



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

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

SCREENING FITOSANITARIO DEL GERMOPLASMA
DI *CASTANEA* SPP.: IL CASO STUDIO DEL VIRUS
DEL MOSAICO DEL CASTAGNO

PHYTOSANITARY SCREENING OF *CASTANEA* SPP.
GERMPLASM: CASE STUDY ON CHESTNUT MOSAIC
VIRUS

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
SERENA GIOMBINI

Relatore:
PROF. SERGIO MUROLO

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

Un ringraziamento speciale alla mia famiglia e ai miei amici, in particolare a mio cugino, è grazie al loro sostegno e al loro incoraggiamento se oggi sono riuscita a raggiungere questo traguardo, ogni giorno hanno condiviso con me gioie, sacrifici e successi.

Vorrei ringraziare inoltre il Prof. Sergio Murolo, relatore di questa tesi. Oltre ad avermi guidata nella stesura di questo lavoro, mi ha trasmesso la passione e l'entusiasmo necessari a portare a termine il lavoro e ad interessarmi alla materia.

L'affetto e il sostegno dimostrati da tutti rendono questo traguardo ancora più prezioso.

| | |
|--|----|
| ELENCO DELLE TABELLE..... | 2 |
| ELENCO DELLE FIGURE | 3 |
| ACRONIMI E ABBREVIAZIONI | 4 |
| CAPITOLO 1 INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI | 5 |
| 1.1 Il castagno..... | |
| 1.2 Le principali malattie del castagno..... | |
| 1.2.1 Cancro corticale..... | |
| 1.2.2 Mal dell'inchiostro..... | |
| 1.2.3 Il mosaico del castagno..... | |
| CAPITOLO 2 MATERIALI E METODI..... | 14 |
| 2.1 Descrizione del sito..... | |
| 2.2 Monitoraggio visivo e raccolta dei campioni..... | |
| 2.3 Estrazione del DNA..... | |
| 2.4 Amplificazione genica (PCR)..... | |
| 2.5 Visualizzazione dei risultati dell'amplificazione genica mediante elettroforesi..... | |
| CAPITOLO 3 RISULTATI E DISCUSSIONE | 19 |
| CONCLUSIONI | 26 |
| BIBLIOGRAFIA | 27 |

ELENCO DELLE TABELLE

| | |
|---|----|
| Tabella 2-1: Reagenti con le relative quantità per l'amplificazione | 18 |
| Tabella 3-1: Campioni sintomatici e asintomatici..... | 21 |
| Tabella 3-2: Risultati della diagnosi molecolare di ChMV..... | 24 |

ELENCO DELLE FIGURE

| | |
|--|----|
| Fig. 1 - Areale di distribuzione del Castagno in Europa..... | 6 |
| Figg. 2-4 - Sintomi dovuti a <i>Cryphonectria parasitica</i> | 8 |
| Figg. 5-8 - Sintomi determinati da mal dell'inchiostro su piante di castagno..... | 10 |
| Figg. 9-10 – Sintomi del mosaico del castagno..... | 11 |
| Figg. 11-12 - Sintomi riscontrati nel mese di luglio 2016..... | 12 |
| Figg. 13-14 - Sintomi riscontrati nel mese di settembre..... | 12 |
| Figg. 15-16 - Vivaio del centro di castanicoltura del Piemonte di Chiusa di Pesio..... | 14 |
| Figg. 17-22 – Sintomi ChMV..... | 19 |
| Figg. 23-24 – Screening visivo piante sintomatiche..... | 22 |
| Fig. 25 – Risultati dell'analisi elettroforetica..... | 24 |
| Figg. 26-27 – Sintomi di carenza da manganese e ferro..... | 24 |

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

| | |
|------|--|
| ChMV | Chestnut Mosaic Virus – Virus del Mosaico del castagno |
| ChMD | Chestnut Mosaic Disease |
| DM | Decreto Ministeriale |
| GU | Gazzetta Ufficiale |
| PCR | Polymerase chain reaction – Reazione a catena della polimerasi |

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

1.1 Il castagno

Il castagno è una pianta arborea, con chioma espansa e rotondeggiante ed altezza variabile, dai 10 ai 30 metri, è una specie caducifoglie, latifoglie e mesofila, moderatamente esigente in umidità. Sopporta abbastanza bene i freddi invernali, subendo danni solo a temperature inferiori a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, ma diventa esigente durante la stagione vegetativa (Bounous, 2002). Per questo motivo il castagno ha una ripresa vegetativa tardiva, con schiusura delle gemme in tarda primavera e fioritura all'inizio dell'estate. Al fine di completare il ciclo di fruttificazione, la buona stagione deve durare quasi 4 mesi. In generale tali condizioni si verificano nel piano montano (600–1300 m) delle regioni mediterranee o in alta collina più a nord. In condizioni di umidità favorevoli può essere coltivato anche nelle stazioni fresche del Lauretum, spingendosi perciò a quote più basse. Condizioni di moderata siccità estiva determinano un rallentamento dell'attività vegetativa nel mezzo della stagione e una fruttificazione irregolare. Le nebbie persistenti e la piovosità eccessiva nei mesi di giugno e luglio ostacolano l'impollinazione incidendo negativamente sulla fruttificazione.

Nelle prime fasi di vita tollera un moderato ombreggiamento, fatto, questo, che favorisce una buona rinnovazione nei boschi maturi, ma in fase di produzione manifesta una maggiore eliofilia.

Presenta notevoli esigenze pedologiche, perciò la sua distribuzione è strettamente correlata alla geopedologia del territorio. Sotto l'aspetto chimico e nutritivo, la specie predilige i terreni ben dotati di potassio e fosforo e di humus. Le condizioni ottimali si verificano con pH di terreni neutri o moderatamente acidi; si adatta anche ad un'acidità più spinta, mentre rifugge in genere dai suoli basici. Sotto l'aspetto granulometrico predilige i suoli sciolti o

tendenzialmente sciolti, mentre non sono tollerati i suoli argillosi o, comunque, facilmente soggetti ai ristagni. In generale sono preferiti i suoli derivati da rocce vulcaniche (tufi, trachiti, andesiti, ecc.), ma vegeta bene anche nei suoli prettamente silicei derivati da graniti, arenarie quarzose, ecc., purché sufficientemente dotati di humus. I suoli calcarei sono tollerati solo nelle stazioni più settentrionali, abbastanza piovose, mentre sono mal tollerate le marne.

Tra le diverse specie di castagno, in Europa *Castanea sativa* occupa all'incirca 2,5 milioni di ettari mantenendo una maggior concentrazione, pari all'89%, all'interno di determinati paesi, tra i quali l'Italia, legati ad una lunga tradizione nella coltivazione del castagno stesso (Conedera, 2016) (Fig. 1).

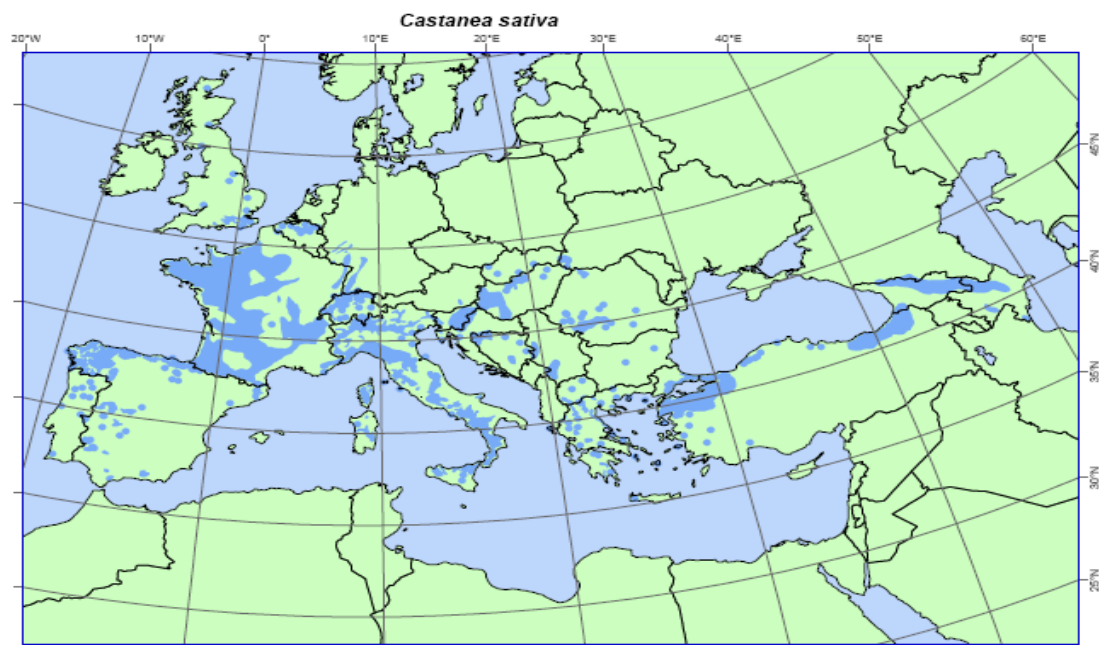


Fig. 1 - Areale di distribuzione del Castagno in Europa.

In Italia vegeta nella zona fitoclimatica del *Castanetum*, a cui dà il nome, estendendosi anche nelle zone più fresche del *Lauretum*, per introduzione da parte dell'uomo. In genere si ritrova su quote variabili dai 200 metri s.l.m. fino agli 800 m nelle zone alpine, mentre nell'Appennino meridionale può spingersi fino ai 1000-1300 metri. Il castagno ha assunto in passato ed assume ancora oggi un ruolo preminente tra le formazioni forestali italiane, non solo per l'elevata produttività, la qualità e la varietà degli assortimenti legnosi, ma soprattutto per la consistente presenza sul territorio nazionale. Nei 10,5 milioni di ettari occupati da boschi, la frazione investita a castagno rappresenta il 7,53% di quella forestale, per un totale

di circa 780.000 ha. È dunque una tipica specie degli ambienti boschivi collinari e di quelli montani di bassa quota. L'ecosistema forestale tipico del castagno è la foresta decidua temperata mesofila, dove forma associazioni in purezza o miste, affiancandosi al gen. *Quercus* (per lo più farnia e roverella), al frassino, al carpino nero, al noce, al nocciolo, ecc.

Si tratta di un patrimonio forestale, in gran parte di origine antropica, la cui ubicazione si concentra in diverse Regioni. Le estensioni del Piemonte, Toscana e Liguria sono pari ad oltre il 50% del patrimonio nazionale; includendo quelle che hanno un patrimonio superiore a 30.000 ha (Lombardia, Calabria, Campania, Emilia-Romagna e Lazio) si giunge al 90% (Piano Castanicolo 2010-2014).

I dati sull'evoluzione del numero delle aziende agricole e della superficie investita dal 1970 al 2010 mostrano una drastica diminuzione di entrambe le variabili. Tra il 1970 e 2000 le aziende si riducono del 75% e la superficie investita a castagneto da frutto del 62%. Tra il 2000 e il 2010 si registra un fenomeno di recupero dei castagneti coltivati che porta ad una riduzione del 54% del numero delle aziende e del 31% delle superfici.

Tale contrazione delle superficie è da imputare sia a cause economico sociali che fitosanitarie. In particolare, di seguito approfondiremo le principali malattie che hanno in alcuni casi rappresentato dei fattori limitanti per la produzione di castagne.

A partire infatti dall'inizio del nuovo millennio si è verificata una forte perturbazione del "sistema castagno", conseguente alla introduzione accidentale del cinipide galligeno *Dryocosmus kuriphilus*, specie esotica di provenienza asiatica. Tale situazione di forte indebolimento delle piante, ha portato alla manifestazione di nuovi danni da vecchie malattie (cancro corticale e marciume del frutto), mentre i cambiamenti climatici hanno favorito l'insediamento nei castagneti italiani di *Phytophthora cinnamomi* specie più aggressiva della comunque pericolosa *P. cambivora*, aumentando notevolmente il rischio di nuove epidemie da mal dell'inchiostro, nonché l'insorgere e la diffusione di malattie emergenti.

1.2 Le principali malattie del castagno

1.2.1 Cancro corticale

Il cancro corticale è causato da un fungo Ascomycota, *Cryphonectria parasitica* (sin. *Endothia parasitica*), indigeno su *Castanea crenata* e *C. mollissima* in Giappone e in Cina, ma che è stato introdotto accidentalmente negli Stati Uniti con l'importazione di materiale infetto (Rigling e Prospero, 2018). Il primo focolaio su *Castanea dentata* è stato riscontrato

a New York nel 1904, e successivamente il patogeno è giunto in Europa attraverso il legname di imballaggio contaminato. In Italia, la malattia è stata segnalata per la prima volta nel 1938 e si è diffusa in pochi anni colpendo tutti i principali nuclei di produzione di *C. sativa* del Paese (Baldacci e Orsenigo, 1952).



Fig. 2 - Sintomi dovuti a *Cryphonectria parasitica*: (a) ipertrofia su pollone, (b) necrosi dei tessuti sottocorticali, (c) emissione di rami epicormici.

I sintomi dell'attacco si manifestano a livello di fusto e rami. In corrispondenza del punto di penetrazione del patogeno, si producono delle aree color rosso ruggine leggermente depresse (ipertrofia) con un contorno ellittico più o meno irregolare e leggermente rilevato. Queste zone necrotiche si spingono verso l'interno e raggiungono floema e cambio, ostacolando così il trasporto di linfa elaborata. La morte della pianta avviene per progressione della malattia, fino a quando i tessuti sono completamente devitalizzati sull'intera circonferenza. La corteccia, che di conseguenza si disidrata, si fessura progressivamente e si distacca completamente. Il disseccamento dei rami e del tronco procede verso il basso e provoca una perdita di vitalità che induce la pianta a rispondere, data la soppressione della dominanza apicale, con la produzione di rami avventizi, soggetti anch'essi ad un successivo disseccamento. Solo i ricacci che si sviluppano a livello del colletto restano vitali, e quindi la pianta assume un portamento arbustivo. Studi successivi hanno dimostrato che il virus è trasmissibile da ceppi ipovirulenti a virulenti con lo scambio di materiale citoplasmatico durante l'anastomosi ifale, e proprio su questa caratteristica si sono basate negli anni le sperimentazioni sulla *C. parasitica* e le sue strategie di lotta e contenimento. Infatti,

inoculando artificialmente attorno ad un cancro letale il ceppo ipovirulento, i sintomi della malattia regrediscono lentamente, con una buona risposta della pianta. Inoculando un ceppo ipovirulento su una pianta sana, il cancro che si produce è solo superficiale e non letale. Ma affinché si verifichi la trasmissione del virus, i ceppi devono essere compatibili in modo che le ife entrino in contatto e si anastomizzino completamente rimanendo vitali.

1.2.2 Mal dell'inchiostro

Il mal dell'inchiostro è una delle fitopatie più gravi per il castagno. E' stata segnalata per la prima volta nel 1824 negli Stati Uniti, mentre in Europa la prima osservazione risale al 1838 in Portogallo, anche se si ipotizza che in Spagna fosse già presente dal 1726 (Crandall *et al.*, 1945). La malattia è stata studiata da numerosi ricercatori per tutta la fine dell'800 e l'inizio del '900, finché Petri nel 1917 ne ha individuato definitivamente l'eziologia e ne ha identificato l'agente, noto inizialmente come *Blepharospora cambivora* e, in seguito come *Phytophthora cambivora* (Petri, 1917a, 1917b; Petri, 1930). In Italia nel 1986 oltre a *P. cambivora* è stata osservata un'altra specie associata alla malattia, *Phytophthora cinnamomi*, già nota in America e rinvenuta in Lazio. La malattia ha causato all'inizio del XX secolo gravi danni e ingenti perdite di produzione in tutte le aree castanicole, per poi riassorbirsi progressivamente. Si è infatti constatato che provoca danni non costanti nel tempo ma cicli in cui gli individui colpiti possono attraversare negli anni fasi alterne di attenuazione e recrudescenza della sintomatologia (Turchetti *et al.*, 2008). Negli ultimi anni, per la segnalazione di numerosi nuovi focolai in tutto il territorio, si sta assistendo ad una ripresa della malattia, che sembrerebbe essere favorita da inverni miti, primavere piovose ed estati asciutte e siccitose. Sono infatti queste le condizioni che debilitano maggiormente il castagno e al contempo sono ideali per germinazione delle oospore del patogeno.

Il mal dell'inchiostro colpisce piante di tutte le età, sia in frutteti che in foresta. Si presenta inizialmente con una sofferenza generalizzata, che si manifesta soprattutto nelle parti più alte della chioma, dove le foglie restano di dimensioni molto ridotte e sono soggette a clorosi. La rarefazione della chioma si aggrava con l'appassimento e il disseccamento di foglie e ricci, compromettendo la produzione dei frutti fino a bloccarla totalmente. Durante questo processo, la pianta produce rami epicormici lungo il tronco, che sono comunque destinati a devitalizzarsi in poco tempo (Fig. 3).



Fig. 3 - Sintomi determinati da mal dell'inchiostro su piante di castagno.

1.2.3 Il mosaico del castagno

Il mosaico del castagno, pur essendo stata una malattia segnalata per la prima volta già negli anni '60 (Gualaccini, 1958), era rimasta ad eziologia ignota per lungo tempo. Sono seguite nel tempo segnalazioni in Campania (Ragozzino et al., 1986), in Emilia Romagna e nelle Marche negli anni '90 (Antonaroli et al., 2000). Nello stesso tempo anche in Francia, Desvignes et al., (1992, 1996) definivano, inseguito a esperimenti basati sull'innesto, la trasmissibilità della malattia, ipotizzando che si trattasse di una malattia ad eziologia virale o virus-simile.



Fig. 4 - (a) Decolorazione a mosaico; **(b)** arricciamento della lamina fogliare e macchie necrotiche irregolari localizzate ai margini.

In particolare, si osservano dapprima delle decolorazioni ‘a mosaico’ dei tessuti internodali con ripiegatura a doccia della lamina fogliare. Successivamente questi sintomi si acutizzano e si completano con l’arricciamento della foglia, e con la presenza di necrosi irregolari sui margini (Fig. 4). La pianta negli anni va incontro a un graduale deperimento che inevitabilmente compromette la produzione di frutti.

Recentemente sono stati effettuati studi specifici in Italia e Francia e, utilizzando metodiche classiche e innovative di diagnosi è stato possibile ricostruire il genoma completo di un badnavirus (Marais *et al.*, 2021), associato alla malattia che i Francesi denominavano “Mosaico del castagno” (Desvignes *et al.*, 1999) e verificare la presenza del virus soprattutto su piante sintomatiche, ma anche su piante asintomatiche non innestate.

Da osservazioni effettuate mensilmente nell’acquasantano, dove la problematica è particolarmente evidente, la malattia è caratterizzata da alterazioni a livello fogliare la cui gravità dei sintomi tende ad intensificarsi col progredire della stagione vegetativa, culminando al termine dell’estate.



Fig. 5 - Sintomi riscontrati nel mese di luglio.



Fig. 6 - Sintomi riscontrati nel mese di settembre.

Scopo della presente ricerca è stato quello di effettuare uno screening fitosanitario del germoplasma di castagno conservato presso il Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte. In particolare, lo studio ha riguardato il mosaico del castagno che è considerata una malattia emergente, associata alla presenza di ChMV. Si è partiti da un'osservazione visiva dei sintomi per poi raccogliere del materiale vegetale da analizzare in laboratorio mediante tecniche molecolari.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Descrizione del sito

Il Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte, nato nel 2003 e istituito formalmente con la Legge Regionale n° 4 del 10 febbraio 2009, è collocato in un territorio tradizionalmente vocato per il castagno. Complessivamente, tra le cultivar locali (Chiusa Pesio, Garrone Rosso), nazionali (Castel del Rio, Mugello, Roccadaspide) e internazionali, il parco racchiude ben 150 genotipi su una superficie di 5 ettari (Fig. 7). Rappresenta uno dei campi collezione di germoplasma e variabilità genetica più ampi a livello internazionale. Ogni varietà è stata innestata sui portinnesti clonali (3 repliche per varietà) Marsol (CA 07) e/o Marlhac (CA 118), con l'obiettivo di ridurre al minimo effetti di disaffinità d'innesto e mantenere le condizioni agronomiche e di portinnesto il più omogenee possibili tra le varie cultivar.

Le attività del centro sono orientate a fornire risposte scientifiche e tecniche alle problematiche della castanicoltura, contribuendo a rilanciare il settore produttivo, a migliorarne la competitività e valorizzare il castagno come albero da frutto, da legno e componente caratterizzante degli ecosistemi montani e pedemontani. Si possono osservare diverse specie di castagno (*C. sativa*, *C. crenata*, *C. pumila*, *C. mollissima*, *C. dentata*) e ibridi interspecifici (*C. sativa* x *C. crenata*, *C. crenata* x *C. mollissima*)

Con pubblicazione sulla GU n° 22 del 28-01-2021 è entrato in vigore il DM di Riconoscimento del Centro per la conservazione per la premoltiplicazione e del Centro per la premoltiplicazione per il castagno, ubicato presso il Centro Regionale di Castanicoltura - Vivaio Regionale Gambarello di Chiusa Pesio (CN).



Figg. 7-8 - Vivaio del centro di castanicoltura del Piemonte di Chiusa di Pesio (CN).

2.2 Monitoraggio visivo e raccolta dei campioni

Nell'agosto del 2020 è stato effettuato, all'interno della collezione varietale di castagno presso il Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte, un monitoraggio visivo con lo scopo di registrare la presenza di sintomi di mosaico e ingiallimento, ascrivibili a infezioni virali o virus simili. Le piante che mostravano sintomi sono state annotate su una mappa bi-dimensionale e, partendo da queste sono stati raccolti sei rametti della lunghezza di circa 20 cm con 10 foglie. Sono stati prelevati anche campioni fogliari da piante asintomatiche limitrofe a quelle sintomatiche. Per ciascuna delle piante da cui è stato prelevato il campione, è stata effettuata una foto d'insieme e una più particolareggiata per registrare i sintomi. Complessivamente sono stati raccolti 60 campioni da diverse varietà appartenenti a *C. crenata* (7), *C. dentata* (3), *C. mollissima* (5), *C. sativa* (25) e *C. sativa x C. crenata* (19).

2.3 Estrazione del DNA

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

- 1) All'interno di mortai sterili è stata aggiunta una spatola (50 mg) di metabisolfito di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) con funzione di antiossidante e 3 ml di CTAB al 3%.
Per ogni pianta campionata sono state selezionate le parti con sintomi del chestnut mosaic virus, quando presenti, sminuzzandone circa 0.5 g. Particolarmente importante la sterilizzazione degli arnesi e del piano di lavoro tra un campione e l'altro con ipoclorito di sodio al 5% ed alcool, per evitare le contaminazioni.
- 2) Le parti vegetali sminuzzate presenti nel mortaio, sono state omogenizzate e il succo verde è stato versato in due eppendorf da 2 ml, filtrando il composto con il pestello in modo da trattenere le parti vegetali più grossolane. Le provette riempite e siglate con nome abbreviato della pianta e numero di campione, finché non verrà iniziato il lavoro di estrazione vero e proprio, saranno conservate in congelatore alla temperatura di -20°C onde evitare la degradazione dell'estratto.
- 3) I campioni sono stati incubati tramite un bagno di acqua calda, sorretti da un porta-eppendorf galleggiante alla temperatura di 65°C per circa 30 min, capovolgendoli ogni

5 min, per facilitare il processo di estrazione. Successivamente, sono stati posti in frigorifero a 4°C per dieci minuti.

La sospensione nelle eppendorf, raffreddata, è stata agitata su vortex alla massima velocità per qualche minuto e in seguito posta in centrifuga per 10 minuti a 8.000 rpm, alla temperatura di 10°C.

- 4) Un'aliquota di 900 µL di surnatante è stata trasferita in provette da 2 mL (stando attenti a non toccare i sedimenti sottostanti) a cui è stato aggiunto un ugual volume di cloroformio, che ha la funzione di denaturare le proteine, che, in seguito, andranno incontro a precipitazione. Le provette sono state messe ad agitare energicamente per qualche minuto tramite l'utilizzo del vortex e per poi essere centrifugate a 12.000 rpm per dieci minuti a 10° C.
- 5) Sempre sotto cappa chimica, è stata prelevata un'aliquota di 700 µL del surnatante che è stato trasferito in provette da 1.5 mL, aggiungendo isopropanolo freddo nella proporzione di 1:1 (per 700 µL di surnatante, 700 µL di isopropanolo) per far avvenire la precipitazione degli acidi nucleici. Dopo aver agitato delicatamente le provette, queste sono state conservate in frigorifero alla temperatura di 4°C per dieci minuti e infine sono state messe in centrifuga (Fig. 9) per 25 minuti a 13.000 rpm.
- 6) Le provette sono state svuotate, e il pellet (acidi nucleici precipitati) depositato sul fondo è stato lavato con 400 µL di etanolo al 70%, per purificarlo da eventuali sali residui. Le eppendorf, poste in centrifuga per dieci minuti alla velocità di 13.000 rpm, sono state svuotate delicatamente, lasciate ad asciugare capovolte su della carta assorbente per eliminare gli eccessi di etanolo (Fig. 10).
- 7) Il pellet presente in ciascuna delle provette è stato sospeso in 60 µL di H₂O sterile e conservate in frigo a 4°C in attesa di essere processato.
- 8) È stata valutata la qualità e la quantità degli acidi nucleici estratti. È stato utilizzato un biofotometro che ha permesso di verificare il rapporto 260/280, 260/230 per avere un'idea della qualità del DNA estratto, e la concentrazione per microlitro.

2.4 Amplificazione genica (PCR)

La reazione di PCR nota come amplificazione genica, è una tecnica molecolare che consente di rilevare la presenza del DNA target del patogeno all'interno del pool di DNA totale estratto dalla pianta ospite. In particolare, il DNA totale è stato diluito 1:40 e 1 μL è stato utilizzato come template nella reazione di amplificazione che è stata effettuata in 25 μL . La reazione di amplificazione era costituita di 12,5 μL di GT PCR Master Mix 2X (EmeraldAmp, Takara), a cui sono stati aggiunti 1,2 μL dei primer Ch5860F/Ch6093R alla concentrazione di 10 μM .

Tabella 2- 1: Reagenti con le relative quantità per l'amplificazione.

| Reagenti | μL per una reazione | μL per 67 reazioni |
|---------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Acqua | 8,6 | 576,2 |
| Master Mix 2X | 12,5 | 837,5 |
| Primer F | 1,2 | 80,4 |
| Primer R | 1,2 | 80,4 |
| DNA (1:40) | 1,5 | |

La coppia di primer utilizzati è specifica per la diagnosi del virus del mosaico del castagno (ChMV), un badnavirus caratterizzato da un genoma a DNA.

Il programma di amplificazione consisteva in un ciclo di denaturazione iniziale a 95°C per 3 min seguito da tre fasi: denaturazione (95° C per 30 sec), appaiamento dei primer (60 °C per 30 sec) ed estensione (72°C per 30 sec), ripetute per 35 cicli, con un ciclo ulteriore di estensione a 72°C per 5 min.

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

2.5. Visualizzazione dei risultati dell'amplificazione genica mediante elettroforesi

Al termine dell'amplificazione, è stato predisposto tutto il necessario per la corsa elettroforetica:

- 1) il gel è stato preparato in un becher da 100 mL. Il TAE 1x è una soluzione composta da Tris base, acido acetico glaciale 100%, EDTA e H₂O. È stato aggiunto 1.5 g di agarosio, portato a ebollizione su di una piastra riscaldante per far sì che il polimero si scioglia, anche grazie all'aiuto di un'ancoretta magnetica in continua rotazione sul

fondo del becher. Il tutto viene tolto dalla piastra quando la soluzione diventa trasparente. La soluzione è stata fatta raffreddare a temperatura ambiente;

- 2) Il composto è stato versato in un supporto predisposto facendo attenzione a non creare bolle d'aria (che potrebbero ostacolare la corsa del DNA). Prima che il gel si solidifichi è stato inserito un pettine che determinerà le dimensioni dei pozzetti nei quali saranno caricati i campioni.
- 3) Una volta che il gel si è solidificato, sono stati caricati i campioni precedentemente preparati con un opportuno colorante (il quale fungerà da indicatore di corsa), da sinistra verso destra. Il primo pozzetto è utilizzato per caricare il marker 100 bp, che presenta specifiche bande da 100 a 1000 bp, gli altri di seguito sono stati caricati 10 μ L per ciascun campione analizzato. Nella reazione di amplificazione e quindi anche nel gel sono stati caricati inoltre, il controllo positivo (DNA di ChMV) e un controllo negativo (acqua sterile).
- 4) la cella elettroforetica è stata chiusa, collegata al generatore di corrente. I campioni sono stati fatti correre in tampone TAE a 100 V per 30 minuti (Fig. 13 sinistra). Al termine della corsa, il gel è stato estratto dal supporto per osservarlo ai raggi UV tramite il transilluminatore BIO-RAD Gel Doc XR provvisto di sistema per l'acquisizione di immagini.

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il castagno può essere affetto da diverse problematiche fitosanitarie, in particolare in questa ricerca il focus è stato fatto su una malattia a lungo conosciuta come mosaico del castagno (Desvignes, 1992), ma la cui eziologia era sconosciuta. Solo recentemente è stato possibile definire che tale malattia è associata alla presenza di un badnavirus, denominato dal sintomo principale come *Chestnut mosaic virus* (Marais *et al.*, 2021).



Fig. 9-14 – Sintomi determinati dal virus del mosaico del castagno riscontrati su accessioni conservate all'interno della collezione del germoplasma presso Chiusa Pesio (CN).

Tabella 3-1: Risultati dell'analisi visiva dei campioni di castagno.

| Codice campione | Specie | Sintomi potenzialmente riconducibili a virosi |
|------------------------|-------------------------------|--|
| C07 | <i>C. sativa</i> | Sintomatico |
| D18 | <i>C. crenata</i> | Asintomatico |
| D3 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| D4 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| D6 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| E18 | <i>C. crenata</i> | Sintomatico |
| E19 | <i>C. crenata</i> | Asintomatico |
| E3 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| F10 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| F13 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| F18 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| F19 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| F20 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| F21 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| F28 | <i>C. dentata</i> | Asintomatico |
| F3 | <i>C. sativa</i> | Sintomatico |
| F4 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| G07 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| G09 | <i>C. sativa</i> | Sintomatico |
| G1 | <i>C. sativa</i> | Sintomatico |
| G10 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| G13 | <i>C. crenata</i> | Sintomatico |
| G14 | <i>C. crenata</i> | Asintomatico |
| G16 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Sintomatico |
| G18 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Sintomatico |
| G19 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| G20 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| G24 | <i>C. mollissima</i> | Asintomatico |
| G26 | <i>C. mollissima</i> | Asintomatico |
| G29 | <i>C. dentata</i> | Asintomatico |
| G3 | <i>C. sativa</i> | Sintomatico |
| H05 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Sintomatico |

| | | |
|-----|-------------------------------|--------------|
| H06 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| H13 | <i>C. Crenata</i> | Sintomatico |
| H29 | <i>C. dentata</i> | Asintomatico |
| I10 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Sintomatico |
| I21 | <i>C. mollissima</i> | Asintomatico |
| I3 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| L20 | <i>C. mollissima</i> | Asintomatico |
| M18 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| M19 | <i>C. mollissima</i> | Asintomatico |
| N10 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| N16 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| N9 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| O08 | <i>C. sativa</i> | Sintomatico |
| O14 | <i>C. crenata</i> | Asintomatico |
| P11 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Sintomatico |
| R10 | <i>C. sativa</i> | Sintomatico |
| R8 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| S3 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| S5 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| S7 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Sintomatico |
| S8 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| T2 | <i>C. sativa</i> | Sintomatico |
| U1 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| U6 | <i>C. sativa</i> | Asintomatico |
| V3 | <i>C. sativa X C. crenata</i> | Asintomatico |
| V4 | <i>C. sativa</i> | Sintomatico |
| W2 | <i>C. sativa</i> | Sintomatico |

Dalle analisi visive effettuate presso il campo collezione del germoplasma castanicolo presso il Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte, è stato possibile verificare la presenza di piante che mostravano alterazioni di colore settoriale o diffuse a tutta la chioma. I sintomi prevalentemente registrati possono essere descritti come mosaico e malformazioni delle foglie (Figg. 9-14). La malattia produce delle alterazioni variamente marcate a livello delle foglie, e la gravità dei sintomi tende ad intensificarsi col progredire della stagione vegetativa, culminando al termine dell'estate. In particolare, si osservano dapprima delle decolorazioni 'a mosaico' sulla zona internervale con ripiegatura a doccia della lamina fogliare. Successivamente questi sintomi si acutizzano e si completano con l'arricciamento

della foglia, e con la presenza di necrosi irregolari sui margini. Inizialmente le foglie sintomatiche si concentrano limitatamente su alcune branche, e ciò produce sulla chioma delle aree a colorazione più giallastra, piuttosto caratteristiche e distinguibili anche a distanza per la differenza di colore. In seguito, le alterazioni si estendono anche sulle altre branche fino ad interessare talvolta l'intera chioma. Nella regione Marche, in particolare nell'acasantano, la malattia si diffonde all'interno del castagneto 'a macchia di leopardo', e colpisce piante di qualsiasi età, sia completamente sane sia affette da altri patogeni fungini, come *Cryphonectria parasitica* e *Phytophthora cambivora*, rispettivamente gli agenti del cancro corticale e del mal dell'inchiostro. Inoltre, colpisce soprattutto i Marroni, e alcune prove in campo ne hanno dimostrato la trasmissibilità tramite innesto del castagno sia da portainnesto selvatico che dalla varietà locale di Marrone. Poiché il giallume è un sintomo legato a una non adeguata e sufficiente fotosintesi, colpendo l'apparato fogliare, il danno più serio è il deperimento progressivo della pianta, che compromette la produzione dei frutti e che causa quindi una perdita in termini di resa economica nei castagneti da frutto.



Figg. 15-16 – Sintomi fogliari ascrivibili ad attacco di fersa del castagno, determinata da *Mycosphaerella maculiformis*

Durante l'analisi visiva è stato possibile verificare su alcune piante la presenza di fersa, il cui agente è *Mycosphaerella maculiformis*. Il fungo ascomicete attacca in prevalenza le foglie, ma può anche colpire i ricci, i piccioli fogliari e i peduncoli fiorali. Sulle foglie provoca delle punteggiature circolari e scure, che tendono ad allargarsi e ad associarsi, fino al disseccamento completo (Figg. 15-16), l'accartocciamento e la caduta precoce delle foglie stesse, mentre i ricci assumono una colorazione rossastra e cadono prematuramente. I danni si acutizzano in condizioni di elevata umidità e in stagioni particolarmente piovose.

La possibilità di fare uno screening visivo su un numero elevato di varietà di interesse internazionale, nazionale e locale, all'interno del campo collezione della regione Piemonte ha permesso di ottenere dei dati preliminari su come le diverse accessioni possono essere più o meno suscettibili alle infezioni indotte dal virus del mosaico del castagno (*Chestnut mosaic virus*).

Un passo in avanti è stato effettuato andando ad utilizzare tecniche diagnostiche basate sul rilevamento degli acidi nucleici. È stato validato un protocollo di estrazione del DNA totale partendo da foglie di castagno. Il protocollo ha permesso nel giro di qualche ora di ottenere dai 300 ai 750 ng/μl di DNA per circa 24 campioni. Anche la qualità del DNA estratto ha soddisfatto, nella maggior parte dei casi, i limiti di qualità indicati dalle letture allo spettrofotometro ($260/280 > 1,8$; $260/230 > 1,8$).

Inoltre, nella presente tesi sono stati utilizzati una coppia di primer (Ch5860F/Ch6093R) specifici per la diagnosi del Badnavirus associato al mosaico del castagno. Tali primer sono stati disegnati sulla base della recente pubblicazione del genoma di questo virus (Marais *et al.*, 2021).

Dall'analisi dei 58 campioni analizzati è stato possibile verificare mediante la diagnosi molecolare, la presenza del virus anche in piante che all'analisi visiva erano state considerate asintomatiche. In particolare, il virus è presente in 25 delle 39 piante asintomatiche (Tab.3-2). Un dato che emerge, andando a raggruppare i campioni in base alla specie, è che il virus è stato rinvenuto in piante asintomatiche della specie *C. sativa*. Il virus è stato rinvenuto naturalmente anche in piante che mostravano sintomi di mosaico e malformazioni fogliari.

Tabella 3-2: Risultati della diagnosi molecolare di ChMV

| Specie | n. campioni | Diagnosi su base visiva | | Diagnosi molecolare | |
|-------------------------------|-------------|-------------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | | Asintomatici | Sintomatici | Asintomatici | Sintomatici |
| <i>C. crenata</i> | 7 | 4 | 3 | 1 | 1 |
| <i>C. dentata</i> | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>C. mollissima</i> | 5 | 4 | 1 | 1 | 0 |
| <i>C. sativa</i> | 25 | 15 | 10 | 12 | 9 |
| <i>C. sativa X C. crenata</i> | 19 | 13 | 6 | 11 | 3 |
| Totale | 58 | 39 | 20 | 25 | 13 |

La suscettibilità all'agente ChMD delle specie/cultivar Castanea è stata valutata in diversi studi (Desvignes, 1992; 1999b; Desvignes e Lecoq, 1995). Si potrebbero così definire tre categorie di cultivar da tollerante a moderatamente e completamente suscettibile. L'incompatibilità dell'innesto è stata osservata anche quando cultivar di diversa suscettibilità sono assemblate mediante innesto. La maggior parte delle cultivar e degli ibridi di *C. sativa* sono tolleranti al ChMD, sebbene alcuni ibridi francesi ben noti come "Maraval" (Ca 74) siano completamente suscettibili e utilizzati per scopi di indicizzazione per rilevare l'agente ChMD in cultivar tolleranti (Desvignes e Lecoq, 1995).

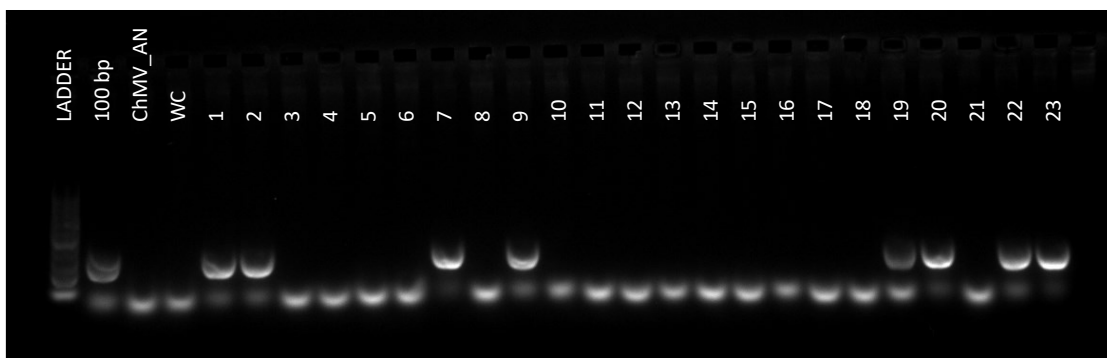


Fig. 17 – Risultati dell'amplificazione genica utilizzando primer specifici per la diagnosi del virus del mosaico del castagno.

Oltre ai sintomi di mosaico e malformazione fogliare, su alcuni campioni è stato rinvenuto un ingiallimento più generalizzato che sembrava più legato a carenze nutrizionali (Figg. 18-19). Tali sintomi sono stati anche registrati in Trentino – Alto Adige, in castagni che quando sottoposti ad analisi chimiche hanno evidenziato marcate carenze nutrizionali legate al manganese e al ferro (Bertoldi *et al.*, 2020).



Figg. 18-19 – Sintomi di carenza da manganese e ferro.

CONCLUSIONI

In conclusione, la presente ricerca ha permesso di validare un protocollo per l'estrazione del DNA partendo da foglie di castagno, di validare un set di primer specifici per la diagnosi del virus del mosaico del castagno e verificare la presenza del virus in piante asintomatiche.

Tali dati sono particolarmente importanti in un momento in cui si parla di certificazione del materiale di propagazione di castagno. Una castanicoltura moderna e competitiva, tradizionale o intensiva che sia, richiede il rispetto degli stessi standard operativi anche per la difesa della tradizione nazionale dalla quale deriva. Il processo della produzione di piante certificate si realizza nelle fasi di conservazione, premoltiplicazione, moltiplicazione e vivaio. Nei contesti della frutticoltura maggiore il processo di produzione di piante certificate è una realtà assodata da molti anni. Le piante commercializzate sono garantite e certificate per qualità fitosanitaria e rispondenza alle caratteristiche varietali. I principali obiettivi della certificazione genetico-sanitaria sono la produzione di materiale in linea con standard genetici e fitosanitari, il miglioramento della qualità delle produzioni frutticole e la tracciabilità di filiera (Gamba e Mellano, 2021).

Per tale ragione gli strumenti diagnostici utilizzati in questa ricerca potranno essere particolarmente utili ai fini dell'individuazione di piante capostipite "virus esenti", che potranno essere ceduti alla filiera vivaistica nazionale per la produzione finale di piante di categoria 'certificato'.

BIBLIOGRAFIA

- Antonaroli, R., and Perna, M. R. 2000. Una fitopatologia ad eziologia ancora incerta: il giallume del castagno in Emilia Romagna e nelle Marche. *Sherwood* 6:43-46.
- Baldacci E., Orsenigo M., 1952. Chestnut blight in Italy. *Phytopathology*, **42** (4), 38 - 39.
- Bertoldi D, Miorelli P, Pedrazzoli F, Delugan S, Deromedi M, Maresi G (2020). Investigations on yellowing of chestnut crowns in Trentino (Alps, Northern Italy). *iForest* 13: 466-472. - doi: 10.3832/ifor3488-013.
- Bounous G., 2002. Situazione in Italia. In *Il castagno - coltura, ambiente ed utilizzazioni in Italia e nel mondo*, ed. Bounous G., 191 - 192. Bologna: Edagricole.
- Bounous G., 2002. Caratteristiche botaniche. In *Il castagno - coltura, ambiente ed utilizzazioni in Italia e nel mondo*, ed. Bounous G., 29 - 45 Bologna: Edagricole.
- Conedera, M., Tinner, W., Krebs, P., de Rigo, D., and Caudullo, G. 2016. *Castanea sativa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. Pages 78-79 in: *European Atlas of Forest Tree Species*. J. San-Miguel-Ayanz, D. de Rigo, G. Caudullo, T. Houston Durrant, and A. Mauri, eds. Publ. Off. Eu, Luxembourg.
- Desvignes, J. C. 1992. Characterization of the chestnut mosaic. *Acta Hort.* 309:353-358.
- Desvignes, J. C. 1999a. Mosaïque du chataignier. Pages 179-181 in: *Maladies à Virus des Arbres Fruitières*. CTIFL, France.
- Desvignes, J. C. 1999b. Sweet chestnut incompatibility and mosaics caused by the chestnut mosaic virus (ChMV). *Acta Hort.* 494:451-454.

- Desvignes, J. C., and Cornaggia, D. 1996. Mosaique du chataignier: Transmission par le puceron *Myzocallis castanicola*. *Phytoma* 481:39-41.
- Desvignes, J. C., and Lecocq, G. 1995. New knowledges on the chestnut mosaic virus disease. *Acta Hortic.* 386:578-584.
- Gamba G., Mellano M.G. 2021. Nasce la certificazione vivaistica volontaria per la castanicoltura italiana: istituito dal Mipaaf il centro per la conservazione e la premoltiplicazione del castagno.
- Gualaccini, G. 1958. Una virosi nuova del castagno. *Boll. Staz Patol. Veg. Roma* 16:67-75.
- Marais A., Murolo S., Faure C., Brans Y., Larue C., Maclot F., Massart S., Chiumenti M., Minafra A., Romanazzi G., Lefebvre M., Barreneche T., Robin C., Petit R. J., and Candresse T. 2021. Sixty Years from the First Disease Description, a Novel Badnavirus Associated with Chestnut Mosaic Disease.
- Murolo S., Mancini V., Romanazzi G., 2014. Spatial and temporal stolbur population structure in a cv. Chardonnay vineyard according to *tompl* gene characterization. *Plant Pathology* 63, 700-707.
- Petri L., 1917a. Ricerche sulla morfologia e biologia della *Blepharospora cambivora*, parassita del castagno. *Rend. R. Ac. Lincei*, **26**, 287 - 299.
- Petri L., 1917b. Studi sulla malattia del Castagno detta “dell’inchostro”. *Firenze, M. Ricci ed.* pag. 182.
- Petri L., 1930. La formazione degli organi della riproduzione sessuale della *Phytophthora (Blepharospora cambivora)* in culture pure. *Boll. Staz. Pat. Veg. Roma*, **10**, 361 - 365.
- Ragozzino, A., and Lahoz, E. 1986. Una malattia virus-simile del castagno in provincia di Avellino. *Giornate di studio sul castagno. Soc. Orti. Italiana* 307-311.

Rigling, D., and Prospero, S. 2018. *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Mol. Plant Pathol.* 19:7-20.

Turchetti T., Ferretti F., Maresi G., 2008. Natural spread of *Cryphonectria parasitica* and persistence of hypovirulence in three Italian coppice chestnut stands. *Forest Pathology*, **38**, 227-243.