

L'identità genetica delle cultivar di castagno nella Regione Campania: il progetto CASTARRAY

Angelina Nunziata¹, Milena Petriccione¹, Franco Di Pippo², Bruna Laratta³, Luigi De Masi^{4*}

¹ *Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA), Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (OFA), Caserta*

² *Azienda castanicola "Di Pippo Franco", Roccamonfina (CE)*

³ *Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (IRET), Napoli*

⁴ *CNR, Istituto di Bioscienze e Biorisorse (IBBR), Portici (NA)*

Introduzione

Il castagno (*Castanea sativa* Mill.) è una specie tipica della flora mediterranea di enorme interesse economico ed agro-forestale per il nostro Paese. L'Italia, infatti, è stato il principale produttore europeo di castagne (30%), grazie soprattutto alla Campania con circa il 50% della produzione nazionale (Castellotti e Grassi 2011). Il germoplasma castanico autoctono riveste considerevole importanza per le aziende della regione Campania. Di recente, i consumatori e le aziende castanicole hanno mostrato un rinnovato interesse per le castagne tradizionali, in considerazione della loro rilevante composizione nutrizionale ai fini salutistici (Vella *et al.*, 2019). Dal 2005, con l'arrivo in Campania del cinipide galligeno *Dryocosmus kuriphilus* Y., la produzione di frutti commerciabili si è ridotta notevolmente (Calandrelli *et al.* 2019). Considerato che il controllo chimico del parassita deve essere quanto più possibile limitato, sono perseguite principalmente le strategie del biocontrollo e della selezione di genotipi resistenti. In vista di una ripresa dai danni causati dal cinipide, per un efficace rilancio della castanicoltura è necessario garantire l'identità genetica del materiale di propagazione da impiegare nei nuovi impianti. La possibilità che gli operatori del settore siano posti in condizione di rintracciare con certezza e rapidità la reale identità genetica di cultivar locali fornirà sicurezza degli investimenti. A tal fine sono necessarie una caratterizzazione e una catalogazione delle risorse castanicole campane, che vanno rese disponibili, unitamente ad un semplice strumento di diagnostica molecolare, a tutti gli stakeholder al fine di attivare corretti processi decisionali per un utilizzo efficace e una tutela mirata del patrimonio a rischio.

Il progetto CASTARRAY (PSR Regione Campania 2014/2020) è uno studio di fattibilità volto a chiarire gli aspetti tecnico-economici relativi a tale trasferimento. L'Azienda pilota ricade nell'areale del Parco Regionale di Roccamonfina-Foce Garigliano, che è candidato come zona d'origine della DOP Castagna di Roccamonfina, in fase di istruttoria ministeriale. Tale DOP, con varietà dal precoce ingresso sul mercato e caratteristiche organolettiche superiori (Tempestiva, Mercogliana e Napoletana), ha buone possibilità di garantire un ritorno economico interessante. Nello stesso areale ricade una notevole concentrazione di biodiversità castanicola con le principali varietà tipiche Paccuta, Lucente, Marzatica, Olefarella e San Pietro. Inoltre, Tempestiva e Paccuta possono fregiarsi del riconoscimento nazionale di Prodotti Agroalimentari Tradizionali (DM 350/99). Il trasferimento delle competenze nella caratterizzazione genetica, può aprire la strada ad ulteriori progetti di miglioramento genetico partecipato, in cui le aziende possano rendersi protagoniste del nuovo sviluppo della castanicoltura campana. Il recupero di redditività del comparto castanico campano garantisce, inoltre, il presidio, la tutela e la corretta gestione di territori montani e rurali con benefici indiretti incalcolabili in termini di prevenzione di incendi boschivi e rischio idrogeologico.

Il know-how che si intende trasferire avrà, inoltre, un prevedibile impatto positivo sulle conoscenze e sulla consapevolezza dei coltivatori, migliorandone la competitività e favorendo sia una maggiore definizione e caratterizzazione dei prodotti tipici e delle loro strategie di marketing, sia l'ingresso in regimi di qualità esistenti, sia l'istituzione di nuovi marchi di tutela.

La disponibilità di dati di sequenza relativi a *C. sativa* è molto scarsa (853 sequenze in NCBI). La specie modello per gli studi genomici nell'ambito del genere è *C. mollissima* (73.726 sequenze in NCBI).

* luigi.demasi@ibbr.cnr.it

Per il monitoraggio del polimorfismo genetico in castagno, esistono due chip a DNA su sequenze codificanti: uno per il monitoraggio di 768 SNP (polimorfismi di singoli nucleotidi) in *C. crenata* (Nishio *et al.* 2018) e uno per il monitoraggio di 1536 SNP in *C. mollissima* (Kubisiak *et al.* 2013). I vetrini sono generalmente trasferibili da una specie all'altra dello stesso genere, ma la riuscita dell'operazione dipende dalla similarità di sequenza tra le due specie. Per vetrini costruiti su sequenze codificanti, le possibilità di successo aumentano notevolmente. Dal punto di vista economico, il costo d'uso per campione della tecnologia microarray è contenuto, ma ciascun vetrino è disegnato per ibridizzare 48 campioni contemporaneamente, per cui non è possibile fare analisi su pochi campioni per volta. Attraverso la tecnologia alternativa KASP (*Kompetitive Allele Specific PCR*), invece, è possibile scalare gli esperimenti. Essa, inoltre, fornisce risultati attendibili anche nell'analisi di DNA deteriorato, estraibile da farine e trasformati.

Caratterizzazione genetica tradizionale e innovativa di cultivar di castagno campane

Nell'ambito di CASTARRAY è stato effettuato uno studio preliminare con marcatori molecolari tradizionali basati sul DNA polimorfico amplificato arbitrariamente (RAPD) mediante reazione a catena della DNA polimerasi (PCR) che hanno consentito di analizzare con successo 20 esemplari di castagno, appar-

tenenti ad otto varietà campane di *C. sativa* e ad un ibrido euro-giapponese (*C. sativa* x *C. crenata*). Per l'analisi del DNA sono stati prelevati campioni di foglie da uno a tre alberi per ciascuna delle nove varietà: Bouche de Bétizac (BdB), Lucente (LCN), Marzatica (MRZ), Mercogliana (MRC), Napoletana (NPL), Olefarella (OLF), Paccuta (PCT), San Pietro (SPT), Tempestiva (TMP). L'analisi RAPD è stata effettuata attraverso ulteriori miglioramenti di protocolli già sviluppati (Galderisi *et al.* 1998, De Masi *et al.* 2014). Dei primer utilizzati, cinque sono stati selezionati per aver evidenziato il maggior livello di polimorfismo del DNA. Gli alleli visibili dopo elettroforesi su gel d'agarosio e corrispondenti ad ampliconi riproducibili, considerata la natura genetica dominante dei marcatori RAPDs, sono stati codificati in formato binario in base alla loro presenza (1) / assenza (0) per ciascun *locus*. L'analisi delle bande RAPD di castagno ha identificato un totale di 60 marcatori o *loci*, il numero rilevato per ciascun campione di DNA di castagno è risultato dipendente dalla varietà e dal primer utilizzato, con una media di 8,6 *loci* per primer. Inoltre, 39 *loci* sono risultati polimorfici (65%) e la loro variazione ha consentito di discriminare con certezza le otto varietà di *C. sativa* tra loro e dall'ibrido euro-giapponese, e di determinare le loro relazioni genetiche. In particolare, una matrice di similarità genetica, basata sul coefficiente di Jaccard, è stata calcolata per tutti i campioni in studio ed è stata usata per costruire un dendrogramma attraverso l'algoritmo

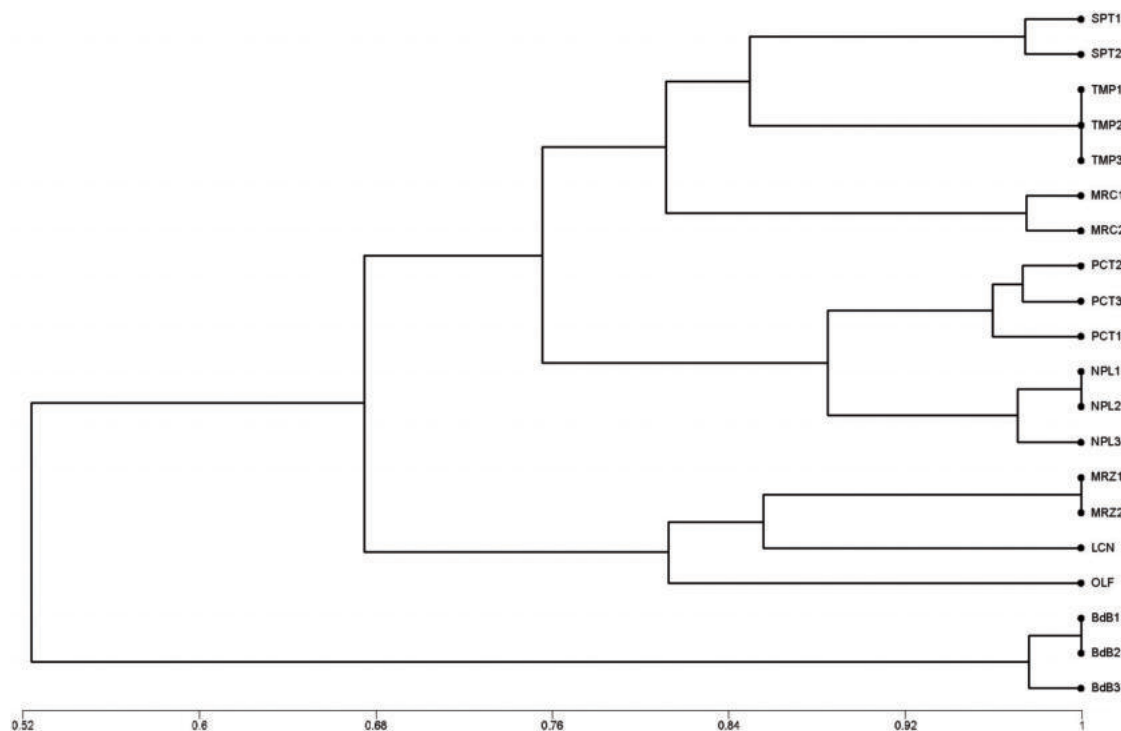


Fig. 1 - Clustering delle varietà di castagno basate sui polimorfismi RAPD.

UPGMA con il software DARwin (Perrier e Jacquemoud-Collet, 2006). La figura 1 rivela quattro cluster principali, corrispondenti ai raggruppamenti A) Mercogliana - San Pietro - Tempestiva, B) Napoletana - Paccuta, C) Lucente - Marzatica - Olefarella, D) Bouche de Bétizac.

L'analisi dei cluster, basata sui polimorfismi genetici osservati, ha confermato la classificazione morfologica tradizionale (fig. 1). Inoltre, poiché sono stati analizzati da uno a tre esemplari per varietà, in alcuni casi sono state osservate differenze tra gli alberi della stessa cv, con la presenza di sub-clustering che riflettono minime differenze genetiche a livello clonale. Questi dati sono in linea con studi precedenti condotti sul castagno confermando la natura delle relazioni a livello intervarietale (De Masi *et al.* 2004, 2014), e sono innovativi nell'evidenziare polimorfismi a livello intravarietale. Sulla base dei risultati ottenuti, i marcatori molecolari tradizionali basati sui RAPD potrebbero essere utilizzati come utile strumento per distinguere le specie del genere *Castanea*, i loro ibridi e le varietà, anche a livello clonale.

Allo scopo di individuare marcatori molecolari economici e facilmente utilizzabili, si è proceduto a valutare la trasferibilità di SNP da *C. crenata* a *C. sativa*. Sono state selezionate le sequenze di 64 SNP da *C. crenata* uniformemente distribuiti sui gruppi di linkage (circa 1 ogni 10 cM) su cui sono stati disegnati primer per amplificare frammenti di circa 150 bp la cui variabilità è stata indagata mediante denaturazione ad alta risoluzione (HRM). Di questi, 57 sono risultati

polimorfici consentendo di dividere i campioni in un numero di cluster variabile da 2 a 6 in base al profilo di denaturazione. La tecnologia HRM consente il rilevamento di SNP nel breve tratto amplificato, ma non può confermarne la posizione. Pertanto, un frammento per ciascuno dei cluster individuati è stato sottoposto a sequenziamento per verificare se il polimorfismo fosse identico a quello individuato in *C. crenata*. I risultati del ri-sequenziamento di 8963 bp provengono da tutti i genotipi inclusi nelle analisi HRM con una copertura media di 3.1x. Nel complesso, viene confermato un livello di similarità in sequenze espresse tra *C. crenata* e *C. sativa* prossimo al 100% e non significativamente diverso da quello osservabile tra cv di *C. sativa*. Il sequenziamento ha evidenziato 9 falsi positivi (frammenti apparentemente polimorfici in HRM ma di identica sequenza) ed 11 SNP direttamente trasferibili da *C. crenata* a *C. sativa* (polimorfici e distintivi in entrambe le specie). Di questi, 8 sembrerebbero però utili soltanto a distinguere la cv Bouche de Bétizac (ibrido *C. crenata* x *C. sativa*) dalle cv locali. Altri 98 SNP non precedentemente descritti sono stati individuati. Un esempio di nuovo SNP individuato è fornito in figura 2, dove ne è rappresentato uno di tipo G/T individuato 6 basi a monte rispetto a quello della sequenza sca02470_29720 (Nishio *et al.* 2018). In base ai dati HRM, i genotipi analizzati sono stati suddivisi in tre cluster corrispondenti alle tre possibili configurazioni alleliche T/T, G/T e G/G.

Nel complesso, i dati indicano un basso livello di trasferibilità dell'uso del vetrino costruito su sequenze

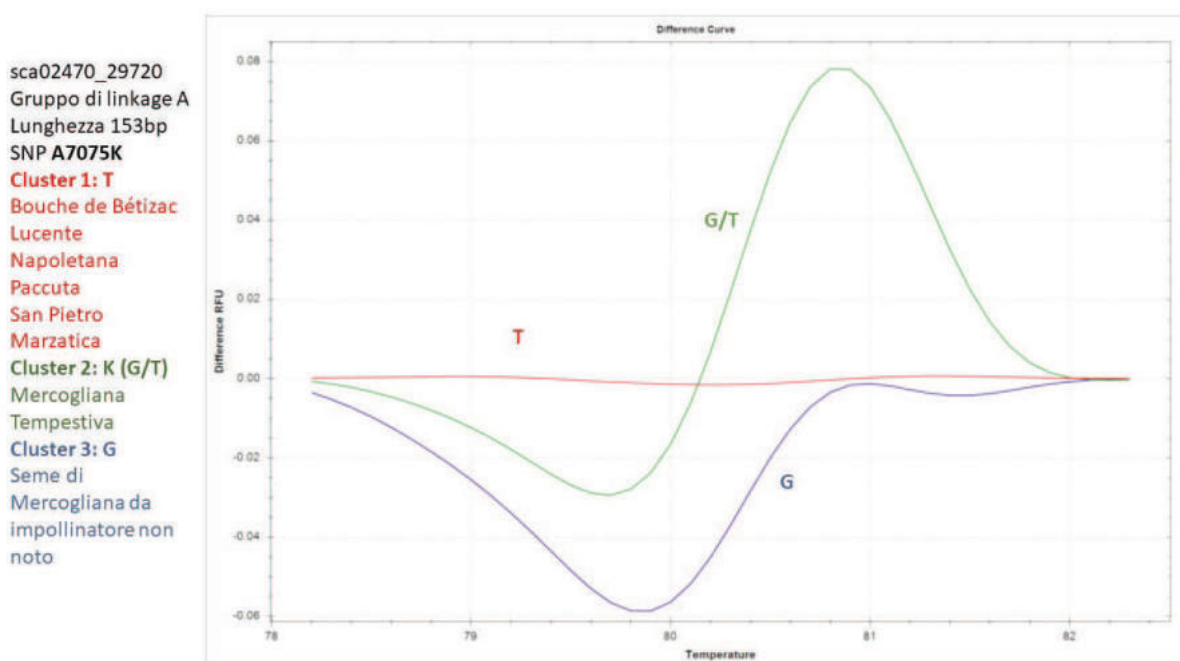


Fig. 2 - Esempio di denaturazione differenziale di ampliconi di DNA di castagno in presenza di uno SNP.

di *C. crenata* per il riconoscimento varietale, in quanto solo 3 dei 64 datapoint esplorati risulterebbero realmente informativi. Tuttavia, a partire da 40 dei 109 SNP individuati, è stato possibile descrivere con esattezza 50 basi a monte e a valle per il disegno di saggi KASP, che sono in fase di validazione per uno screening su 16 dei 20 campioni di partenza e su ulteriori 16 opportunamente individuati. Questi 40 SNP sono distribuiti in 33 frammenti differenti, distribuiti su 11 dei 12 gruppi di linkage individuati nelle mappe di Nishio *et al.* (2018). Detti marcatori, insistendo su sequenze espresse del DNA, sono tendenzialmente molto stabili durante la propagazione clonale e dovrebbero consentire un riconoscimento varietale più agevole in fase di interpretazione del dato, consentendo di individuare un vero e proprio codice identificativo univoco per ciascuna varietà. In particolare, in base ai dati di clusterizzazione HRM finora disponibili, si prevede che l'esecuzione di 10 saggi KASP opportunamente selezionati sia sufficiente a consentire l'attribuzione di materiale sconosciuto ad una delle nove cv in esame. Ulteriori test consentiranno di stimare il numero minimo di saggi necessari a distinguere tra le cv campane, tra quelle italiane e, più in generale, tra le cv europee in commercio, nonché di allestire una banca dati dei profili SNP di ciascuna delle cv note da rendere disponibile per il trasferimento alla filiera.

In conclusione, i marcatori molecolari sono una tecnologia matura per poter essere impiegata dalle

aziende castanicole come supporto alla gestione dei castagneti, dei vivai, dei parchi naturali e da tutti gli stakeholder della filiera castanicola, oltre a poter essere utilizzati per programmi innovativi di miglioramento genetico assistito da marcatori molecolari (MAS - *Marker Assisted Selection*).

Ringraziamenti

Il progetto di innovazione CASTARRAY è stato finanziato dal PSR Campania 2014/2020 Mis. 16.1 - Az. 1 - D.D. n. 123 del 09/08/2018.

Bibliografia

- CALANDRELLI MM, DE MASI L, LARATTA B., 2019. VII Convegno Nazionale sul Castagno, Pergine Valsugana (TN).
- CASTELLOTTI T, GRASSI G 2011. *Agriregionieuropa*, 7: 82.
- DE MASI L, CALANDRELLI MM *et al.*, 2014. Atti del X Convegno Nazionale sulla Biodiversità. Roma, pp. 200-205.
- DE MASI L, CASTALDO D *et al.*, 2004. Monografia SSEA, Reggio Calabria.
- GALDERISI U, CIPOLLARO M *et al.* 1998. *J Hortic Sci Biotechnol* 73: 259.
- KUBISIAK TL, NELSON CD *et al.* 2013. *Tree Genetics & Genomes* 9: 557.
- NISHIO S, TERAKAMI S *et al.* 2018. *The Horticulture Journal* 87: 43.
- PERRIER X, JACQUEMOUD-COLLET JP 2006. DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- VELLA FM, DE MASI L, LARATTA B 2019. VII Convegno Nazionale sul Castagno, Pergine Valsugana (TN).