

# **Attività svolta nel contesto della Convenzione quadro per attività di ricerca e cooperazione tecnologica tra Ente Parco Naturale Paneveggio Pale di S. Martino e Fondazione Edmund Mach**

**Relazione 2017:**

**Parte A**

**“Misure indirette degli effetti di *Hymenoschypus  
fraxineus*”**

*Fabiana Cristofolini, Elena Gottardini*

**Parte B**

**“Messa a punto di metodiche per l’identificazione  
delle spore nei campioni aerobiologici”**

*Antonella Cristofori, Maria Cristina Viola*

**Centro Ricerca ed Innovazione**

**Fondazione E. Mach**

## Sintesi

*Hymenoscyphus fraxineus* (un tempo noto come *Chalara fraxinea*) è un patogeno fungino che è risultato essere associato a fenomeni di deperimento del frassino (*F.excelsior* in particolare) a partire dall'est Europa.

La presenza di *H. fraxineus* è stata segnalata in Trentino dal 2012, con i primi ritrovamenti proprio nell'area del Primiero-Vanoi; dal 2014 risulta presente in tutta la provincia con danni evidenti, in particolare sulla rinnovazione di frassino.

Con la finalità di comprendere meglio il fenomeno e studiarne l'impatto - grazie alla presenza di un centro di monitoraggio aerobiologico attivo dal 2006 presso Villa Welsperg in Val Canali - si definiscono due ambiti di attività:

- a) Analizzare i quantitativi pollinici annuali come misura indiretta dell'impatto del patogeno sulla popolazione di frassino presente nell'area di studio.
- b) Valutare e mettere a punto metodiche che permettano di identificare le spore del patogeno nei campioni aerobiologici.

In sintesi per il primo ambito (a), l'analisi dei quantitativi pollinici mostra un abbassamento dei valori di concentrazione proprio dal 2012 in concomitanza con la comparsa del patogeno; si evidenzia la potenzialità dei parametri pollinici come bioindicatori capaci di riflettere modificazioni nell'ecosistema.

Per il secondo ambito (b) è stato possibile testare non solo la colorazione di nuovi campioni ma anche definire una metodica che permetta la ricolorazione dei vetrini del monitoraggio aerobiologico per rendere visibili le spore di *Hymenoscyphus fraxineus*. In tal modo si apre la possibilità di condurre indagini sulla dispersione delle spore anche in passato e sulle fluttuazioni temporali.

## Parte A

### Misure indirette degli effetti di *Hymenoschypus fraxineus*

Premessa:

*Hymenoschypus fraxineus* (un tempo noto come *Chalara fraxinea*) è un patogeno fungino che, a partire dai primi anni '90 del secolo scorso, è risultato essere associato a fenomeni di deperimento o a vere e proprie morie del frassino in Polonia. Negli anni successivi il fungo si è diffuso piuttosto rapidamente non solo in altri stati dell'Europa del Nord ma anche in paesi più meridionali, quali la Francia e la Slovenia. Nel 2009 la sua presenza è stata accertata anche in Italia, in varie località friulane poste lungo il confine italo-sloveno.

La diffusione del deperimento del frassino causato da *H. fraxineus* è stata segnalata in Trentino dal 2012, con i primi ritrovamenti proprio nell'area del Primiero-Vanoi; dal 2014 risulta presente in tutta la provincia con danni evidenti, in particolare sulla rinnovazione di frassino.

La dinamica di infezione presenta un ciclo biologico che vede lo sviluppo di corpi fungini ed il rilascio di spore che possono colpire le parti aeree, in particolare le foglie (Fig. 1)

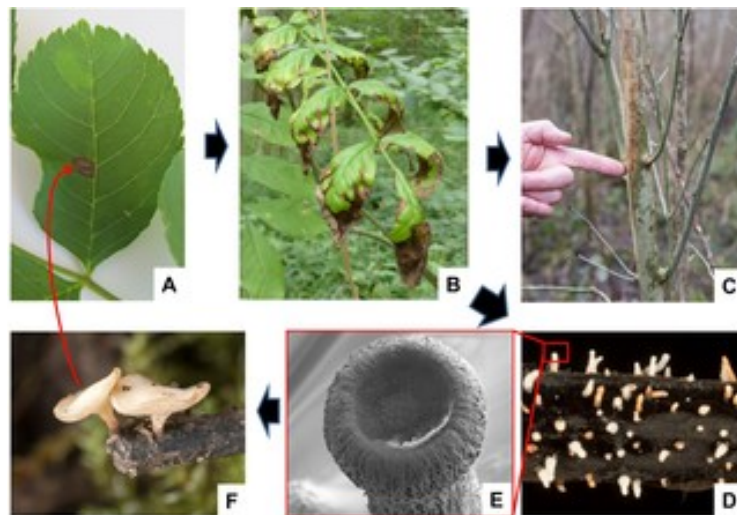


Figura 1. Ciclo di infezione del patogeno *H. fraxineus*. (A) Lesione necrotica su foglia di frassino causata da ascospore di *H. fraxineus* ad inizio estate. (B) Gravi sintomi da *H. fraxineus* su foglie di frassino; il fungo penetra nelle parti legnose dell'albero dove continua a svilupparsi causando lesioni a forma di diamante (C). In autunno le foglie infette cadono e ad inizio dell'estate successiva gli steli delle foglie mostrano i primi stadi di crescita dei corpi fruttiferi di *H. fraxineus* (D), con un diametro di circa 0.1 mm; l'immagine al microscopio elettronico a scansione di un corpo fruttifero è riportata in (E). Corpi fruttiferi maturi (F) rilasciano le ascospore in aria attraverso cui vengono trasportate alle foglie di frassino dove si completa il ciclo vitale. Immagini da: Downie JA (2017)

Dalla necrosi fogliare l'infezione si estende alla nervatura principale, al rachide con disseccamento della parte sovrastante, per determinare poi lesioni ai tessuti legnosi ed al midollo con disseccamenti della parte apicale della chioma (Fig. 2).

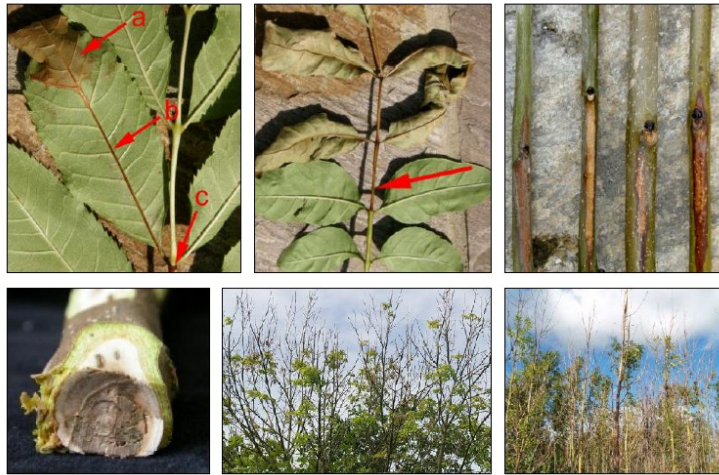


Figura 2. Evoluzione del danno. Immagini da <https://forestry.gov.uk/forestry/INFD-92AHUK>

E' plausibile ritenere che situazioni di danno così esteso vadano ad influenzare anche il potenziale riproduttivo della pianta stessa. Da qui l'idea di considerare i quantitativi pollinici annuali come *proxy* dell'impatto del patogeno sullo sforzo riproduttivo della popolazione di frassino presente nell'area del Parco Paneveggio Pale di San Martino.

In considerazione della presenza di un centro di monitoraggio aerobiologico attivo dal 2006 Villa Welsperg, si procede analizzando gli andamenti dei quantitativi totali di polline di *Fraxinus excelsior* rilevati presso il centro stesso.

#### Domande:

- **La comparsa del patogeno determina un effetto sui quantitativi pollinici?**
- **La quantità di polline prodotto può essere un indicatore indiretto della gravità del danno?**

## Analisi dei dati e risultati

Presso il centro di monitoraggio aerobiologico di Villa Welsperg vengono analizzati i pollini aerodispersi; da tale analisi si ottengono valori di concentrazione pollinica giornaliera per i diversi taxa che vengono poi archiviati via web utilizzando software Open Source.

La prima fase di lavoro è consistita nell'estrazione dal DataBase dei valori di concentrazione pollinica giornaliera per il taxa di interesse (*Fraxinus excelsior*) dal 2006 al 2017.

Da questi dati è possibile descrivere l'andamento della stagione pollinica per tutti gli anni di indagine; nella Figura 3 si riporta per ogni anno l'intervallo di durata di pollinazione.

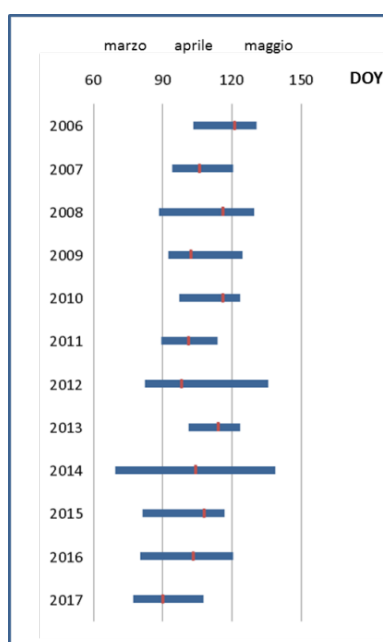


Figura 3. La barra blu indica la durata della stagione pollinica compresa tra la data di inizio (raggiungimento del 2,5% della concentrazione pollinica totale) e la data di fine (raggiungimento del 97,5% della concentrazione pollinica totale); la barra rossa indica il picco (raggiungimento della massima concentrazione)

La completezza del dato è stata testata al fine di avere dati attendibili e di qualità; per *Fraxinus excelsior* la completezza dei dati nel periodo di fioritura (intervallo tra data di inizio e data di fine pollinazione; DOY: 81-131) è risultata pari al 100% per tutti gli anni, con l'unica eccezione del 2016 (98%)

Per ogni anno disponibile (2006-2017) è stato calcolato l'indice pollinico totale (IP tot) sommando tutti i valori di concentrazione giornalieri. Tale numero è espressione del potenziale riproduttivo delle piante nell'area di studio.

Una prima analisi dei dati evidenzia che il range di valori è compreso tra i 53 pollini per metro cubo d'aria ( $P/m^3$ ) registrati nel 2014 e i 3631  $P/m^3$  del 2008.

Si osserva l'alternarsi di produzioni elevate e di produzioni scarse con cadenza annuale piuttosto regolare (Fig 4).

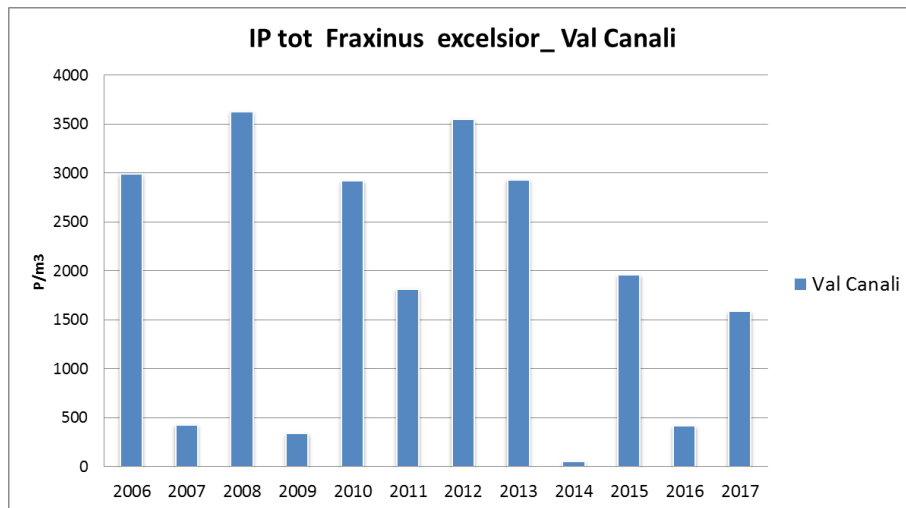


Figura 4. Indice pollinico totale rilevato tra il 2006-2017

Riferendosi ai dati aerobiologici raccolti dal secondo centro provinciale attivo presso la Fondazione E. Mach a San Michele all'Adige, si osserva un analogo andamento; i due centri mostrano infatti un buon sincronismo (Fig. 5).

Si sottolinea la diversa composizione della vegetazione delle due aree di indagine ed in particolare come il minor numero di piante di frassino nell'area di San Michele a/A porti a registrare in quest'ultima area valori sempre inferiori rispetto alla Val Canali.

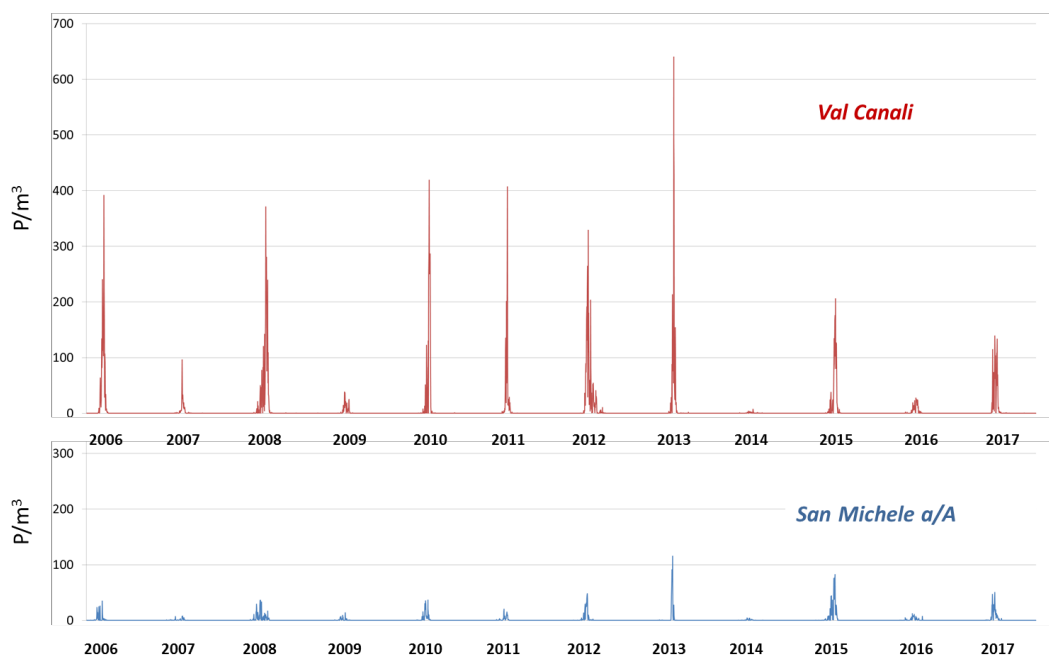


Figura 5. Confronto tra dati di concentrazione pollinica giornaliera rilevati nello stesso intervallo temporale nei due centri provinciali.

Per la serie temporale dei dati di indice pollinico totale della Val Canali è stato calcolato il punto di svolta mediante il test U di Mann-Whitney (Statistica 9 - StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Sulla base di questo test, i valori di concentrazione pollinica totale di frassino risultano variare dopo il 2011. Calcolando i valori medi per i due periodi prima (2006-2011) e dopo (2012-2017) il punto di svolta, si osserva un netto calo delle concentrazioni totali di polline (Fig. 6a). La differenza tra le due serie temporali di dati risulta statisticamente significativa ( $P=0,002$ ; Wald-Wolfowitz Runs Test). Lo stesso test applicato ai dati di San Michele all'Adige non mostra alcuna differenza significativa tra le due serie di valori. Al contrario della Val Canali, i valori medi di San Michele calcolati per i due periodi 2006-2011 e 2012-2017 risultano leggermente superiori nel secondo periodo (Fig. 6b).

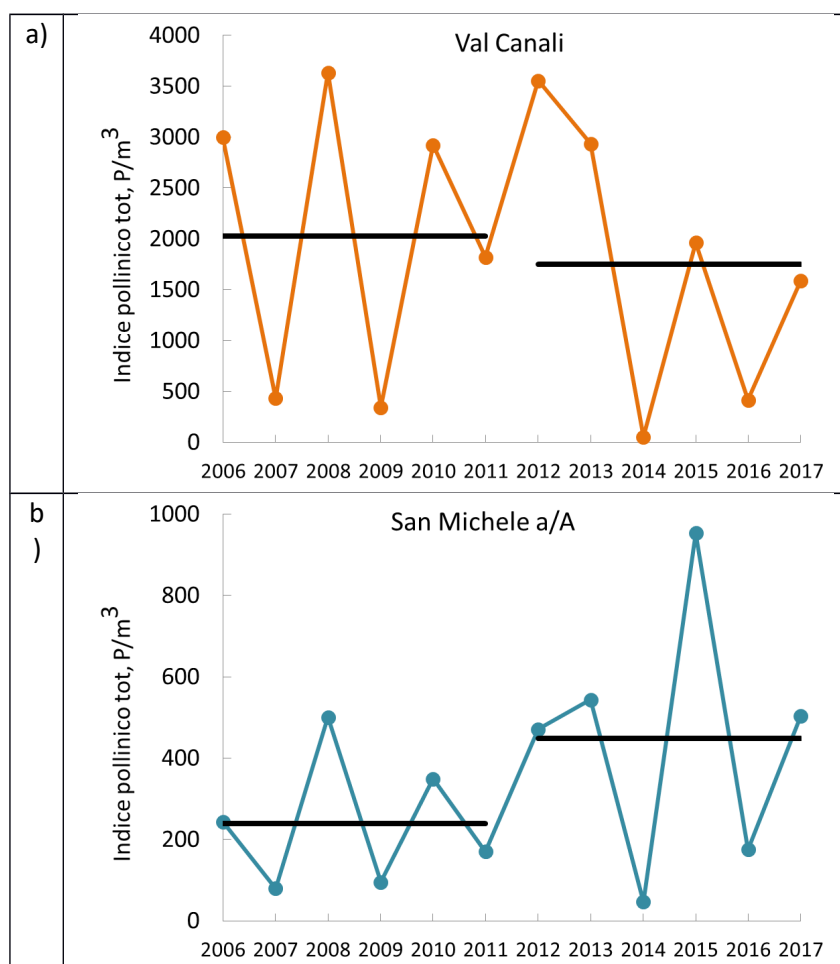


Figura 6. Andamento temporale dei valori di indice pollinico totale rilevato in Val Canali (a) e a San Michele a/A (b). Le linee orizzontali in nero rappresentano i valori medi di IP tot calcolati per i due periodi 2006-2011 e 2012-2017.

## Conclusioni

L'analisi dei dati ha mostrato come per *Fraxinus excelsior* la produzione pollinica presenti un'alternanza annuale nei quantitativi totali. Queste oscillazioni mostrano un andamento coerente in entrambi i centri provinciali di monitoraggio aerobiologico, sebbene a San Michele a/A i valori siano sempre inferiori rispetto alla Val Canali.

A partire dal 2012, l'indice pollinico della Val Canali presenta un punto di cambio con un netto abbassamento dei valori di concentrazione. Nello stesso periodo (2012-2017) osserviamo invece per San Michele a/A una tendenza contraria, con un aumento del valore medio dell'indice pollinico, sebbene il pattern temporale sia analogo a quello della Val Canali .

Possiamo quindi ipotizzare che vi sia stato un effetto del patogeno *H. fraxineus* sui popolamenti di frassino dell'area di studio a partire dal 2012 e che tale effetto abbia interessato, almeno in parte, anche gli organi florali.

Pur consapevoli che la produzione pollinica rifletta ritmi endogeni della pianta e risenta di fattori climatici, possiamo dire che è rappresentativa del potenziale delle piante nella fase fenologica della fioritura e che possa essere utilizzata come indicatore indiretto degli effetti dell'attacco del patogeno *H. fraxineus*.

Occorre inoltre tener presente il limite dato dalla ridotta serie temporale di dati disponibili e la necessità di proseguire l'indagine al fine di supportare meglio i risultati fino ad ora ottenuti.

Monitorare i quantitativi pollinici nel tempo si presta come valido strumento per valutare le risposte delle piante alle condizioni dell'ambiente, seguire l'evolvere della situazione ed evidenziare fasi di criticità o ripresa, anche in seguito ad interventi mirati.



## Parte B

# Messa a punto di metodiche per l'identificazione delle spore di *Hymenoscyphus fraxineus* nei campioni aerobiologici

## Introduzione

La moria del frassino maggiore (Ash dieback) venne osservata per la prima volta in Polonia nel 1992 ed in seguito iniziò a diffondersi in Europa, con una velocità di diffusione di circa 50 km/anno. Le prime segnalazioni in Trentino sono state osservate sul frassino maggiore (*Fraxinus excelsior*) nel 2012 nella zona del Primiero, dove la malattia si è molto diffusa negli ultimi anni, colpendo in maniera più grave e diffusa gli individui giovani. A partire dal 2016, sempre nel Primiero, sono stati segnalati casi di attacco del fungo anche sull'orniello (*Fraxinus ornus*), una specie meno suscettibile alla malattia.

Il fungo patogeno che ne è all'origine, l'ascomicete *Hymenoscyphus fraxineus*, venne isolato nel 2000 come *Chalara fraxinea*, nome abbandonato nel 2014 in seguito a revisione della nomenclatura. Questo patogeno invasivo, proveniente dall'Asia orientale, si diffonde grazie alle ascospore prodotte dai corpi fruttiferi, che si sviluppano sul legno e le foglie a terra, generalmente tra luglio e settembre. Le spore aerodisperse del fungo sono generalmente la sola fonte di infezione delle foglie ed appaiono capaci di spostarsi di decine di chilometri.

Viste le modalità di riproduzione e patogenesi, l'aerobiologia rappresenta un mezzo d'elezione per lo studio della dispersione di *Hymenoscyphus fraxineus*.

## Obiettivo generale

Studiare la dinamica di dispersione delle spore presso il territorio del Parco di Paneveggio Pale di San Martino, per verificare (i) l'anno effettivo di arrivo delle spore; e (ii) le fluttuazioni temporali di dispersione della spora, giornaliere, stagionali e pluriannuali.

## Obiettivo specifico

Verificare la possibilità di ricolorazione dei vetrini del monitoraggio aerobiologico per rendere visibili le spore di *Hymenoscyphus fraxineus*.

Questo permetterebbe di valorizzare il patrimonio informativo racchiuso nei vetrini del monitoraggio aerobiologico, attivo presso la sede di Villa Welsperg dal 2006, per ricavare informazioni giornaliere sulla presenza di spore di *Hymenoscyphus fraxineus* negli anni trascorsi, ed in particolare partendo dall'anno precedente al presunto arrivo delle spore nell'area di campionamento.

## Risultati delle prove sperimentali

È stato esaminata la visibilità delle spore di *Hymenoscyphus fraxineus* su vetrini con la colorazione standard del monitoraggio aerobiologico, a base di fucsina basica. Le spore restano incolore e traslucide, rendendone l'identificazione e il conteggio non realizzabili.

Una ricerca relativamente alle possibili tecniche di colorazione che permettano di render visibile la spora al microscopio ottico ha evidenziato come potenziale colorante la fucsina acida.

Sono state eseguite quindi delle prove su:

1. Spore fungine da conidi: la colorazione è efficace (Fig. 7).

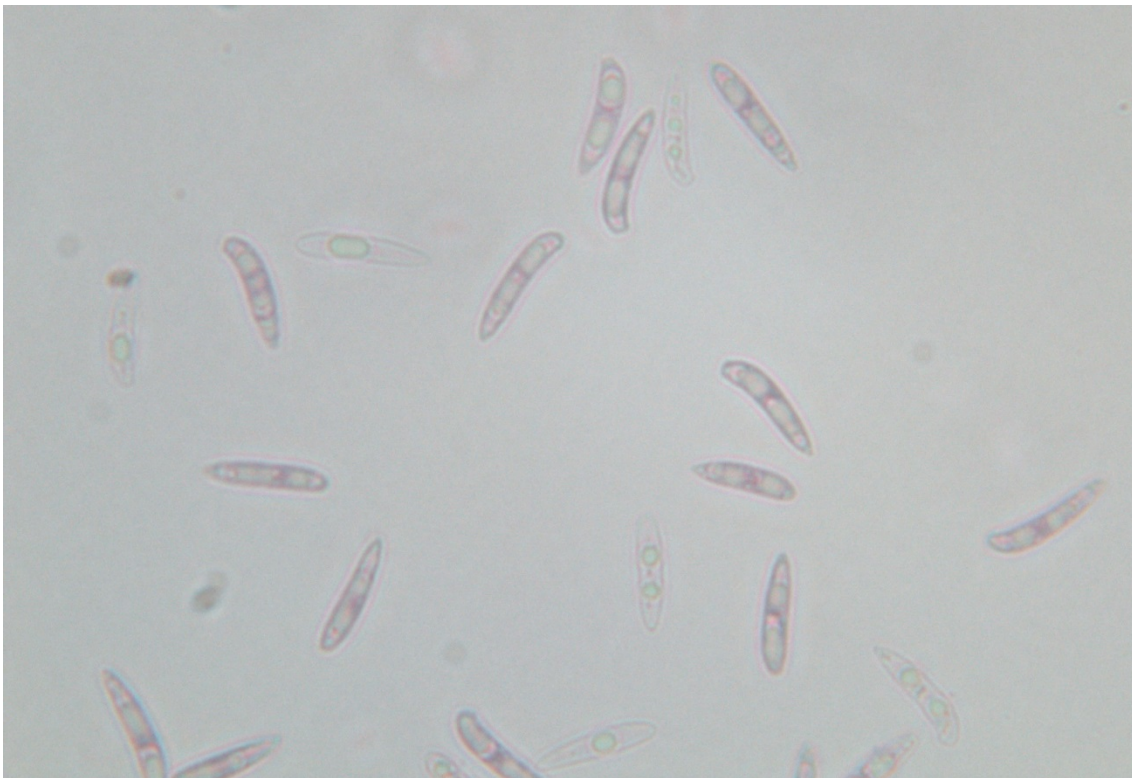


Figura 7. Spore di *Hymenoschyphus fraxineus* da conidi raccolti al suolo e colorate con fucsina acida.

2. Campioni di monitoraggio nuovi da colorare: la colorazione è efficace sulle spore, ma non colora i pollini; prove di colorazione contemporanea di pollini e spore non hanno dato esito positivo (diverse miscele di fucsina basica ed acida con gelatina).
3. Vetrini di monitoraggio degli anni precedenti: la colorazione è efficace. Questo risultato è basilare per verificare la possibilità di ricolorazione degli stessi e rilettura. La verifica di colorazione è stata effettuata su campioni di monitoraggio provenienti da Villa Welsperg e relativi ad agosto 2014, periodo in cui la spora dovrebbe trovarsi dispersa in atmosfera in presenza del fungo. La colorazione ha permesso di individuare sui vetrini le spore di *Hymenoschyphus fraxineus*, colorate di rosa (Fig. 8). Queste sono caratterizzate da un corpo fusiforme, con una base arrotondata e leggermente piegata (a virgola) ed un apice assottigliato. La spora presenta, in fucsina acida, una banda colorata nella parte centrale del corpo, trasversale alla lunghezza e leggermente spostata verso la base.

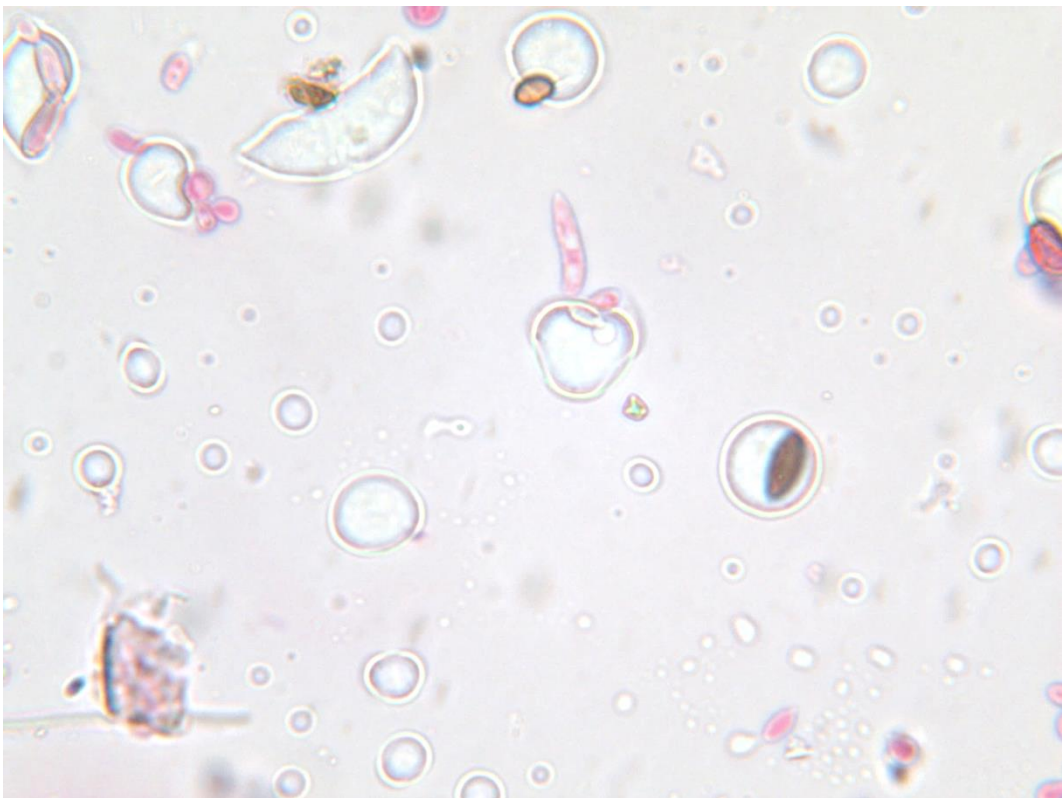
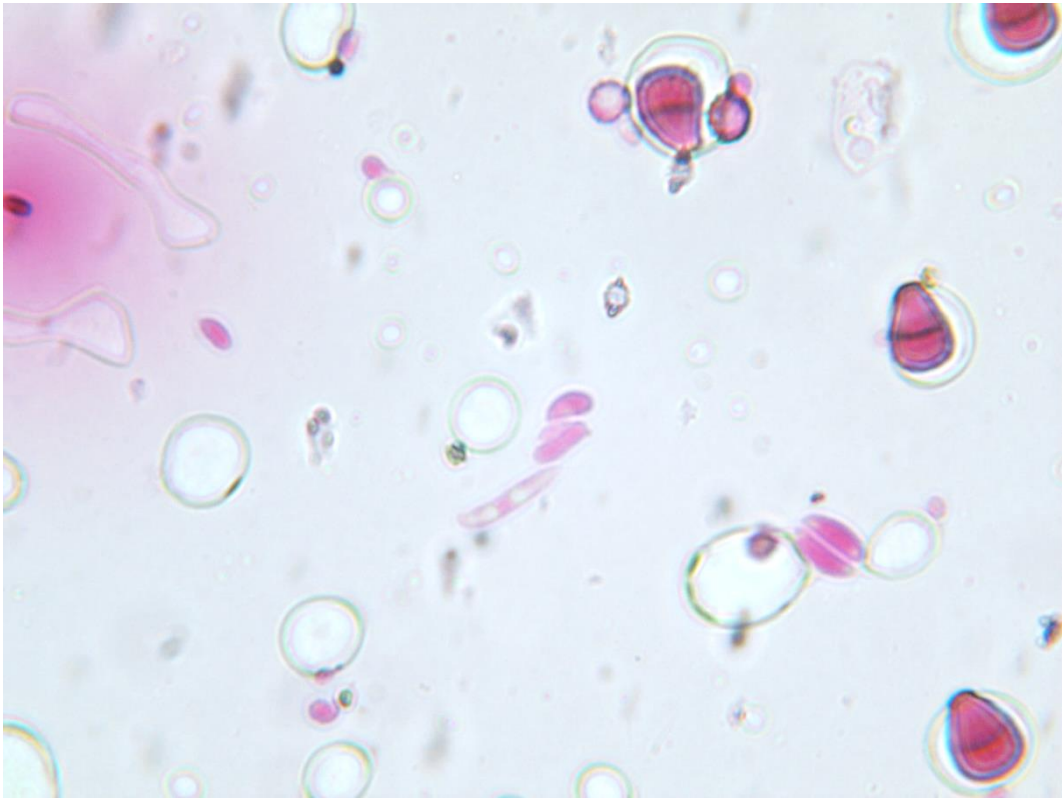


Figura 8. Vetrini di monitoraggio aerobiologico ricolorati con fucsina acida. Nei cerchi, spore di *Hymenoschyphus fraxineus*.

## Indicazioni pratiche per la colorazione e la lettura

Di seguito i passaggi da seguire per la ricolorazione a partire dai vetrini di monitoraggio aerobiologico da archivio.

I vetrini devono venire riscaldati ad una temperatura di circa 40°C (*piastra riscaldante per il monitoraggio*) per rendere fluida la gelatina di montaggio

Si procede quindi allo scostamento del vetrino coprioggetto aiutandosi con la lama di un bisturi o una pinzetta a punte sottili, agendo molto delicatamente per non spezzarlo.

Si applica sul vetrino qualche goccia di fucsina acida, come da soluzione fornita da FEM.

Il coprioggetto viene quindi adagiato nuovamente sul proprio vetrino e, dopo qualche minuto, è pronto per la lettura.

Dato la forma e dimensione della spora, risulta necessaria una fase di addestramento al riconoscimento della stessa e l'utilizzo di materiale iconografico di riferimento.

## Riferimenti bibliografici

Downie JA (2017) Ash dieback epidemic in Europe: How can molecular technologies help? PLoS Pathog 13(7): e1006381. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006381>

Kowalski T. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. For Pathol. 2006;36:264–270. doi: 10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x.

Alberto Santini, Luisa Ghelardini, Paolo Capretti, 2015. Vie d'ingresso dei patogeni forestali esotici. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia*. Anno LXIII: 151-157

Forestry commission pest alert on Ash dieback. 2012 [https://www.forestry.gov.uk/pdf/pest-alert-ash-dieback-2012.pdf/\\$file/pest-alert-ash-dieback-2012.pdf](https://www.forestry.gov.uk/pdf/pest-alert-ash-dieback-2012.pdf/$file/pest-alert-ash-dieback-2012.pdf) consultato il 7/12/2017

V. Timmermann, I. Børja, A. M. Hietala, T. Kirisits and H. Solheim 2011. Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 41, 14–20