

Il cancar dal cjastinâr: une epidemie blocade cu la lote biologjiche

ROMANO LOCCI *

Ristret. Il cancar dal cjastinâr e je une malatie tra lis plui tremendis dal mont. In 50 agns daspò de sô scuvierie tai Stâts Unîts de Americhe (1904) e à puartât a une situazion tâl che in di di vuê intal habitat naturâl de plante (*Castanea dentata* Borkh.) no si cjate nancje un arbul cressût di cjastinâr. Lis plantis che al moment a esistin in Americhe a son dome çocjîs che a continuin a butâ fûr menadis destinadis daspò pôc timp a murî. Rivade tal nestri continent, la malatie ta la specie europeane (*Castanea sativa* Mill.) e à produsût dams tant trements di fâ pensâ a la disparizion dal cjastinâr. Al contrari in Europe cun tecnologiis di control biologjic, indetadis da la vuarision naturâl des plantis maladis, al è stat pussibil salvâ il cjastinâr. In chestis pagjinis a vegnin riferîts e discutûts la storie da la epidemie, l'ûs di culturis ipovirulentis dal fonc par il control biologjic de malatie e il lavôr mandât indenant dal autôr e da siei colaboradôrs.

Peraulis clâf. Cancar dal cjastinâr, compatibilitât vegetative, control biologjic, *Cryphonectria parasitica*, dsRNA, ipovirulence.

Introduzion. Cuant che une plante e i siei nemîs naturâi a vivin par agns insiemit si stabilis un sorte di ecuilibri, intant che la inressite e il disvilup di ducj e doi a son sigurâts. Dut al cambie cuant che gnovis plantis, o anjemò piês, cuant che gnûfs patojens a rivin di bot. Cuasi simpri i risultâts a son disastros, come che si è viodût tal câs da la vignude in Europe da la peronospora da lis patatis (*Phytophthora infestans*) o di chê da la ue (*Plasmopara viticola*) e da la mufe blancje (*Oidium tuckeri*) simpri

* Dipartiment di Biologjie Aplicate a la Protezion des Plantis, Universitât di Udin, Italie.
E-mail: romano.locci@uniud.it

te vigne. Naturalmentri al è stât pussibil controlâ chestis malatiis doprant prodots chimics (fungjicidis), il risultât però nol è cence consequencis no dome a nivel economic, ma ancje cjalant al impat ecologic.

Un câs compagn al è chel de rivade, prime tai Stâts Unîts de Americhe (SUA) e pôc daspò in Europe de *Cryphonectria parasitica*, l'agent causâl dal cancar dal cjastinâr. A scomençâ dal inizi dal secul passât, in pocjis desenis di agns il fonic, probabilmentri rivât da l'Asie (Anagnostakis 1987), al à fat fûr ducj i cjastinârs (*Castanea dentata* Borkh.) de Americhe. Al baste ricuardâ lis peraulis di un botanic de zone (Brockman 1968) "chê che e jere une des plantis plui preseadis in Americhe e je sparide [...] o vin dome cualchi menade che e continue a tirâsi sù". Cuant che, pocjis desenis di agns daspò, la malatie e je rivade in Europe i dams a son stâts trements e duncje e someave che ancje par il cjastinâr european (*Castanea sativa* Mill.) lis consequencis a saressin stadis compagnis. Invezit tai agns Cincuante si è scomençât a viodi che diviersis plantis a rinsanavin di bessolis, salvant in pratiche il cjastinâr da la fin complete (Heininger e Rigling 1994). Chest fat al à puartât al disvilup di metodis di control biologic (biocontrol) che a àn blocât pardabon l'epidemie, almancul in Europe.

Cheste note e presente la storie dal disvilup dal cancar dal cjastinâr e il lavôr di ricercje fat intes Universitâts di Milan e di Udin.

La fonde storiche

La plante. In Americhe il cjastinâr [*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh.] al jere un element impuartant tai boscs di arbui a fuee large dai stâts orientâi (Gravatt 1949). La plante europeane, *Castanea sativa* Mill., e je une specie imparintade che e fo impuartade dai Romans da l'Asie Minôr (Huntley e Birks 1983). In Europe i cjastinârs a vegnin arlevâts come çocjis (cuntun timp di tai di 15-30 agns) o come arbui. A si cjatin dispès arbui une vore vieris, incalmâts cun varietâts dal puest (Heininger e Rigling 1994).

In ducj e doi i continents i cjastinârs a jerin di stragrande impuartance economiche. Lis cjastinis a jerin une mangjative pai cristians e pai nemâi, ancje chei salvadis. Dal arbul si gjavave il len di brusâ e il tanin. Il cjastinâr al sasone ben e a nol fraidîs facilmentri par vie dai tanins che a son presints sedi te scuarce che tal len (Nienstaedt 1953). Il len al jere

doprât in edilizie, par fâ moblie, paladis, scjatulis, botis, travièrsinis e anje struments di musiche (Rice et al. 1980). La taie de plante e à fat sì che e fos doprade, almancul tai SUA, inte planificazion urbane (Emerson e Weed 1918), e al è stât propit tai stradons ('avenues') dal zoo di New York che il cancar dal cjaminâr al è stât scuviert par la prime volte tal 1904 (Merkel 1905). I tanins a vignivin tirâts fûr massime de scuarce e a jerin impuartants te industrie de cuince dal pelam (Fowler 1944, Saucier 1973).

No van dismenteadis in fin lis consequencis sociâls de eclis dal cjaminâr. No si trate dome di economie. I cjaminârs a son impuartants in tantis nestris zonis anje di un pont di viste ecologjic. Il sbandon des tieris di montagne al à come risultive un stât di precarietà dal teritori interessât. Cuintri l'erosion e la degradazion dai terens, il cjaminâr al rapresente une sorte di difese che no va trascurade.

Il patogen. L'agent che al cause la malatie, un fonc specific, anje se al è stât cjatât sui arbui di rôl (gjenar *Quercus*), al è stât descrit la prime volte di Murrill (1906) cul non di *Diaporthe parasitica*. Pôcs agns daspò, Anderson e Anderson (1912) a àn trasferît la specie al gjenar *Endothia*, e a la fin, daspò une rivalutazion da lis *Diaporthales*, Barr (1979) al à dât al gjenar il non gnûf di *Cryphonectria* (Anagnostakis 1987). Cumò come nomencladure il non dal fonc al è *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Chestis a son cuistions academichis, al moment al è plui interessant capî alc da la biologie dal fonc e da lis sôs capacitâts di sparniçâsi.

Biologie dal fonc. *Cryphonectria parasitica* al è un ascomicêt che al forme peritecis, soterâts tal strome, cun lungjis golarinis che a finissin a pêl cuntune viertidure, l'ostiûl. I ascis a son a forme di bachete ($7-9 \times 30-60 \mu\text{m}$) e no àn parafisis. Lis ascosporis ($3,5-5 \times 7-11 \mu\text{m}$) a son bicelulârs, transparentis e tarondis a la fin. Almancul in Italie i peritecis si cjatin plui facilmentri in autun (Pratella 1978). Il stât assessuât dal fonc al consist di conidis produsûts in picnidis di colôr zâl-narant. Tal picnidi, i conidis a vegnin formâts a la ponte di conidiofars che a son ugnui o ramificâts ($1,5 \times 10 \mu\text{m}$, cualchi volte plui luncs). I conidis, trasparentis, unicelulârs e di forme cilindriche ($1,3 \times 3,6 \mu\text{m}$), cualchi volte curvâts, a si liberin dentri te cavitât dal picnidi e di chel a vegnin fûr in formazions spiraladis (cirs),

intant che la masse e je pressade insiemit al materiâl mucilagjinôs. I picnidis a son produsûts in timps diviers plui voltis ad an e ancje disore di brancs bielzà muarts (Pratella 1978).

Divignince dal fonc. Chel che o savìn al moment al ven da la note di Anagnostakis (1987). Stant il fat che i cjaminârs de Cine e dal Gjapon a mostrin resistance al cancar, i prins ricercjadôrs a àn pensât che *C. parasitica* e podès jessi origjinade in chei paîs alì (Metcalf 1908, Clapper 1952). In chê volte lis domandis diretis ai ricercjadôrs locâi no àn vût rispueste. Par altri il stes fonc che al cause il cancar dal cjaminâr al è stât isolât di materiâl mandât tal 1913 di esploradôrs (David Fairchild e Frank Meyer) ta chei paîs. La identificazion e je stade confermade di provis di inoculazion su plantis americanis di cjaminâr fatis in zonis ator di Washington, D.C. Pôcs agns dopo Meyer al à discuvier la malatie tal Gjapon e al à mandât campions tai SUA (Fairchild 1913, Shear e Stevens 1913, 1916).

Difusion dal fonc. Al inizi si crodeve (Murrill 1906) che i conidis dal fonc a podessin jessi spandûts dal aiar, ma al baste pensâ a cemût che a son formâts par capî che cheste idee no jere juste. Par altri i conidis a restin vitâi tal len par une vore di timp e a podin jessi spandûts dal aiar cul polvar (Heald e Gardner 1914). Di chê altre bande lis ascosporis a vegnin butadis fûr cun fuarce dai asc. Heald et al. (1915) a àn fat viodi che, cuant che la scuarce si secje dopo di une ploie, e discjame ascosporis par almancul 14 oris. Dopo il sec, a bastin 4,5 mm di ploie par butâ fûr quantitâts tremendis di ascosporis.

Conidis a son stâts cjatâts in bondance sul cuarp di nemâi. Ricercjis che a van indaûr fin al timp de prime vignude dal patogen tai SUA (Craighead 1912, Studhalter 1914, Studhalter e Ruggles 1915) par rivâ a chês di date plui resinte (Wendt et al. 1983, Russin et al. 1984), a mostrin che a son i conidis chei che a vegnin plui dispès isolâts tai nemâi. I vetôrs plui impuartants a somein jessi *Strophiona nitens* Forster, *Ectodema phleophaga* Bsk. e *Leptostylus maculata* Say. Cuant che i cancars si movin, a son simpri i uciei e piçui mamifars (sghirats, glîrs, surîs e v.i.) che a puedin cjapâ sù propagui dal fonc. Chest al è stât provât studiant l'aghe doprade par lavâiu (Heald e Studhalter 1914, Scharf e De Palma 1981).

Ancje l'om al jude, massime cuant che al môf plantis e lens infetâts. Lens no scussâts di *Castanea* e di *Quercus* a puartin ator micelis, picnidis e peritecis. Tal ultin ancje lis cjastinis a puedin jessi infestadis (Jaynes e De Palma 1984).

La malatie

Sintomatologjie. *Cryphonectria parasitica* al è un patogjen di feride. Al infete çoncs e brancs cressint dentri da la scuarce fin tal cambi e formant i cancars. Cuant che il branc al ven cercenât la part disore de plante e flapès e e mûr. La lidrîs no ven infetade e lis çocjîs a continuin a butâ. I sintoms plui tipics a son chei presints ta lis bandis legnosis de plante e a puedin cambiâ daûr dal grât di svilup dal cjastinâr. Butui e brancs une vore zovins a mostrin maglis malavuâls colôr ros modon e i tiessûts a son un ninin tirâts sù pai ôrs. Disot de scuarce si viôt une masse di miceli colôr creme. Tai brancs plui madûrs, par altri no lignificâts dal dut, lis maglis a son plui slungjadis e un pôc incassadis te scuarce. Lant indenant l'infezion e finîs par cercenâ il branc e chest al mostre dispès sglonfaduris (cressite ipertrofiche) cun sclapaduris svilupadis par lunc. I cancars tipics a si cjatin tai brancs lignificâts. Il tiessût de scuarce al mostre sclapaduris fondis e si distache cun facilitât. Disot al è presint un feltri stromatic di miceli, colôr creme, svilupât a svintule. I arbui infetâts si puedin viodi ancje di lontan jessint che lis fueis secjîs a restin tacadis a lis ramacis e par il fat che si viodin une vore di butadis disot dai cancars (Pratella 1987).

Difusion dal cancar dal cjastinâr. Come che o vin za dît, la malatie e je stade osservade pe prime volte sui cjastinârs americans dal sierai des bestiis di New York tal 1904 (Merkel 1905). Pôc dopo *C. parasitica* si è spandude fûr dal stât di New York fiscant dut l'habitat naturâl dal cjastinâr american dal Maine ae Alabama e a ovest fin tal confin meridionâl dal Michigan. Cul fonic che al lave indenant a la velocitât di uns 40 chilometri ad an, daspò 50 agns a jerin 3,6 milions i etars dulà che i cjastinârs a jerin muarts o a stavin par murî (Anonymous 1954) e nol jere pussibil fermâ l'epidemie. Cerpîduris e trataments cun il solfât (mixture di Bordeaux) no puartavin a nuie (Murrill 1906). I forestâi statâi a podevin fâ pôc e si ridusevin a dâ conseis su ce fâ cun il len muart o su trop timp che al podeve resisti san par jessi vendût (Anagnostakis 1987).

La rivade ufiçiâl de *C. parasitica* in Europe e pues jessi datade tal 1938 (Biraghi 1946). I prins centris a son stâts discuierts tal Apenin de Liguria dongje Gjenue, un dai puarts plui impuartants de Italie, e ancje te provincie di Udin e tal sud intune piçule zone dongje di Avelin. In ogni câs la difusion e je stade imburide e cuasi ducj i cjaminârs a risultavin infetâts a la fin dai agns Cuarante (Baldacci e Picco 1947). Ator dal 1950 Biraghi al notave come che il cancar al fos presint in dutis lis regions di colture dal cjaminâr. Lui al conseave di butâ jù i arbui muarts a nivel dal teren par ridusi la contaminazion (Biraghi 1953). Seont cualchi espert dal timp (Del Guerra 1948) il cancar al sarès rivât cualchi an prime cence che nissun si fos inacuarzût. Tai agns Vincj in Italie e in altris paîs confinants e jere stade impuartade dal Gjapon *Castanea crenata*, une specie resistant al mâl dal ingjustri. *Cryphonectria parasitica* al è un patogjen debil dal cjaminâr asiatic e al somee pussibil che al fos rivât chês volte.

Da l'Italie il fonc si è spandût tai paîs confinants (Tabele 1). In diviers puescj la malatie no sarès stade notade pe stesse reson, cuvierte dal mâl dal ingjustri o dai dams de criure (Heiniger e Rigling 1994).

Seont cualchi autôr *Castanea sativa* e je un ninin plui resistente al cancar di *C. dentata*. Il fat al slungjarès il timp che al passe da la infezion fin

Tabele 1. La epidemie dal cancar dal cjaminâr in Europe (seont Heiniger e Rigling, 1994) (A: Prime discuierte de *Cryphonectria parasitica*; B: Prime discuierte dal rinsanament dai cancars; C: An dal isolament di culturis ipovirulentis; D: Numar di grups di compatibilitât vegetative (VCG); ND: no determinât).

Paîs	A	B	C	D
Italie	1938	1951	1964	>17
Spagne	1947	1992	1992	> 5
Svuizare	1948	1975	1975	> 6
Crauazie	1950	1978	1981	8
France	1956	1964	1964	>20
Grecie	1964	1975	1984	2
Ongjarie	1965	ND		
Turchie	1967	ND		
Albanie	1967	1983	1984	
Austrie	1970	1993	1993	> 7
Slovachie	1976	ND		2
Portugal	1989	ND		
Gjermanie	1992	1993	1993	2

a la muart de plante e al podarès vè un efiet sul potenziâl infetîf (Anagnostakis 1987). Cun di plui la difusion de malatie tal continent vieri no je stade cussì svelte, stant che i boscs di cjaminâr in Europe no presentin une continuitât gjeografiche.

Dinamiche de ipovirulence

Prins rimarcs. Cjalant ce che al jere sucedût tai SUA e viodint la so-
meance de epidemie in Italie, i voleve pôc par induvinâ un destin com-
pagn ancje pai cjaminârs europeans. Invezit a la fin da la seconde vuere
mondial, e daspò dome 15 agns de rivade dal patogjen in Italie, Biraghi
al scuvierç une coltivazion di cjaminârs “sorprendentementri sane”,
ancje se l’85% des butadis a son infetadis. Cjalant plui tal particolar al
cjate che diviers cancars a son atipics, intant che lis lesions a no cercenin
dut il branc e i arbui a rinsanin di bessôi. I cancars atipics o involutîfs, a
diference di chei evolutîfs, a son confinâts difûr de scuarce e a somein
compagns di chei za viodûts su la specie *Castanea crenata*. Tal 1954 al
scrîf che i cjaminârs a rinsanin “in diviersis zonis de Italie, là che il pa-
togjen al jere stât presint par une vore di agns” (Biraghi 1954). Biraghi al
crodeva che il fenomen al fos dovût a la inessite de resistance, a sô vol-
te causade dal tai continuât des menadis (Biraghi 1953).

Isolament des culturis ipovirulentis. Tal 1964 intune visite in Italie cuntun
grup di forestâi da la FAO, Grente al cjape sù tocs di scuarce di cjaminârs
rinsanâts cressûts tes provinciis di Como e di Varese. Di chestis al tire fûr
culturis dal fonc che a somein subite diferentis e che di plui a mostrin
une virulence ridusude (Grente 1965). Culturis compagnis a vegnin iso-
ladis ancje in France e in altris paîs europeans (Tabele 1). Lis culturis
ipovirulentis a mostrin caratars fûr de norme. A cressin plui planc sul te-
ren di patate destrosi (PDA), lis coloniis a son di colôr blanc invezit che
zâl naran e a formin pôcs conidis.

Nature de ipovirulence. Cuant che lis culturis ipovirulentis a vegnin do-
pradis par infetâ par feride i cjaminârs a mostrin une virulence ridusude
(*ipovirulence*). In plui cuant che culturis virulentis e ipovirulentis a ve-
gnin fatis cressi suntun teren agarizât, cheste virulence ridusude e ven
trasmetude a lis culturis virulentis cu la fusion ifâl (anastomosi) e lis cul-

turis virulentis a diventin ipovirulentis (*ipovirulence trasmetude*). Se l'ôr dai cancars al ven infetât cuntune culture ipovirulente, il cancar si bloche e a vegnin isoladis dome culturis ipovirulentis. In fin l'inoculazion tal stes timp cun culturis virulentis e ipovirulentis e puarte a la formazion di cancars rinsanâts.

La ipovirulence, e anje altris caratars (colôr, sporulazion ridusude), a son controlâts di fatôrs citoplasmatics (Grente e Sauret 1969, Van Alfen et al. 1975) e a son associâts cu la presince di moleculis a grant pês molecolâr di RNA a eliche dople (dsRNA) (Day et al. 1977). Lis culturis ipovirulentis a trasformin chês virulentis cun il trasferiment dal dsRNA cu l'anastomosi (Anagnostakis 1981, Anagnostakis e Day 1979, Rigling et al. 1989). Chescj risultâts a son il pont di partence par il disvilup di metodis di control biologjic de malatie.

Sintoms associâts cu la ipovirulence. Come che o vin mostrât, lis culturis ipovirulentis a mostrin une schirie di caratars associâts, come la divierse morfologjie de colonie, la sporulazion ridusude, e la scjarse produzion di ossalât, di lacasi e di pigment (Anagnostakis 1982, 1984; Havir e Anagnostakis 1983; Rigling et al. 1989). Cualchidun di chescj caratars al è influençât di fatôrs ambientâi.

Colôr e produzion di ossalât a vegnin ridusûts cuant che lis culturis a vegnin fatis cressi tal scûr (Pullhalla e Anagnostakis 1971) e il fenomen al pues jessi ribaltât in culturis arlevadis inte lûs fuerte (Pullhalla e Anagnostakis 1971). Tal stes timp sporulazion e pigmentazion no vegnin ridusudis di trop tes culturis americanis. In fin al è stât dimostrât che lis culturis ipovirulentis a mostrin une schirie di altris caratars associâts. Al moment al pâr che, almancul a un ciert nivel, a dipendin da l'azion di prodots codificâts di gjens dsRNA.

Il dsRNA come agent causâl de ipovirulence. Il fenotip ipovirulent al è associât cun elements gjenics che a vegnin trasmetûts cu la anastomosi ifâl (Van Alfen et al. 1975). La informazion gjeniche, responsabil de ipovirulence, e sta tal dsRNA che si repliche tal citoplasme e che probabilitmentri al è di divignince virâl (Day et al. 1977, Fulbright 1984, Elliston 1985). Lis culturis ipovirulentis a contegnin dsRNA, par cuintri chês virulentis no lu àn. Fotografiis fatis cul microscopi eletronic a mostrin co-

me che il dsRNA nol sedi incapsidât, ma invezit associât tal citoplasme in bufulis cuntune sorte di membrane (Newhouse et al. 1983) e che, a difference da lis particulis VLP (virus-like particles), al è presint massime tes zonis di ponte des ifis di *C. parasitica*.

Micovirus e elements gjenics a son presints intune vore di foncs (Nuss e Koltin 1990). I virus a son stâts cjatâts prin tai foncs coltivâts (Hollings 1962) e pôcs agns daspò intal *Penicillium funiculosum* (Banks et al. 1968). Oltri al dsRNA incapsidât, tai principâi grups dal ream Fungi a son stadis notadis ancje altris struturis dsRNA ma no capsidadis (Nuss e Koltin 1990). Tai foncs i gjenoms virâi dsRNA a son in massime part segmentâts e ogni tocut al è incapsidât par so cont. Ancje i dsRNA che no àn un capsit a son sminuçâts intune schirie di fruçons. Chescj invezit a son associâts cu la membrane celulâr (Van Alfen 1987). Il dsRNA des culturis ipovirulentis al è une vore diviers (Nuss 1992) e a seont de lungjece al pues jessi spartît in trê grups riferîts a la misure de molecule, ven a stâi, piçule (*S-small*), mezane (*M-medium*) e gruesse (*L-large*). Ducj a mostrin lis stessis bandis terminâls: une code poly A a la estremitât 3' e une secuencia di 28 nucleotidis a la estremitât 5'. A si diferenzin par la cuantitât di materiâl dismetût dentri da la molecule; ven a stâi che la forme gruesse e somee jessi la molecule plui complete e chê piçule une forme falade. La fuarte variabilitât dai gjenoms RNA no je insolite, stant il fat che al mancje un sisteme efficient di control, bon di sigurâ une lôr replicazion corete (Deacon 1997).

Il L-dsRNA (di cirche 12,7 kbp) al presente doi dominis continuâts di codificazion [ORFA cun 622 codons (tiercinis di nucleotidis) e ORFB cun 3165 codons] e une schirie di segments difetôs bogns di causâ interferencis (Shapira et al. 1991a, 1991b). I dsRNA difetôs a son formis di L-dsRNA cun pierditis internis, che a saltin fûr daspò di une culture ripetude dal fonc, dopo anastomosi e cuant che il fonc al passe tai tiessûts de plante (Heiniger e Rigling 1994). Nol è ancjemò clâr ce che al pues fâ il dsRNA difetôs par la espression dal fenotip ipovirulent. Organizazion gjeniche, espression e replicazion a son segnâi fuarts de probabile divignince virâl dal dsRNA (Shapira et al. 1991a, Fahima et al. 1993).

Il fat di podê introdusi in *C. parasitica* il L-dsRNA par vie dal DNA di trasformazion al à stabilît cence dubi che il dsRNA al è l'agent causâl de ipovirulence (Choi e Nuss 1992). Cun il disvilup dai sistemis di trasformazion, Nuss e i siei colaboradôrs (Hillman et al. 1989, Nuss e Kol-

tin 1990) a son rivâts a produci un cDNA partint dal dsRNA complet. Chest cDNA al è stât doprât par une analisi molecolâr dal dsRNA. Si è viodût alore che se la region ORFB e ven taiade fûr dal cDNA, une volte che chest ultin al ven trasformât in *C. parasitica* al sbasse la virulence. Cuan che invezit si è provât a meti di bande la region ORFA, si à vude une pierdite dai caratars associâts dome cu la virulence (incessite lente, sporulazion scjarse e vie indenant). Partant al somee che la region ORFB e sedi necessarie par la espression de ipovirulence e che di chê altre bande ORFA al codifichi une vore dai caratars associâts cu la ipovirulence, ma che a podaressin jessi disavantazôs par une culture di doprâ tal control biologjic, pal fat che a ridusin la funzionalitât ecologjiche (*fitness*) dal fonc. In conclusion al è pussibil tratâ il cDNA in vitro fasint in mût che al vedi dome i caratars plui vantazôs par il control biologjic. Par altri il risultât plui significatîf al è che cuant che chest cDNA, trasformât in *C. parasitica*, al cambie il fonc di virulent a ipovirulent, al devente ancje saldementri integrât tal gjenome cromosomic, al ven mantignût par dut il cicli de vite e al pues passâ ancje ta lis ascosporis. Chest a vûl dî che al sarâ pussibil prontâ par il control biologjic culturis dotadis di ipovirulence stabil (Deacon 1997).

Cure dal cancar dal cjastinâr intal cjamp

La idee di doprâ culturis ipovirulentis par controlâ e curâ il cancar dal cjastinâr e je nassude a pene viodût ce che al jere sucedût in nature. La strategjie e jere clare, però a jerin ancje intops come chei causâts da la incompatibilitât vegetative. Cun altris peraulis nol è dît che ta un bosc une sole culture ipovirulente, sielzude a câs, e puedi jessi buine di sanâ ducj i cancars (Grente e Sauret 1969). La inoculazion e funzione dome se la culture ipovirulente doprade e je dal stes stamp di compatibilitât vegetative (v-c) (Bazzigher 1964, Grente e Sauret 1969).

Compatibilitât vegetative. In *C. parasitica* la ipovirulence e je controlade da la compatibilitât vegetative che e pues jessi dimostrate sedi *in vitro* (Anagnostakis e Day 1979), sedi *in vivo* (Anagnostakis e Waggoner 1981). Si pense che la fuarte diversitât dai grups di compatibilitât vegetative (VCG) e sedi la cause da la scjarse difusion da lis culturis ipovirulentis tal Nord Americhe (Anagnostakis 1987). Anastomosis vitâls si for-

min dome jenfri culturis che a àn alêi compagns in ducj i loci v-c (gjens-vic). Anagnostakis (1988) al à proponût un metodi par meti in evidence la compatibilitât vegjetative *in vitro*. Piçui blocs dal miceli di provâ (cubui di mancûl di 3 mm) a vegnin taiâts vie dal ôr di une colonie in cressite ative su PDA e trasferîts su PDA fresc a une distance di no plui di 5 mm l'un da l'altri, il dut al ven arlevât tal scûr par 4 dîs a 25-27°C. Passât chest timp, lis culturis compatibilis a saran cressudis insiemit formant un miceli continuu. Chês incompatibilis invezit a cressin sul teren agarizât dome fin a un ciert pont e i micelis a restin dissepârâts di une linie di confin (*barrage*) formade di ifis muartis e disprivade di miceli secundari (Figure 1 e 2). Se dopo lis piastris cu lis coloniis a vegnin lassadis a la lûs artificiâl (16 oris in dì di lûs fluorescent blancje, a 25-27°C par doi dîs) ai doi ôrs da la zone di confin a si formin picnidis e il fenomen al devente ancje plui clâr.

Cuant che culturis ipovirulentis a son stadis impuartadis tai SUA par curâ il cancar dal cjaminâr american a àn dât dome un risultât parziâl e locâl. Lassant di bande diferencis a nivel di specie de plante (*Castanea dentata* invezit di *Castanea sativa*), la popolazion dal patogen tai SUA e je formade di cetancj grups di compatibilitât vegjetative (VCG) e chest al limite il trasferiment dal dsRNA par vie de muart citoplasmiche al moment de anastomosi. Dome intal Connecticut a son stâts notâts 67 tips v-c. In sîts piçui e ben segnâts, un simpri tal Connecticut e un in West Virgjinie, a son stâts isolâts 27 e 48 v-c tips diviers (Anagnostakis e Kranz

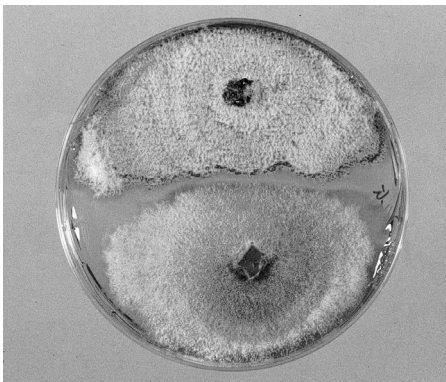


Figure 1.

Compatibilitât (Figure 1) e incompatibilitât (Figure 2) vegjetative in culturis di *Cryphonectria parasitica*.

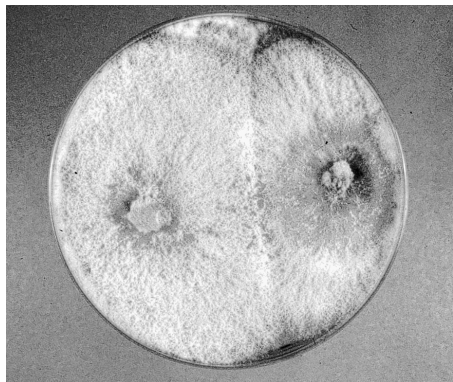


Figure 2.

1987, Milgroom et al. 1991). Cun di plui tal Nord Americhe i VCG a so-mein jessi in moviment continui: campionaments fats sui stes arbui a distance di agns a àn dimostrâ che i VCG dominants a calavin e che a comparivin grups gnûfs (Anagnostakis 1982). Al contrari in Svuizare (Cjanton Tessin) a son stâts cjatâts i stes tips v-c dominants sedi tal 1976 (Bazzigher et al. 1981) che tal 1990 (Bissegger e Heiniger 1992).

La popolazion europeane di *C. parasitica* e je une vore plui uniforme di chê dai SUA e cheste e je la reson de fortune dal control biologjic in Europe. Culì il numar di VCG al è cetant bas in zonis specifichis (Pennisi et al. 1992, Zambonelli e Zechini d'Aulerio 1986). La diviersitât di VCG intun sît e je par solit une vore limitade e e pues ridusisi fin a un o doi grups par sît. Al confin de difusion di une epidemie diviers sîts infetâts a presentin dome un VCG (Bissegger e Heiniger 1991, Xenopoulos 1981). Oltri a la basse diviersitât dai VCG, in Europe la difusion dal dsRNA virâl e je judade da la presince di culturis ipovirulentis dotadis di une grande capacitât di conversion (Bazzigher et al. 1981, Turchetti e Maresi 1988) e buinis di trasformâ culturis virulentis che a partegnin anje a VCG diferents (Kuhlman et al. 1984).

La ricombinazion sessuâl dai diviers gjenotips v-c e rapresente la origjin principâl da la diviersitât dai VCG di *C. parasitica* (Anagnostakis 1988). Peritecis a son presints in diviers paîs europeans, si ben che in tantis zonis a sedin scjars. In ogni câs la lôr presince no je critiche, stant che il stadi sessuâl si pues vê anje par autofertilizazion (Milgroom et al. 1993, Puhalla e Anagnostakis 1971). E somee che la scjarse riproduzion sessuâl e puedi vê contribuît a la basse diviersitât dai VCG in Europe.

Strategie operative. Grente e colaboradôrs a àn scomençât il lavôr sul cjamp tratant une dozene di zonis a cjaminâr te France meridionâl. Daspò altris provis a son stadis fatis anje in altris regions e i risultâts a son stâts cetant confuartants che al è partît un program di control biologjic, prudelât dal Ministeri de Agricolture, par judâ i contadins che a vevin cjaminârs (Grente 1965, Grente e Sauret 1978). Daspò di vê identificât il patogen specific, si prontin misturis adatis di culturis ipovirulentis che a vegnin dadis ai agricultôrs. Dopo di vê tirât vie la scuarce, tal ôr dal cancar e dut ator e ven aplicade la mixture in busutis distantis 2-3 cm. In di di vuê a son in cumierç misturis adatis par lis diviersis zonis.

Une strategie someant e je stade seguite ancje in Italie e il lavôr fat dai ricercjadôrs des universitâts di Milan e di Udin al ven riassunt daspò. In paralêl al lavôr sul cjamp, sui cjaminârs a son stâts studiâts a font: difusion de malatie, rinsanament naturâl dai cjaminârs, agent causâl, culturis ipovirulentis, tips di compatibilitât e v.i. (Cortesi e Milgroom 1998, Cortesi et al. 1996, Milgroom e Cortesi 1999). La procedure seguite (Intropido et al. 1987, Bisiach et al. 1991) e consist di une secuencia di operations. Prin di dut la region destinade al tratament e ven ben definide e dividude in zonis omogjenis cun riuart a altitudin, orientament, sorte di arlevament des plantis e v.i. Daspò a vegnin contâts e classificâts i cancars presints. In laboratori, a vegnin isoladis lis culturis dai diviers cancars, tipics e atipics, che a van controladis cun riuart a la lôr relative compatibilitât vegjetative *in vitro*. Culturis ugnulis o misturis adatis a vegnin arlevadis su terens di laboratori o, se l'intervent al riuar-de zonis une vore grandis, in culture licuide tai fermentadôrs di 200 l di capacitât.

In zonis piçulis si introdusin discs di miceli sot la scuarce, ator dai cancars, tal ôr jenfri i tiessûts malâts e a son a pôcs centimetris l'un da l'altri. Tal câs di trataments in zonis plui grandis, il miceli, arlevât in fermentadôrs industriâi, al ven impachetât in tubui come chei di un dentifrici. Chest al sigure l'aplicazion dal miceli a un numar plui grant di plantis e al pues jessi fat ancje di operadôrs cun pocje esperience, daspò di cualchi istruzion. Par solit a si tratin 20-30 cancars par etar. Naturalmentri un numar plui grant di inoculazions al à il vantaç di acelerâ il rinsanament. Chest a nol è simpri pussibil tal câs di zonis grandononis e cun arbui cetant grancj. Di chê altre bande si pues vê une buine difusion naturâl des culturis ipovirulentis in pôcs agns se i sîts di inoculazion a son sielzûts cun atenzion.

Cheste procedure e je stade provade in diviersis regions talianis (Intropido et al. 1987, Bisiach et al. 1991). Par esempli tai boscs de Val Seriana (provincie di Bergamo) plui di dusinte cancars a son stâts tratâts cuntune mixture di cinc culturis ipovirulentis, compatibilis cu la popolazion locâl dal patogen (Gobbi e Intropido 1984). Daspò di sîs agns ducj i cancars inoculâts a jerin rinsanâts o in vie di rinsanament. Tal stes timp i cancars che no jerin stâts tratâts a son calâts dal 41 al 25%, dimostrant la buine difusion naturâl de ipovirulence (Bisiach et al. 1988, 1991). In

Friûl il lavôr al è stat concentrât tes vals dal Nadison (Grimà - Udin), su la mont Calvari (Gurize) e in provincie di Pordenon.

Ricercjis sul cancar dal cjastinâr in Friûl. Il lavôr scomençât te universitât di Milan al è stât continuât in chê di Udin. Daûr si presentin i principâi risultâts otignûts in Friûl.

Materiài e metodis. In plui da lis culturis dopradis tal cors des ricercjis sorescritis ancje altris culturis a son stadis studiadis e isoladis sedi fûr de Italie, sedi in zonis diferentis da lis provinciis furlanis. I metodis doprâts a son chei bielzà testâts e standardizâts.

Risultâts

Analisi des popolazions dal patogjen. Naturalmentri il prin pas de ricercje al è stât chel di analizâ la popolazion des culturis di *Cryphonectria parasitica* presintis tai cjastinârs de region furlane. Par chest al è stât fat un esame dai cancars da lis provinciis di Gurize, Pordenon e Udin. Tal stes moment a son stadis isoladis une schirie di culturis virulentis e ipovirulentis che a son stadis caraterizadis par podê tal câs impleâlis tal control biologjic (Gobbi e Locci 1987, 1989). Ta lis culturis rigjavadis e je stade studiade ancje la regolazion dal dsRNA di gjens specifics implicâts tai 'mating types' dal fonc (Carpanelli et al. 1995). Lis culturis isoladis a partegnin ai grups classics dal fonc, ven a stâi culturis normâls cu la morfologjie tipiche da la specie (colôr zâl-narant da la colonie e buine formazion di picnidis) e culturis atipichis, caraterizadis da la pigmentazion scjarse e di une produzion puare di picnidis *in vitro*. Ancje in Friûl e ven confermade la corelazion tra la sorte dal cancar e i caratars da la culture. Fenomens di eteroauxesi a son stâts cjatâts dome in culturis tipichis. Si son notâts ancje câs di infezions multiplis. Provis di patogjenicitât a àn confermât la virulence da lis culturis normâls e la vaste eterogjenitât di chês ipovirulentis. A son ancje stadis notadis culturis cuntune fuarte compatibilitât e capacitât di conversion.

Eteroauxesi. Il fenomen al è rapresentât da lis malformazions da lis coloniis e al è stât scuviert par prin ta la culture VIR 1 (Gobbi et al. 1985). Cuant che a vegnin arlevadis, lis coloniis virulentis di *C. parasitica* a cres-

sin, in part o dal dut, distuartis e a mostrin setôrs e iregolaritâts tal ôr. L'incessite dal miceli e ven blockade in mût iregolâr e si formin brancs di ifis a ventai e clamidosporis. La dinamiche dal fenomen e je stade seguita ancje te fiolance des culturis, otignudis sedi a partî di ifis che di conidis. I risultâts a dimostrin une origjin citoplasmiche de eteroauxesi. No je stade notade corelazion tra eteroauxesi e patogjenicitât, dutis lis culturis, ancje se lis coloniis a vevin morfologjîs diferentis, a mantignivin la lôr virulence tipiche.

Tal microscopi normâl e ta chel eletronic a scansion (SEM) lis coloniis eteroaxonichis a mostrin un disecuilibri clâr e net jenfri il miceli vegetatîf e chel secondari, cun il prin avantazât (Gobbi et al. 1989). L'ôr de colonie al è iregolâr parcè che e ven alterade la ramificazion da lis ifis. I setôrs a son causâts dal fat che la incessite no risulde sincronizade e la architecture da lis ifis a je dispeade dal disvilup di chês che a son dongje. Tai setôrs la incessite secondarie e je scjarse fintremaî inesistente. Lis ifis vegetativis a ramifichin in maniere flape cun il risultât di un ôr iregolâr de colonie. Al SEM lis ifis cun cressite blockade a mostrin des sglonfaduris te ponte. Il lôr disvilup nol è liniâr; a mostrin fenomens litics e pierdite di materiâl citoplasmic che si ingrume su la ponte des ifis, come che al capite ta la sindrome 'balloon' notade in *Neurospora crassa* (Bainbridge et al. 1979).

Polimorfisim dal DNA mitocondriâl. Il DNA mitocondriâl (mtDNA) al è stât sielzût come *marker* (marcjadôr) naturâl stabil par studiâ la epidemiologie e par tignî sot control la difusion di *C. parasitica* tai ambients naturâi, stant che nol ven trasferît par anastomosi (Gobbi e Locci 1988, 1995). Il formât al svarie ta lis diviersis culturis di 137,3 a 146 kbp, valôrs cetant plui grancj che in altris foncs. Il mtDNA al presente un fuart polimorfisim inte lungjece dai fragments di restrizion (RFLP) e al pues jessi doprât come origjin di marcjadôrs gjenics. Cun cheste finalitât e je stade prontade une metodologjie par mapâ i sîts polimorfics da la molecul dal mtDNA (Gobbi et al. 1991). E je stade fate une mape fisiche da la culture Ep155, indotade di une gruesse molecul di mtDNA, doprant endonucleasis di restrizion (KpnI, SacI e Eco RI), cun strategjîs di clonazion e di ibridazion adatis.

In ricercjîs plui resintis (Gobbi et al. 2002a, 2003) polimorfisims di

mtDNA a son stâts mapâts e si è scuvier che a si intropin in cuatri regions de molecule, massime inta la region 2 dal RFLP, là che a son stâts identificâts cinc aplotips mtDNA in 13 culturis. Cheste region e cjape dentri une porzion di 8,4 kbp che e je stade secuenziade dal dut te culture Ep155 e e mostre la presince di doi introns. Une porzion interne di 3,2 kbp e je stade secuenziade in altris sîs culturis. Un confront dai ORF intronics mitocondriâi di *C. parasitica* e à pandût similaritâts cun chei di *Podospira anserina* e di *Neurospora crassa*. La analisi des secuencis di DNA e à mostrât che trê polimorfisims di cheste region dal mtDNA intune popolazion di 12 culturis a son causâts da la presince tal gjen ND5 di un intron e da la secuencia dentri l'intron stes.

Il plasmid pUG1. Che i plasmids a fossin implicâts tant che agjents de eteroauxesi si lu veve za pensât tal moment de discuvier dal fenomen. Ricercjis diretis a àn confermât chest supuest. In fin al è stât isolât e caraterizât un plasmid circolâr, il pUG1 (Gobbi & Locci 1990; Gobbi et al. 1996, 1997a, 1997b, 2002b, 2002c; Rekab et al. 2001). I plasmids a son moleculis di DNA extracromosomic, buinis di riprodusîsi in dispart dal DNA cromosomic. Tai foncs filamentôs par solit i plasmids si cjatin tai mitocondris e a son liniârs (Nargang 1985). Di massime i plasmids mitocondriâi circolârs a divegnin dal mtDNA e a mostrin une omologjie di secuencia cun i acits nucleics. Invezit i 'plasmids vêrs' a son une minorance e a àn une secuencia proprie (Griffiths 1995). Il plasmid pUG1 di *C. parasitica* al parten a chest grup e al mostre un grant nivel di similaritât cun i plasmids Fiji e LaBelle *Neurospora intermedia*. Chesçj trê plasmids a codifichin une famee particolâr di polimerasis B DNA, che e je caraterizade di une firme specifiche, TTD invezit di DTD, tal motîf C tipic de famee. Cun di plui a son associâts a strent cu lis polimerasis plasmidichis liniârs (Gobbi et al. 1997a). Chesçj caratars particolârs a fasin pensâ che i plasmids pUG1, Fiji e LaBelle a formin un grup gnûf di plasmids mitocondriâi circolârs e che a vedin une divignince comun.

Tai foncs i plasmids dai patogjens a son par solit associâts cu la patogenicitât (Griffiths 1995). In *C. parasitica* il plasmid pUG1 al è stât isolât in prin in culturis che a mostravin un fenomen di invecjament (eteroauxesi) e partant si jere pensât che al podès ridusi la eficiencia des cul-

turis e sbassâ la patogjenicitât. Par altri un secont plasmid, pCRY, cuntune identitât di secuence di nucleotidis dal 99,8% cun riuart a pUG1, al è stât descrit pôcs agns indaûr (Monteiro-Vittorello et al. 2000). pCRY invezit al è bon di influençâ la virulence, almancul di une culture di *C. parasitica*.

La amplificazion cun PCR specific di cirche 200 culturis e à mostrât che plasmids di tip pUG1 a son presints intal 22% da la popolazion sa-menade. Lis moleculis dai plasmids a son stadis amplificadis ad implen cun PCR multiple e i prodots a mostrin tips diviers di RFLP. La variabilitât e interesse massime une region di molecole che no codifiche e che e je stade secuenziade in culturis rapresentativis par clarî la evoluzion de molecole. Seont i risultâts i plasmids mitocondriai di *C. parasitica* a partegnin a une famee (nomenade pCp) che e pues jessi spartide in doi grups (Nord American e European a seont da la assence o da la presence di une region di 60 nucleotidis.

Conclusions. La epidemie dal cancar dal cjastinâr e à batût i arbuï europeans cuntune fuarce compagne di chê dal Nord Americhe. Cuant che e je rivade nol jere nissun dubi al riuart dal destin dai cjastinârs nostrans. Invezit daspò cirche 15 agns i cjastinârs a àn scomençât a rinsanâ di besôî. Chest fat al è stât il pont di partence par il control de malatie. La ipovirulence di bessole no varès podût puartâ al stes risultât o almancul no intun timp cussì curt cence l'azion dal om. In nature il sparniçament da lis culturis ipovirulentis nol è avantazât a front di chel di chês virulentis (Anagnostakis 1987, Heiniger e Rigling 1994), par vie dai caratars biologjics da lis primis (velocitât di inressite, sporulazion e v.i.). Par chest il spandiment artificiâl da lis culturis ipovirulentis al è stât sostanzial par movi l'ecuilibri a pro de ipovirulence.

In ogni câs il rinsanament nol è stât imediât e nancje automatic, ma al à domandât une vore di lavôr di ricercje par superâ une schirie di intops (sielte des culturis adatis, compatibilitât vegjetative e v.i.). A esistin ancjemò problemis che si podaran risolti miorant lis culturis ipovirulentis, massime cirint di prontâ materiâl cun ipovirulence stabil e permanent. I caratars associâts cu la ipovirulence no son simpri avantazôs par la eficience (*fitness*) ecologjiche e par la difusion naturâl des culturis ipovirulentis. Il fat di podê modificâ lis regions interessadis dal daRNA al è

di massime impuartance. In ogni câs il control de epidemie al è bielzà un sucès.

In fin, come notât di Heiniger e Rigling (1994), il fenomen de ipovirulence, otignude in teorie cuntun sôl tratament ancje in plantis a vite lungje come i cjastinârs, al è di fuart interès biologic.