

SUSCETTIBILITÀ DI ALCUNE CULTIVAR DI CASTAGNO A *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI*

L. GIORDANO^{1,2}, D. TORELLO MARINONI¹, P. GONTHIER¹

¹ Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA) - Largo Paolo Braccini, 2, I-10095 Grugliasco (TO)

² Università degli Studi di Torino, Centro di Competenza per l'Innovazione in Campo Agro-Ambientale (Agroinnova) - Largo Paolo Braccini 2, I-10095 Grugliasco (TO)
paolo.gonthier@unito.it

RIASSUNTO

La coltura del castagno ha da sempre svolto un ruolo di primo piano nell'economia del mondo rurale, ma la diffusione di avversità come il mal dell'inchiostro, causato da oomiceti appartenenti al genere *Phytophthora*, ne hanno provocato la progressiva perdita di importanza. Obiettivo del presente lavoro è stato confrontare la suscettibilità al patogeno *Phytophthora cinnamomi*, agente del mal dell'inchiostro, di due cultivar di castagno europeo, Marrone di Villar Pellice e Giovasca, e una cultivar ibrida euro-giapponese, Marigoule. Piante di sei mesi allevate in vaso sono state artificialmente inoculate incorporando colonie del patogeno direttamente nel substrato di crescita. La comparsa di sintomi della malattia o l'eventuale sopraggiungere della morte sono stati monitorati a cadenza settimanale per circa due mesi. I risultati dello studio hanno evidenziato che le varietà Marrone di Villar Pellice e Giovasca sono egualmente suscettibili al patogeno, con tassi di mortalità pari rispettivamente al 100% e al 86,7%. Al contrario, la varietà Marigoule è risultata significativamente più resistente (mortalità: 20%). Tale risultato è in accordo con quanto riportato in letteratura circa la nota tolleranza nei confronti di *Phytophthora* spp. delle cultivar ibride euro-giapponesi.

Parole chiave: mal dell'inchiostro, *Phytophthora* spp., oomiceti, suscettibilità varietale

SUMMARY

SUSCEPTIBILITY OF SOME CHESTNUT CULTIVARS TO *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI*

European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) has been cultivated for thousands of years for both fruit and wood production and it plays an important economic role in many countries. However, several phytopathological problems, such as ink disease caused by *Phytophthora* spp., seriously threatened the survival of this plant species. The aim of this study was to compare the susceptibility to *Phytophthora cinnamomi* of two cultivars of European chestnut, Marrone di Villar Pellice and Giovasca, and a Euro-Japanese hybrid cultivar, Marigoule. Six-months-old seedlings were artificially inoculated by mixing colonies of the pathogen directly in the growth medium. Subsequently, they were inspected for appearance of disease symptoms or seedling death for two months. Results showed that two European cultivars, Marrone di Villar Pellice and Giovasca, were equally susceptible to *P. cinnamomi* with 100% and 86.7% mortality, respectively. The Euro-Japanese hybrid cultivar, Marigoule, was significantly more resistant than European cultivars (mortality: 20%). This finding agrees with previous studies demonstrating the tolerance of Euro-Japanese hybrid cultivars of chestnut to *Phytophthora* spp.

Keywords: ink disease, *Phytophthora* spp., Oomycetes, host susceptibility

INTRODUZIONE

La coltura del castagno (*Castanea sativa* Mill.) ha da sempre svolto un ruolo di primo piano nell'economia del mondo rurale italiano. Tuttavia, il progressivo spopolamento delle aree montane e collinari particolarmente vocate alla coltivazione del castagno da un lato, e la diffusione di una serie di avversità dall'altro, ne hanno provocato la progressiva perdita di importanza.

In passato, il mal dell'inchiostro e il cancro corticale sono state senza dubbio le più importanti malattie del castagno tanto da condizionarne la produttività e la gestione, fino a minacciarne la sopravvivenza stessa per via degli effetti delle epidemie verificatesi. Il mal dell'inchiostro, i cui agenti eziologici sono oomiceti appartenenti al genere *Phytophthora*, in modo particolare *P. cambivora* (Petri) Buisman e *P. cinnamomi* Rands., è stato il primo flagello per i castagneti europei ed italiani (segnalato già alla fine del 1800). La malattia, che colpisce indifferentemente piante giovani e vecchie, consiste principalmente in una necrosi sottocorticale a carico dell'apparato radicale e della parte basale del fusto. A queste alterazioni fanno seguito la comparsa di sintomi di deperimento in chioma fino al totale disseccamento della pianta e alla sua morte. Il cancro del castagno, il cui agente eziologico è *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr., è invece comparso in Europa intorno al 1924 in Belgio e in Italia nel 1938. Il cancro corticale è stata una delle cause dell'abbandono dei castagneti fino alla fine degli anni '70, quando la diffusione naturale della forma ipovirulenta del fungo ha favorito una lenta, ma progressiva ripresa della castanicoltura.

Tuttavia, negli ultimi due decenni una serie di nuove problematiche sia di natura fitopatologica che di natura entomologica hanno nuovamente minacciato il castagno. Alla fine degli anni '90, inizio anni 2000, gravi recrudescenze di mal dell'inchiostro sono state segnalate in diverse aree castanicole italiane ed europee (Vettraino et al., 2001 e 2005). A partire dal 2002, il castagno è stato interessato da un'importante avversità di origine entomologica, causata dall'imenottero galligeno *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu. L'insetto, originario del nord della Cina, è ritenuto unanimemente uno degli insetti più nocivi per il castagno in tutto il mondo. Dalle aree di prima segnalazione, situate in provincia di Cuneo, *D. kuriphilus* si è rapidamente diffuso in tutto l'areale castanicolo italiano giungendo fino in Campania e Calabria e diffondendosi anche oltralpe (Brussino et al., 2002; Turchetti et al., 2012). Questa specie, non segnalata in precedenza in Europa, è in grado di provocare la formazione di galle su foglie e germogli dei castagni, compromettendo lo sviluppo vegetativo delle piante e la fruttificazione. Fortunatamente, grazie agli ottimi risultati ottenuti con pratiche di lotta biologica mediante l'introduzione del parassitoide *Torymus sinensis* Kamijo, in diverse aree castanicole le infestazioni sono in fase di regressione. Dal punto di vista fitopatologico, altre due problematiche sono diventate oggetto di recenti attenzioni quali un grave fenomeno di deperimento che sta interessando superfici sempre più vaste sia a ceduo che a fustaia ed associato ad una recrudescenza del cancro corticale causato da *C. parasitica* (Boni et al., 2014) e il marciume delle castagne, causato dal fungo *Gnomoniopsis castaneae* G. Tamiotti (Visentin et al., 2012).

Sulla base delle esperienze acquisite nel corso degli anni, è ormai ampiamente riconosciuto che la gestione integrata dei castagneti rappresenta senza dubbio la migliore strategia per una corretta difesa di questa importante coltura nei confronti delle principali avversità soprattutto di natura patologica. In molti casi, infatti, non sono disponibili specifiche strategie di contenimento e la completa eradicazione è spesso impossibile. Questo è particolarmente vero nel caso del mal dell'inchiostro per il quale rilevante importanza hanno soprattutto la scelta di ambienti vocati alla coltura, l'allestimento di opere di drenaggio e di regimazione delle acque superficiali al fine di ridurre i ristagni idrici ed il ruscellamento, la rimozione delle piante infette e idonei

trattamenti endoterapici (Gentile et al., 2009). Recentemente, nei confronti del mal dell'inchiostro è stato messo a punto un programma di lotta integrata con ottime prospettive applicative volto al contenimento dei sintomi della malattia in chioma e alla riduzione della pressione di inoculo nel suolo (Vannini et al., 2009; Vettraino et al., 2010). La scelta di materiale di propagazione sano e l'impiego di cultivar non solo tolleranti al patogeno, ma anche vigorose e produttive, rappresentano altre due valide strategie per prevenire nuovi focolai di infezione. Negli ultimi 20 anni, numerosi programmi di ibridazione sono stati avviati a tal riguardo, seppur con risultati spesso contrastanti (Robin et al., 2006; Miranda-Fontaiña et al., 2007). Attualmente non si conoscono cultivar di castagno europeo resistenti o quantomeno tolleranti alla malattia (Vannini et al., 2014).

In tale contesto, obiettivo del presente lavoro è stato confrontare la suscettibilità al patogeno *P. cinnamomi*, agente del mal dell'inchiostro, di alcune cultivar di castagno.

MATERIALI E METODI

Un saggio di suscettibilità varietale è stato condotto su piante da seme di due cultivar di castagno europeo, Marrone di Villar Pellice e Gioviasca, che in campo presentavano segni di tolleranza al mal dell'inchiostro, e di una cultivar ibrida euro-giapponese, Marigoule, notoriamente tollerante nei confronti di *P. cinnamomi*. L'origine varietale del materiale utilizzato è stata verificata geneticamente secondo il protocollo di Torello Marinoni et al. (2013).

Piante di sei mesi allevate singolarmente in vaso sono state artificialmente inoculate, incorporando direttamente nel substrato di crescita colonie di circa un mese di età di *P. cinnamomi*, cresciute in capsule Petri da 9 cm di diametro. Per ciascuna cultivar, sono state inoculate 15 piante e ulteriori 15 piante non inoculate sono state impiegate come controlli di riferimento, per un totale di 90 piante. Le piante così allestite sono state poste in incubazione in cella climatica alla temperatura di $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio (figura 1).

Nel corso della prova sperimentale, tutte le piante sono state monitorate a cadenza settimanale per circa due mesi allo scopo di valutare la comparsa di sintomi della malattia o dell'eventuale sopraggiungere della morte. Al termine della prova sperimentale, tentativi di isolamento a partire dai tessuti necrotizzati sono stati eseguiti allo scopo di verificare non solo la vitalità del patogeno inoculato, ma anche l'effettiva associazione tra le alterazioni osservate e la presenza del patogeno.

Per ciascuna cultivar è stato calcolato il tasso di mortalità espresso come rapporto tra le piante morte al termine della prova sperimentale e il numero totale di piante inoculate. Le analisi statistiche, eseguite mediante R 3.2.3 (R Core Team, 2015), sono state condotte sulle frequenze assolute di mortalità mediante test esatto di Fisher. La soglia di significatività è stata fissata al 5%. Per i confronti multipli è stata impiegata la correzione di significatività di Benjamini e Hochberg.

Figura 1. Fasi di allestimento della prova di inoculazione di piante di 6 mesi con *Phytophthora cinnamomi*: a) preparazione delle piante; b) preparazione di una colonia di *P. cinnamomi*; c) inoculazione mediante l'inserimento dell'intera colonia di *P. cinnamomi* direttamente nel substrato di crescita; d) piante inoculate poste in incubazione in una cella climatica alla temperatura di $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio



RISULTATI E DISCUSSIONE

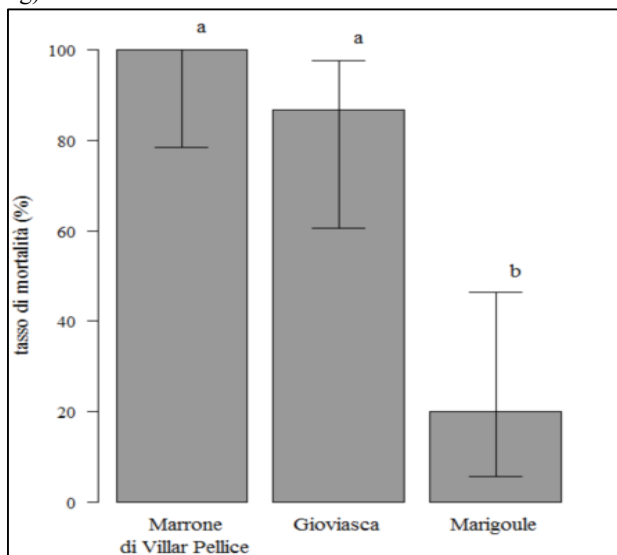
Nel corso della prova sperimentale, le piante hanno progressivamente manifestato sintomi di deperimento, quali ingiallimento ed avvizzimento delle foglie, tipicamente associati alle infezioni da *P. cinnamomi*, fino al sopraggiungere della morte. Né sintomi di deperimento né mortalità sono stati osservati nel caso delle piante non inoculate.

I risultati dello studio hanno in particolare evidenziato che le cultivar di castagno europeo Marrone di Villar Pellice e Gioviasca sono egualmente suscettibili al patogeno, con tassi di mortalità al termine della prova pari rispettivamente al 100% e al 86,7% (figure 2 e 3). Al contrario, la cultivar ibrida euro-giapponese Marigoule è risultata significativamente più resistente ($p \leq 0,05$; mortalità: 20%) (figura 3). Tale risultato è in accordo con quanto riportato in letteratura circa la nota tolleranza nei confronti di *Phytophthora* spp. delle cultivar ibride euro-giapponesi (Pereira-Lorenzo et al., 2016). Al contrario, la potenziale tolleranza alla malattia delle due cultivar di castagno europeo osservata in campo non è stata confermata sperimentalmente in ambiente controllato. Pertanto, come accennato in precedenza, attualmente ancora non si conoscono cultivar di *C. sativa* resistenti alla malattia (Vannini et al., 2014).

Figura 2. Piante di castagno morte nel corso della prova sperimentale. La freccia bianca in basso a destra indica una pianta di castagno morta accanto a piante ancora asintomatiche



Figura 3. Tasso di mortalità (%) con relativo intervallo di confidenza esatto al 95% delle tre cultivar oggetto di studio (Blaker, 2000). A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi ($p \leq 0,05$; test esatto di Fisher e correzione di significatività di Benjamini e Hochberg)



CONCLUSIONI

In conclusione, ulteriori studi e soprattutto programmi di ibridazione saranno necessari in futuro allo scopo di ottenere cultivar resistenti o più tolleranti alle infezioni da *Phytophthora* spp., ma nel contempo anche idonee a soddisfare le esigenze produttive, in termini tanto quantitativi quanto qualitativi, dei castanicoltori.

LAVORI CITATI

- Blaker H., 2000. Confidence curves and improved exact confidence intervals for discrete distributions. *Canadian Journal of Statistics*, 28, 783-798.
- Boni I., Ebone A., Ferraris P., Terzuolo P. G., Alma A., Beccaro G. L., Bounous G., Ferracini C., Giordano L., Gonthier P., Lione G., Mellano M. G., Raina E., Adamo D., 2014. Il deperimento dei cedui castanili e la ricerca sul castagno in Piemonte: gli eventi si ripetono? *Quaderni della Regione Piemonte - Collana "Agricoltura"* - Anno XVIII, n. 86, 38-41.
- Brussino G., Bosio G., Baudino M., Giordano R., Ramello F., Melika G., 2002. Pericoloso insetto esotico per il castagno europeo. *L'Informatore Agrario*, 37, 59-62.
- Gentile S., Valentino D., Tamietti G., 2009. Control of ink disease by trunk injection of potassium phosphite. *Journal of Plant Pathology*, 91 (3), 565-571.
- Miranda-Fontaiña M. E., Fernández-López J., Vettrano A. M., Vannini A., 2007. Resistance of *Castanea* clones to *Phytophthora cinnamomi*: testing and genetic control. *Silvae Genetica*, 56, 11-21.
- Pereira-Lorenzo S., Costa R., Anagnostakis S., Serdar U., Yamamoto T., Saito T., Ramos-Cabrer A. M., Ling Q., Barreneche T., Robin C., Botta R., Contessa C., Condera M., Martín L. M., Martín A., Gomes-Laranjo J., Villani F., Carlson J. E., 2016. Interspecific hybridization of chestnut. In: Polyploidy and hybridization for crop improvement (Mason A. S., ed.) Chapter 15. CRC Press, 379-408.
- R Core Team, 2015. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Robin C., Morel O., Vettrano A. M., Vannini A., Perlerou C., Diamandis S., 2006. Genetic variation in susceptibility to *Phytophthora cambivora* in European chestnut (*Castanea sativa*). *Forest Ecology and Management*, 226, 199-207.
- Torrello Marinoni D., Akkac A., Guaraldo P., Boccacci P., Ebone A., Viotto E., Bounous G., Ferrara A. M., Botta R., 2013. Genetic and morphological characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) germplasm in Piedmont (north-western Italy). *Tree Genetics & Genomes*, 9, 1017-1030.
- Turchetti T., Pennacchio F., D'Acqui L. P., Maresi G., Pedrazzoli F., 2012. Interventi per la gestione dei castagneti invasi dal cinipide. *Forest@*, 9, 227-235.
- Vannini A., Franceschini S., Vuono G., Natili G., Paganini R., Vettrano A. M., 2009. Integrated control protocol to mitigate and eradicate ink disease in chestnut orchards. *Acta Horticulturae*, 844, 461-464.
- Vannini A., Anselmi N., Vettrano A. M., 2014. Patologia. In: Il Castagno. Risorsa multifunzionale in Italia e nel mondo (Bounous G., ed.). Edagricole, 151-169.
- Vettrano A. M., Natili G., Anselmi N., Vannini A., 2001. Recovery and pathogenicity of *Phytophthora* species associated with a resurgence of ink disease in *Castanea sativa* in Italy. *Plant Pathology*, 50, 90-96.
- Vettrano A. M., Morel O., Perlerou C., Rocin C., Diamandis S., Vannini A., 2005. Occurrence and distribution of *Phytophthora* species in European chestnut stands, and their association with Ink Disease and crown decline. *European Journal of Plant Pathology*, 111, 169-180.
- Vettrano A. M., Franceschini S., Natili G., Paganini R., Vuono G., Alciocco D., Vannini A., 2010. Integrated control protocol (ICP) of ink disease of chestnut in central Italy: principles and future perspectives. *Acta Horticulturae*, 866, 425-430.
- Visentin I., Gentile S., Valentino D., Gonthier P., Tamietti G., Cardinale F., 2012. *Gnomoniopsis castanea* sp. nov. (Gnomoniaceae, Diaporthales) as the causal agent of nut rot in sweet chestnut. *Journal of Plant Pathology*, 94, 411-419.