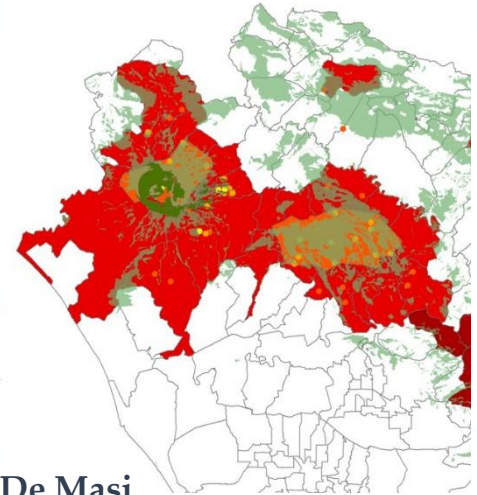
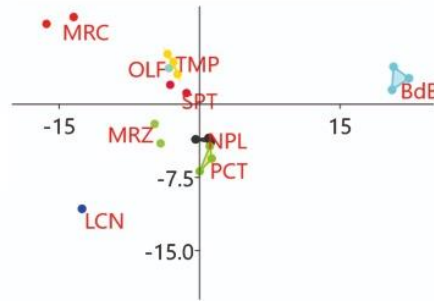
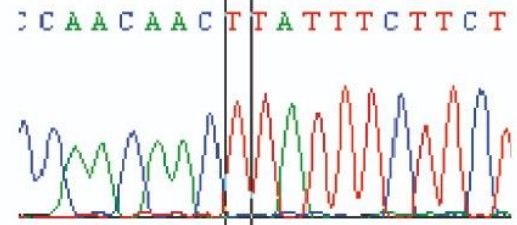
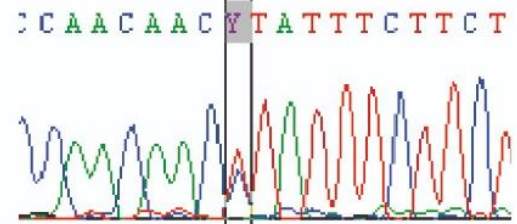




TRASFERIMENTO DI INNOVAZIONE PER LA VALORIZZAZIONE DEL CASTAGNO DA FRUTTO



a cura di
Marina Maura Calandrelli e Luigi De Masi



Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri
© Cnr Edizioni, anno 2022
Piazzale Aldo Moro, 7 - 00185 Roma
www.edizioni.cnr.it

ISBN 978-88-8080-366-9 (electronic edition)
DOI: <https://doi.org/10.61008/CASTARRAY2022>



Una valutazione tra pari ha approvato i contenuti del volume

TRASFERIMENTO DI INNOVAZIONE PER LA VALORIZZAZIONE DEL CASTAGNO DA FRUTTO

Curatori

Marina Maura Calandrelli - CNR, Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (IRET), <https://www.iret.cnr.it>

Luigi De Masi - CNR, Istituto di Bioscienze e Biorisorse (IBBR), <https://www.ibbr.cnr.it>

Autori in ordine alfabetico

Andrea Becchimanzi, Marina Maura Calandrelli, Mario Conti, Emiddio de Franciscis di Casanova,
Luigi De Masi, Flora Della Valle, Franco Di Pippo, Elvira Ferrara, Rosario Nicoletti, Angelina Nunziata,
Milena Petriccione, Giulia Verrilli

Progetto grafico, coordinamento editoriale e impaginazione

Marina Maura Calandrelli

Immagine copertina

Marina Maura Calandrelli, Francesco Caracciolo, Angelina Nunziata

Ringraziamenti

Le attività svolte nell'ambito del progetto "CASTARRAY" sono state finanziate dalla Regione Campania in attuazione del Piano di Sviluppo Rurale (PSR) 2014-2020. Il Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA) è stato il coordinatore del progetto. Il Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) e l'Azienda agricola "Franco Di Pippo" sono stati Partner del progetto.

Indice

| | | |
|---|------|----|
| <i>Prefazione</i> | pag. | 7 |
| Flora Della Valle, Emiddio de Franciscis di Casanova | | |
| <i>Cenni di biogeografia ed etnobotanica del castagno</i> | “ | 11 |
| Elvira Ferrara, Milena Petriccione | | |
| <i>La castanicoltura in Campania: stato di fatto e sviluppi futuri</i> | “ | 27 |
| Marina Maura Calandrelli | | |
| <i>Profili genetico-molecolari per l'identificazione varietale del castagno</i> | “ | 41 |
| Luigi De Masi | | |
| <i>Fattibilità tecnica del trasferimento alla filiera castanicola di strumenti per il riconoscimento genetico varietale</i> | “ | 57 |
| Angelina Nunziata, Giulia Verrilli, Elvira Ferrara | | |
| <i>Risposta del castagno alle avversità, miceti endofiti e ruolo ecologico</i> | “ | 69 |
| Rosario Nicoletti, Andrea Becchimanzi, Luigi De Masi | | |
| <i>Attività agronomiche e studi di fattibilità di un'azienda castanicola pilota</i> | “ | 91 |
| Mario Conti, Franco Di Pippo | | |

Profili genetico-molecolari per l'identificazione varietale del castagno

Luigi De Masi

Affiliazione

CNR – Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Bioscienze e Biorisorse (IBBR), Via Università, 133 - 80055 Portici
Email: luigi.demasi@ibbr.cnr.it

Il castagno appartiene al genere botanico *Castanea*, formato fino a 13 specie diverse, della famiglia *Fagaceae*, che include altri sette generi tra cui i noti *Fagus* e *Quercus* [Mellano et al. 2012]. Nel corso della storia, eventi naturali come le glaciazioni e i più relativamente recenti fattori antropici hanno influenzato significativamente la dispersione del castagno nel mondo, come evidenziato da dati palinologici e paleobotanici a riguardo [Roces-Díaz et al. 2018]. Fino ad arrivare a oggi, con quattro specie botaniche più largamente coltivate nelle aree temperate dell'emisfero settentrionale, distribuite nei tre continenti America, Asia, Europa e Paesi del Mediterraneo: castagno americano (*Castanea dentata* Borkh.), castagno cinese (*Castanea mollissima* Bl.), castagno giapponese (*Castanea crenata* Sieb. & Zucc.), e castagno europeo (*Castanea sativa* Mill.). Quest'ultima in particolare è la sola specie nativa del continente europeo che forma ecosistemi agroforestali di enorme rilevanza, fornendo fin dall'antichità importanti servizi ecosistemici (qualità dell'aria e dell'acqua, mitigazione climatica, resilienza, biodiversità, paesaggio, protezione del territorio etc.), insieme a risorse primarie (castagne, legno, tannini, fibre, biomassa etc.) e secondarie (miele, funghi etc.). Le sue castagne sono da sempre un prodotto tipico della dieta Mediterranea, rappresentando un'eccellente fonte di carboidrati complessi, come amido privo di glutine, fibre alimentari, vitamine (A, gruppo B, C ed E), minerali (fosforo, potassio, calcio e magnesio), acidi fenolici (acido gallico), e polifenoli (acido ellagico) [de Vasconcelos et al. 2010, Sharifi-Rad et al. 2022]. Inoltre, seppur in minore misura, contengono carboidrati semplici (saccarosio), acidi grassi, alcuni amminoacidi essenziali e non essenziali, e loro interessanti composti derivati [de

Vasconcelos et al. 2010, Servillo et al. 2016]. Il castagno è stato utilizzato nei tempi antichi anche come pianta medicinale, mentre solo in tempi più recenti è stata scoperta la presenza di composti naturali con importanti attività biologiche, anche nelle foglie e nelle parti non edibili del frutto, che fino a poco tempo fa rappresentavano solo degli scarti [Vella et al. 2019]. Questa biomassa, solo in parte valorizzata, è particolarmente idonea per il recupero di molecole bioattive da utilizzare come ingredienti funzionali nell'industria nutraceutica, farmaceutica e cosmetica. Per massimizzare i benefici sulla salute della popolazione ottenibili dal consumo delle castagne, è importante che ciascuna varietà tradizionale sia precisamente localizzata sul territorio e sia caratterizzata dal punto di vista nutrizionale-salutistico e attraverso moderni sistemi di identificazione genetica che ne possano certificare la varietà di appartenenza [Nunziata et al. 2020, Calandrelli et al. 2021]. Difatti, l'esteso utilizzo della propagazione vegetativa nella pratica agronomica ha portato a generare errori di classificazione varietale, quando ad esempio una nuova denominazione veniva data a un clone di castagno che era stato spostato dal suo areale d'origine in un'area differente (sinonimie) oppure quando il nome di una cultivar locale era attribuito a un nuovo clone importato (omonimie) sulla base di somiglianze esteriori. Di conseguenza, da questo punto di vista, è necessario identificare in maniera certa e univoca i genotipi di castagno di interesse per associarli correttamente alla loro composizione in bioattivi.

Il nostro Paese è tra i principali produttori mondiali di castagne di qualità, grazie soprattutto alla Campania (Dati FAOSTAT 2020). La stessa Regione vanta anche una tradizione antichissima in castanicoltura ed oggi rappresenta un'importante riserva di germoplasma castanicolo [Grassi 2006]. La caratterizzazione di queste risorse genetiche e la conoscenza delle relazioni genetiche tra le varietà locali sono necessarie per preservare l'agrobiodiversità castanicola dall'erosione genetica [Nunziata et al. 2020]. L'ampia diversità delle risorse genetiche del castagno rappresenta il punto di partenza per il miglioramento varietale combinando metodiche tradizionali e tecnologie innovative per identificare nuovi tratti di interesse ed aumentare la produttività e il valore nutrizionale del frutto. Le conoscenze scientifiche accumulate fino ad oggi offrono un'importante opportunità per sviluppare genotipi superiori di castagno attraverso programmi di miglioramento genetico tradizionale col fine di rinnovare le piantagioni esistenti.

Purtroppo, a dispetto della sua importanza, dagli ultimi decenni la coltivazione del castagno è in progressivo declino a causa di infezioni e infestazioni, anche associate all'introduzione accidentale di specie aliene [Nicoletti et al. 2021]. Queste avversità hanno seriamente decimato estese coltivazioni, mettendo a rischio di

estinzione molte delle varietà locali più pregiate [Mellano et al. 2012], un patrimonio unico tutelato anche da marchi nazionali ed europei. Un qualsiasi tentativo di rilancio della castanicoltura, per essere efficace, non può prescindere dal garantire l'identità genetica del materiale di propagazione da impiegare nei nuovi impianti. La rintracciabilità della reale identità genetica di cultivar locali, tra loro molto simili soprattutto nelle prime fasi di sviluppo, potrà consentire una maggiore sicurezza in tali investimenti. Inoltre, la caratterizzazione e la corretta catalogazione delle risorse castanicole dovranno essere disponibili agli *stakeholder* per una tutela mirata e un utilizzo efficace del patrimonio castanicolo, così come per contrastare il commercio fraudolento. L'auspicabile ripristino di questo rilevante comparto della Campania, solo in tempi più recenti considerato quanto realmente merita, potrà inoltre favorire una gestione agro-forestale sostenibile con immensi benefici in termini di qualità della vita.

L'identificazione genetica si realizza mediante l'analisi delle molecole di DNA

Nella prima metà del Novecento, una serie di esperimenti fondamentali di biologia molecolare ha consentito di dimostrare che il materiale ereditario che gli esseri viventi si tramandano attraverso le generazioni è costituito da molecole di DNA. A distanza di poco tempo venne determinata anche la struttura molecolare del DNA, la oramai nota "doppia elica", che consiste in due catene di verso opposto (antiparallele) legate chimicamente dalla complementarietà delle quattro basi azotate costituenti: adenina+timina (A+T) e citosina+guanina (C+G). La struttura a doppia elica svelò anche il segreto dell'ereditarietà: il DNA può essere aperto, come una cerniera, consentendo la replicazione dell'informazione genetica, racchiusa nella sequenza ordinata delle basi azotate che ciascuna cellula trasmette alle cellule della propria discendenza. Tali scoperte, che hanno enormemente cambiato il nostro modo di concepire la vita e la sua evoluzione, furono insignite del premio Nobel nel 1962, dopo essere state pubblicate il 25 aprile del 1953 in tre articoli successivi sulla rivista scientifica *Nature* [Wilkins 2013]. Nel 1993, dopo 40 anni da questi importanti eventi storico-scientifici, Kary B. Mullis ottenne il premio Nobel per una delle più importanti invenzioni della biologia molecolare: la reazione a catena della polimerasi, più brevemente nota con l'acronimo "PCR" dall'inglese "*Polymerase Chain Reaction*" [Mullis e Faloona 1987]. L'amplificazione in laboratorio di determinate regioni di DNA attraverso la PCR, in modo relativamente semplice e rapido, si è subito diffusa come metodica estremamente selettiva e

sensibile, tanto che oggi è divenuta indispensabile in una varietà di applicazioni scientifiche che hanno portato ad una enorme accelerazione degli studi su tutti gli esseri viventi. In tal modo, attraverso sequenze di DNA specie- o varietà-specifiche, è possibile ad esempio certificare la specie botanica e la cultivar di appartenenza per semi e piantine che si desiderano utilizzare per una nuova piantagione.

Gli esseri viventi conservano e trasportano le informazioni codificate relative al loro patrimonio genetico nel proprio DNA, che è pertanto una macromolecola informazionale indispensabile per i processi vitali e per la generazione della discendenza. Il patrimonio genetico di un determinato organismo coincide quindi con la sequenza completa delle basi del DNA presente in ciascuna delle sue cellule nucleate ed è denominato genoma (**Figura 1**). La natura chimica delle molecole di DNA è tale che esse possono tollerare limitati cambiamenti (mutazioni) nelle informazioni genetiche che custodiscono. I principali meccanismi evolutivi (selezione naturale e/o deriva genetica) hanno consentito di fissare queste mutazioni nelle popolazioni e di portare alla creazione dell'ampia diversità genetica di specie e varietà vegetali oggi esistenti (biodiversità vegetale). I polimorfismi sono particolari mutazioni del DNA presenti con almeno l'1% di frequenza degli individui nella popolazione. All'interno delle popolazioni, la conoscenza dettagliata dei polimorfismi genetici, che sono la base molecolare della variabilità fenotipica, è essenziale per comprendere come le piante si evolvono e rispondono ai cambiamenti ambientali e alle nuove malattie, permettendo la creazione di nuove varietà coltivate (cultivar) migliorate nei tratti di interesse per caratteristiche produttive e qualitative superiori. I polimorfismi genetici consentono inoltre di tracciare la storia delle popolazioni, delle varietà e delle specie dai loro progenitori comuni. In genetica, un marcatore molecolare è una sequenza di DNA localizzata in una particolare regione del genoma. Le metodiche di analisi di biologia molecolare consentono di identificare uno specifico marcatore genetico-molecolare (e la sua sequenza di DNA) con le sue varianti polimorfiche in una popolazione. La caratterizzazione molecolare consiste propriamente nell'utilizzo dei marcatori genetico-molecolari basati sul DNA per determinare le caratteristiche genetiche di ciascun organismo in una popolazione e per tracciare le relazioni di parentela tra gli individui, anche lungo le generazioni precedenti fino alle loro origini.

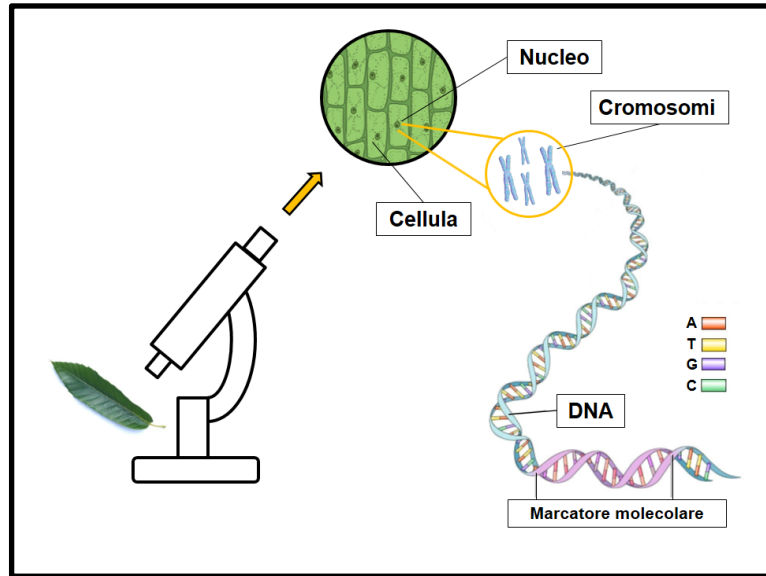


Figura 1 – Le variazioni nella sequenza del DNA genomico (polimorfismi) del castagno consentono la discriminazione varietale attraverso i marcatori molecolari.

Le tecnologie di biologia molecolare basate sulla PCR per l'amplificazione del DNA hanno consentito di effettuare analisi genetico-molecolari per la determinazione della variabilità genetica esistente a livello di DNA tra unità tassonomiche di numerose specie vegetali, incluso il castagno. Col fine di valutare la diversità genetica presente tra varietà strettamente correlate, le molecole di DNA del castagno sono state l'oggetto dell'analisi attraverso numerosi marcatori genetico-molecolari. Questi rappresentano infatti un insostituibile strumento d'indagine che consente di valutare la diversità genetica a livello molecolare essendo indipendenti dall'effetto confondente dovuto alle condizioni ambientali e di crescita della pianta. Nella pratica, un marcatore genetico-molecolare corrisponde esattamente ad una determinata regione di DNA compresa tra due tratti nucleotidici di sequenza nota in basi, localizzati rispettivamente a monte e a valle del marcatore. La

sequenza centrale può essere o meno nota a seconda della tipologia di marcatore. Una definizione più operativa di marcatore genetico-molecolare si riferisce ad una regione (*locus*) del genoma che si caratterizza in modo specifico tramite la sequenza di basi con la quale si identifica e che è rilevabile in maniera inequivocabile mediante sonde molecolari (*probe*) o inneschi (*primer*). I marcatori molecolari utilizzabili per rilevare le differenze nella sequenza di basi (polimorfismi) del DNA genomico sono numerosi e costituiscono strumenti di indagine estremamente efficaci, affidabili ed oggettivi che trovano larga applicazione sia nella ricerca di base sia in quella applicata. Tra i più noti e consolidati marcatori genetico-molecolari basati sulla PCR utilizzati per gli organismi vegetali, si possono citare senza dubbio AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), e SSR (*Simple Sequence Repeats*, conosciuti anche come microsatelliti) [Karp et al. 1996]. A questi, più di recente, si sono aggiunti i polimorfismi a singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP), considerati i marcatori genetico-molecolari del futuro in quanto consentono di raggiungere il limite di risoluzione della singola base nucleotidica intrinseco alla sequenza del DNA [Nunziata et al. 2020]. Tutti questi marcatori genetico-molecolari hanno numerosi vantaggi rispetto alle metodologie tradizionali di identificazione, in quanto mostrano un elevato potere discriminante grazie a selettività, sensibilità, rapidità operativa, e non necessitano di elevate quantità di materiale di partenza. I marcatori molecolari consentono un'efficace differenziazione di individui geneticamente distinti, ma che sono fenotipicamente molto simili tra loro e quasi indistinguibili esteriormente; inoltre, sono particolarmente adatti nel rivelare polimorfismi genetici a livello varietale nelle piante. L'introduzione dei marcatori nel campo dell'identificazione varietale ha suscitato un grande interesse e il numero di specie studiate a tutt'oggi con queste tecniche è considerevolmente elevato. Nei laboratori di biologia molecolare, l'identificazione delle varianti genetiche è eseguita con tecniche che si basano sulla complementarità degli acidi nucleici (ibridazione) e sulla successiva amplificazione enzimatica di frammenti di DNA mediante PCR (ved. **Scheda**). I marcatori molecolari accertano le variazioni tra genotipi diversi identificando differenze nelle sequenze di basi che costituiscono il DNA genomico; questi marcatori, quindi, non essendo influenzati dall'ambiente, forniscono una impronta molecolare delle varietà (DNA fingerprint).

SCHEDA DI APPROFONDIMENTO

La PCR è alla base delle moderne tecnologie di biologia molecolare

*Nella cellula, il DNA si replica in maniera semiconservativa, cioè i due filamenti che formano la doppia elica del DNA parentale si separano longitudinalmente e ciascuno di essi, indipendentemente dall'altro, viene utilizzato come stampo per la formazione di un nuovo filamento complementare a quello preesistente. Il risultato di questo processo complesso e altamente regolato è la formazione di due molecole figlie di DNA a doppia elica, identiche tra loro e ciascuna composta da un filamento di DNA parentale e da un filamento complementare di nuova sintesi. L'enzima DNA polimerasi è responsabile della sintesi dei nuovi filamenti (polimerizzazione) a partire dai precursori nucleotidici delle basi azotate (dNTP): adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T). La DNA polimerasi può conservare la sua funzionalità anche in provetta (in vitro) al di fuori della cellula e può quindi essere utilizzata in laboratorio per sintetizzare nuove molecole di DNA tramite la PCR (**Figura 2**). Un sistema di sintesi enzimatica in vitro che permette di generare specifiche sequenze di DNA a partire anche da una singola molecola di DNA di partenza come stampo (template). I template sono filamenti singoli che possono essere ottenuti semplicemente riscaldando il DNA a temperature prossime all'ebollizione. La reazione utilizza due inneschi (primer), formati da oligonucleotidi (oligo) di sintesi, che si legano specificamente (annealing) con le sequenze a loro complementari situate all'estremità 3' di ciascuno dei due filamenti di DNA della sequenza bersaglio. La DNA polimerasi determina l'allungamento dei due primer appaiati utilizzando i quattro precursori (dNTP), in modo tale che nei filamenti di DNA di nuova sintesi siano presenti ancora i siti per l'appaiamento dei primer. La PCR consente così di generare, ed allo stesso tempo di amplificare in numero, specifici frammenti di DNA, denominati ampliconi, anche a partire da una singola molecola di DNA stampo di partenza attraverso una sintesi enzimatica in vitro. La PCR è una reazione ciclica, ripetuta in genere tra 25-40 cicli, ciascuno costituito da tre fasi, realizzate su apparecchiature dedicate denominate termociclatori (DNA Thermal Cycler) che permettono di programmare temperatura e durata di ciascuna fase: (i) denaturazione termica del DNA stampo, in cui il DNA "fonde" (melting) attraverso la separazione dei due filamenti della doppia elica; (ii) appaiamento complementare (annealing) dei primer al DNA stampo; (iii) nuova sintesi del DNA condotta dalla DNA polimerasi a partire dai primer appaiati. La PCR fornisce come risultato un accumulo esponenziale di ampliconi, difatti ad ogni ciclo il numero di molecole di DNA raddoppia per la replicazione semiconservativa, in quanto le molecole sintetizzate in un dato ciclo sono utilizzate come stampo nel ciclo successivo. Al termine di "N" cicli si produrranno un numero massimo teorico di 2^N molecole di DNA a doppia elica. Il polimorfismo molecolare rilevabile è dovuto a differenze di sequenza che determinano la formazione di un diverso prodotto di amplificazione oppure un*

frammento di DNA che è amplificato da una unità tassonomica ma non da un'altra, osservabili come bandeggi di amplificazione (paragonabili a codici a barre) che caratterizzano gli individui analizzati. I marcatori genetico-molecolari basati sulla metodica PCR rappresentano un sistema di elezione con elevata selettività e sensibilità per identificare variazioni nella sequenza del DNA genomico degli organismi e per determinare le distanze genetiche reciproche. Es. l'amplificazione del DNA tramite PCR con primer arbitrari consente di rilevare variazioni individuali mediante l'analisi RAPD: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrpd>

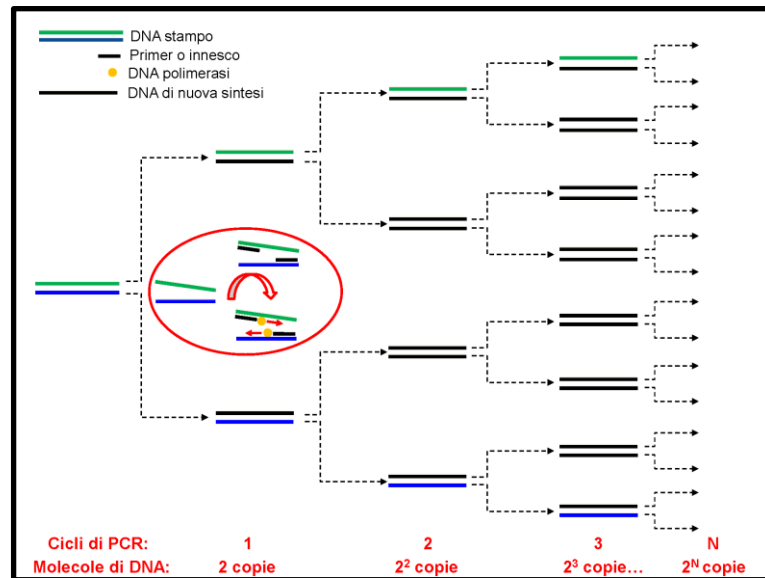


Figura 2 – Le variazioni di sequenza del DNA genomico (polimorfismi) possono essere rilevate attraverso marcatori molecolari basati sulla PCR.

La caratterizzazione del castagno mediante marcatori genetico-molecolari

In tempi recenti è stata dimostrata la trasferibilità di marcatori genetico-molecolari del DNA di castagno attraverso la barriera di specie, ciò ha mostrato l'evoluzione conservativa e la colinearità dei genomi (sintenia) tra differenti specie del genere *Castanea*. Questo spiega anche la presenza all'interno dello stesso genere del fenomeno più o meno frequente della ibridazione interspecifica con l'introggressione di nuovi caratteri. Nonostante ciò, la domesticazione del castagno e la successiva selezione per i caratteri desiderati ha portato progressivamente ad una riduzione generale nella variabilità genetica rispetto alle popolazioni naturali [De Masi et al. 2004]. Poiché la specifica costituzione genetica (genotipo) delle cultivar di castagno è strettamente legata alla loro zona di crescita, ulteriori studi sono necessari per studiare la ricchezza genetica e le varianti esistenti di ciascuna varietà. I polimorfismi, dunque, rappresentano dei marcatori genetico-molecolari che potenzialmente consentono di discriminare tra varietà di castagno anche strettamente correlate tra loro. I castanicoltori propagano vegetativamente le varietà di castagno con lo scopo di preservare i caratteri peculiari del frutto di ciascuna varietà, con la conseguenza che una cultivar è formata da popolazioni clonali di alberi aventi le stesse caratteristiche genetiche (genotipo). Il "profilo del DNA" (DNA fingerprint) di ciascun albero di castagno può quindi essere considerato rappresentativo della popolazione della cultivar di appartenenza e può consentire la differenziazione varietale (**Figura 3**) [Galderisi et al. 1998, De Masi et al. 2002, 2004]. I marcatori molecolari sono inoltre indispensabili per valutare il grado di diversità genetica delle popolazioni varietali e naturali, da cui poter attingere nuove risorse genetiche, e per stabilire la loro potenziale capacità adattativa, determinata geneticamente, alle sempre più mutevoli condizioni ambientali [Freitas et al. 2021].

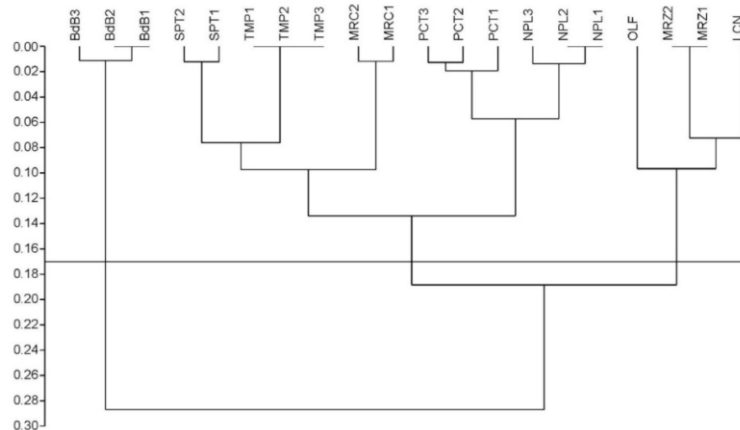


Figura 3. Discriminazione varietale e clonale in castagno basata su polimorfismi del DNA rilevati mediante marcatori molecolari RAPD [fonte: Nunziata et al. 2020].

La selezione assistita da marcatori (*Marker Assisted Selection, MAS*) è da tempo uno strumento ben consolidato per i *breeder* attraverso cui è possibile identificare e selezionare individui con caratteri di interesse sulla base di marcatori genetico-molecolari correlati geneticamente. La MAS è particolarmente utile per selezionare tratti di interesse che sono difficili o dispendiosi da misurare (in termini di tempo e costi) e/o sono espressi tardivamente nello sviluppo della pianta. Oggi, grazie al sequenziamento del DNA (genomica) e del corrispondente RNA (trascrittomica) è possibile conoscere nei dettagli una specie vegetale come mai prima d'ora. Un'approfondita comprensione della diversità genetica che è alla base della variabilità osservata nel castagno, dal livello molecolare della scala della singola base nucleotidica nel DNA al livello superiore della scala delle funzioni biologiche, è essenziale per rendere disponibile la ricchezza delle risorse genetiche per il miglioramento genetico e per i nuovi impianti necessari per rinnovare i castagneti in declino. Le informazioni derivanti dagli studi di genomica, come le banche dati di sequenze di basi associate con set di marcatori genetico-molecolari, consentono infatti di fare correlazioni genotipo-fenotipo. Per di più, studi di genomica comparativa con le differenti specie di castagno possono essere utilizzati per scovare nuove variazioni nel

DNA con cui sviluppare marcatori molecolari specie- e cultivar-specifici. Nell'attuale contesto, in vista di un rilancio della coltivazione del castagno, l'autenticità e la tracciabilità nella filiera castanicola sono fattori chiave rispettivamente per garantire gli impianti e proteggere i produttori e i consumatori dal commercio fraudolento. Cosa ancora più importante, i risultati di questi studi potranno essere resi da subito disponibili a tutti gli stakeholder per la corretta discriminazione varietale. Pur tuttavia, ulteriori ricerche sulle risorse genetiche locali di *C. sativa* sono ancora necessarie e desiderabili per incrementare la qualità dei prodotti, la produttività e la sostenibilità dei castagneti, consentendo al contempo la salvaguardia degli hotspot di biodiversità, importanti riserve di risorse genetiche in pericolo. Per affrontare queste nuove sfide, è fondamentale trarre vantaggio da approcci multidisciplinari e innovativi con l'obiettivo di caratterizzare e sfruttare l'enorme potenziale della diversità castanicola, sia all'interno delle specie sia tra le diverse specie, come fonte di nuove caratteristiche genetiche utili.

L'analisi molecolare basata sul DNA è stata diffusamente utilizzata per lo studio del castagno al fine di caratterizzare geneticamente il germoplasma disponibile [Silvanini et al. 2011]. Tra i primi studi effettuati in Italia, con l'obiettivo di valorizzare le cultivar campane e di contribuire a risolvere casi di frode a carico dei marroni, ricordiamo che Galderisi e colleghi (1998) hanno impiegato i marcatori RAPD per identificare le principali cultivar commerciali di castagno e di marroni della Campania. I risultati di queste ricerche hanno mostrato che la maggioranza dei cloni tipo-marrone hanno una variabilità genetica estremamente ristretta, ad eccezione di alcune varianti clonali localizzate ai confini degli areali di coltivazione delle cultivar principali. D'altra parte alcune note cultivar di marroni possono essere considerate varianti clonali fatte risalire a cultivar principali. In ogni caso, l'elevata omogeneità genetica osservata tra i marroni studiati induce a ritenere che esse abbiano avuto una origine comune determinata dall'elevata qualità dei frutti che ne ha favorito la diffusione e lo scambio come materiale di propagazione tra i castanicoltori. La stessa analisi condotta su cultivar di castagni tipo-non marrone ha evidenziato una variabilità genetica sufficiente tale da consentirne la discriminazione varietale. I risultati di questi studi sono stati di importanza per contribuire all'attribuzione del marchio IGP a cultivar campane. Solo più recentemente, grazie all'avanzamento delle metodiche di indagine biomolecolare e all'abbattimento dei loro costi, sono stati sviluppati strumenti molecolari innovativi per l'identificazione varietale del castagno europeo in Campania [Nunziata et al. 2020]. Questi studi rispondono a una duplice necessità: la biodiversità castanicola ha raggiunto livelli di rischio di erosione

genetica mai raggiunti prima e i castanicoltori non hanno sufficienti strumenti per proteggere e valorizzare i genotipi tradizionali. Nell'ambito del progetto Castarray, finanziato dalla M16.1.1 Az. 1 del PSR Campania 2014-2020, è stato inizialmente caratterizzato un gruppo di cultivar di castagno rappresentativo per un intervallo di variabilità genetica sufficientemente ampio (**Figura 3**). Un set di SNP è stato ottenuto per omologia da sequenze di castagno giapponese (*Castanea crenata*) disponibili nella letteratura scientifica e successivamente è stato validato sul gruppo varietale selezionato. Infine, alcuni degli SNP che si sono dimostrati necessari e sufficienti per la discriminazione varietale sono stati rilevati operativamente mediante una particolare applicazione della PCR, denominata KASP (*Kompetitive Allele-Specific PCR*), per generare marcatori genetico-molecolari utili allo scopo.

L'identificazione fenotipica di cultivar e varianti clonali è fondamentale nella produzione vivaistica e nella selezione del germoplasma. Collezioni di germoplasma sono state costituite in tutto il mondo con l'intento di preservare le varianti genetiche meno diffuse; di conseguenza, è molto importante stabilire che tali collezioni siano rappresentative e non ridondanti, oltre a confermare l'origine genetica del materiale vegetale mediante controlli a posteriori. Inoltre, coloro che selezionano nuove varietà (breeder) fanno affidamento sul germoplasma disponibile nelle collezioni per ottenere piante con nuove caratteristiche. L'analisi genetico-molecolare rappresenta un'operazione che non permette di migliorare le piante direttamente. Tuttavia, tale analisi produce delle informazioni che possono ridurre drasticamente il tempo necessario per raggiungere l'obiettivo dei programmi di incrocio. È noto che il tempo rappresenta la maggiore limitazione nello sviluppo di tali programmi, soprattutto per specie vegetali come il castagno che richiedono un lungo periodo (dell'ordine di anni) per raggiungere la maturità sessuale. L'ausilio dei marcatori molecolari può ridurre estremamente il tempo richiesto affinché un programma di miglioramento giunga in porto, dato che rende possibile la selezione di piante attraverso uno screening molto precoce, rapido ed efficiente. Quindi è sicuramente vantaggiosa la possibilità di poter integrare i dati fenotipici disponibili con le informazioni sulle relazioni genetiche al fine di massimizzare la diversità genetica tra i progenitori da selezionare per il miglioramento genetico tradizionale. Uno screening della diversità genetica all'interno di popolazioni usate per incroci può aiutare nel programmare gli stessi con maggiore efficienza, così da minimizzare la dimensione della popolazione di partenza utilizzata e allo stesso tempo mantenendo il più possibile elevata la diversità.

E' questo il caso delle *core collection*, collezioni che sono un sottoinsieme di una più grande raccolta di germoplasma e che contengono accessioni scelte per rappresentare la variabilità genetica di tutta la collezione di germoplasma. L'obiettivo principale di usare una *core collection* è quello di migliorare la gestione e l'utilizzo delle collezioni di risorse genetiche. In questo modo, il pool genico messo a disposizione dalla natura può essere utilizzato più efficacemente dai selezionatori per creare ulteriori varietà geneticamente diverse tra loro che rispondano allo scopo.

Conclusioni e prospettive

I risultati ottenuti mediante le tecnologie di biologia molecolare rappresentano un notevole avanzamento delle nostre conoscenze sulla diversità genetica nell'ambito delle specie *Castanea sativa*. Ciò permette inoltre di autenticare e monitorare l'identità del materiale vegetale utilizzato. I polimorfismi osservati consentono di classificare i campioni analizzati, così fornendo un metodo fine per identificare gli alberi, soprattutto quelli notevolmente simili da un punto di vista fenotipico. I marcatori genetico-molecolari forniscono un'evidenza certa ed inconfutabile dell'eventuale polimorfismo presente perché determinato direttamente a livello del DNA. I marcatori genetico-molecolari, quando resi disponibili agli utilizzatori finali per il tramite delle Istituzioni scientifiche, hanno dimostrato di essere dei validi strumenti per la corretta gestione dei castagneti, dei vivai e dei parchi naturali. Inoltre, la natura molecolare della diversità genetica suggerisce che può essere informativa anche in contesti molto diversi, perché stabilmente associata a ciascuna cultivar, e può essere anche utilizzata dai breeder per la MAS in progetti di miglioramento genetico. Infine, l'auspicio è che ulteriori studi riguardino molte altre cultivar di castagno per consentire la creazione di banche dati di riferimento, oltre all'implementazione e alla disponibilità dei metodi molecolari come strumenti di routine ad integrazione delle metodiche tradizionali, a vantaggio di tutti gli stakeholder della filiera castanicola. Per perseguire l'obiettivo comune di mantenere vitale questo settore, senza alcun dubbio chiave per il nostro Paese, saranno necessari importanti investimenti da parte delle aziende coinvolte in aggiunta agli aiuti governativi.

Riferimenti bibliografici

- Calandrelli M.M., Nunziata A., De Masi L. Studio preliminare sulla mappatura geografica della diversità genetica castanicola mediante strumenti GIS. Atti del “XIII Convegno Nazionale sulla Biodiversità (Biodiversità 2021): Agricoltura, Ambiente e Salute”, p. 245, online 7-9 settembre 2021, Foggia, pubblicato online: 7 settembre 2021, ISBN: 9788874271016, <https://drive.google.com/file/d/1-OjoWIYCRubnt6H8DkwAhe-Tg6jF-R2I/view>.
- De Masi, L.; Minasi, P.; Boscaino, F.; Galano, G.; Castaldo, D.; Laratta, B. A preliminary study on DNA typing of Calabrian chestnut by RAPD analysis. *Essenze Derivati Agrumari* **2002**, 7, 3–9.
- De Masi, L.; Castaldo, D.; Minasi, P.; Laratta, B. Caratterizzazione e Certificazione di Qualità di fico e Castagno Calabresi Attraverso Moderne Tecniche di Biologia Molecolare; Monografia.; *Stazione Sperimentale per l'Industria delle Essenze e dei Derivati dagli Agrumi*, Reggio Calabria, Italy, **2004**.
- De Vasconcelos, M.C.B.M.; Bennett, R.N.; Rosa, E.A.S.; Ferreira-Cardoso, J.V. Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. *J Sci Food Agr.* **2010**, 90(10), 1578-1589. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4016>.
- Freitas, T.R.; Santos, J.A.; Silva, A.P.; Fraga, H. Influence of Climate Change on Chestnut Trees: A Review. *Plants* **2021**, 10, 1463. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10071463>.
- Galderisi U.; Cipollaro M.; Di Bernardo G.; De Masi L.; Galano G.; Cascino A. Molecular typing of Italian sweet chestnut cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **1998**, 73(2): 259-263. DOI: <https://doi.org/1080/14620316.1998.11510973>.
- Grassi, G. Germoplasma e biodiversità del castagno da frutto in Campania. In *Il Castagno in Campania—Problematiche e Prospettive Della Filiera*; Cristinzio, G., Testa, A., Eds.; Società Editrice Imago Media, Dragoni (CE), Italy, **2006**; pp. 62–73.
- Karp, A.; Seberg, O.; Buiatti, M. Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. *Annals of Botany* **1996**, 78, 2, 143–149, DOI: <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0106>.
- Mellano, M.G.; Beccaro, G.L.; Donno, D.; Marinoni, D.T.; Boccacci, P.; Canterino, S.; Cerutti, A.K.; Bounous, G. *Castanea* spp. biodiversity conservation: Collection and characterization of the genetic diversity of an

- endangered species. *Genetic Resources and Crop Evolution* **2012**, 59, 1727–1741. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9794-x>.
- Mullis, K.B.; Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology* **1987**, 155, 335-350. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6).
- Nicoletti, R.; Beccaro, G.L.; Sekara, A.; Cirillo, C.; Di Vaio, C. Endophytic Fungi and Ecological Fitness of Chestnuts. *Plants* **2021**, 10, 542. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10030542>.
- Nunziata, A.; Ruggieri, V.; Petriccione, M.; De Masi, L. Single nucleotide polymorphisms as practical molecular tools to support European chestnut agrobiodiversity management. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21, 4805. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21134805>.
- Roces-Díaz, J.V.; Jiménez-Alfaro, B.; Chytrý, M.; Díaz-Varela, E.R.; Álvarez-Álvarez, P. Glacial refugia and mid-Holocene expansion delineate the current distribution of *Castanea sativa* in Europe. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **2018**, 491, 152-160. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2017.12.004>.
- Sharifi-Rad, J.; Quispe, C.; Castillo, C.M.S.; Caroca, R.; Lazo-Vélez, M.A.; Antonyak, H.; Polishchuk, A.; Lysiuk, R.; Oliinyk, P.; De Masi, L.; Bontempo, P.; Martorell, M.; Daştan, S.D.; Rigano, D.; Wink, M.; Cho, W.C. Ellagic acid: A review on its natural sources, chemical stability, and therapeutic potential. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2022**, 2022, Article ID 3848084. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/3848084>.
- Servillo, L.; Giovane, A.; Casale, R.; Balestrieri, M.L.; Cautela, D.; Paolucci, M.; Siano, F.; Volpe, M.G.; Castaldo, D. Betaines and related ammonium compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry* **2016**, 196, 1301-1309. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.070>.
- Silvanini, A.; Marinoni, D.T.; Beccaro, G.L.; Ganino, T. La caratterizzazione varietale del germoplasma di *Castanea sativa* Mill. *Italus Hortus* **2011**, 18(3), 47-61. URL: http://www.italushortus.it/phocadownload/review/review_15/05.silvanini.pdf.
- Vella, F.M.; De Masi, L.; Calandrelli, R.; Morana, A.; Laratta, B. Valorization of the agro-forestry wastes from Italian chestnut cultivars for the recovery of bioactive compounds. *European Food Research and Technology* **2019**, 245, 2679–2686. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03379-w>.
- Wilkins, G. DNA: Twin strands solved the structure. *Nature* **2013**, 496, 434. DOI: <https://doi.org/10.1038/496434b>.