastic model of nucleotide substitutions. Journal of Theoretical Biology* 142: 485-501;
- Sabbatini Peverieri G., Simoni S., Liguori M., 2012, *Suitability of Quercus ilex pollen for rearing four species of phytoseiid mites*. 65;
- Schebeck M., Schop A., Ragland G., Stauffer C., Biedermann P., 2022, *Evolutionary ecology of the bark beetles Ips typographus and Pityogenes chalcographus* 9-12;
- Scanu B., 2014, *Studio sulle specie di Phytophthora presenti in ambienti forestali della Sardegna*
- Scanu B., Vannini A., Franceschini A., Vettraino A.M., Ginetti B., Moricca S., *Phytophthora spp. nelle foreste mediterranee*
- Schaub M., Paoletti E., 2007. *Air pollution and climate change: A global overview of the effects on forest vegetation. Environmental Pollution*, 147, 492;
- Schebeck M., Dowle E.J., Schuler H., Avtzis D.N., Bertheau C., Feder J.L., Ragland G.J., Stauffer C., 2018, *Pleistocene climate cycling and host plant association shaped the demographic history of the bark beetle Pityogenes chalcographus. Scientific Reports* 8, 14207.
- Schebeck M., Schuler H., Einramhof B., Avtzis D.N., Dowle E.J., Faccoli M., Battisti A., Ragland G.J., Stauffer C., Bertheau C., 2019, *The Apennines as a cryptic Pleistocene*

- refugium of the bark beetle Pityogenes chalcographus (Coleoptera: Curculionidae). Biological Journal of the Linnean Society 127, 24–33;*
- Cohn R., 1889 *Kryptogamen-Flora von Schlesien. Band 3, Heft 3, Pilze JU Kern's Verlag, Breslavia, Phytophthora cactorum (Lebert & Cohn), 89*
- SIC/ZPS IT5210071 – monti sibillini inquadramento geografico amministrativo;
- Taffetani F., 2008. Boschi residui in Italia tra paesaggio rurale e conservazione. *Atti del Terzo Congresso Nazionale di Selvicoltura per il miglioramento e la conservazione dei boschi italiani;*
- Tiberi R., 2000. *Insects harmful to oaks in Italy. In: Decline of oak species in Italy. Problems and perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali, 77-98;*
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997, *The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25: 4876-4882.*
- Turchetti T., Addario E., Maresi G., 2010, *Interazioni tra vespa del castagno e peronospora: una nuova criticità per il castagno;*
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990, *Amplified and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White T, (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego, pp 315-322.*
- Zagnoni R., 2022, *la coltivazione del Castagno nella montagna fra bologna e pistoia nei secoli xi-xiii*

## SITOGRAFIA

- <https://doi.org/10.4129/IFM.2010.6.03>.
- [https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina\\_baseee53.html?id=1662](https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina_baseee53.html?id=1662)''
- [https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina\\_base6872.html?id=1653](https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina_base6872.html?id=1653)''
- [https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina\\_base9426.html?id=1642](https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina_base9426.html?id=1642)''
- [https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina\\_base7a6e.html?id=1667](https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina_base7a6e.html?id=1667))
- [https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina\\_base65f5.html?id=1649](https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina_base65f5.html?id=1649)''
- <https://www.gransassolagapark.it/pagina.php?id=23>
- [https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina\\_base916b.html?id=1799](https://www.regione.marche.it/natura2000/pagina_base916b.html?id=1799)
- [www.sibillini.net](http://www.sibillini.net)

<https://performance.gov.it/performance/piani-performance/documento/1669>  
<https://performance.gov.it/performance/piani-performance/documento/1528>”  
<https://www.regione.marche.it/Entra-in-Regione/Rete-Ecologica-Marche-REM/Cartografia-shapefile>  
<https://www.euforgen.org/species/>  
<https://www.wsl.ch/it/>  
[www.bmr-genomics.it](http://www.bmr-genomics.it)  
<http://www.geospiza.com/finchtv>