

## Diversità genetica delle accessioni di castagno raccolte presso due collezioni di germoplasma in Emilia Romagna (Italia)

Sara Alessandri, Luca Dondini  
*Università degli Studi di Bologna*

### Premessa

Nell'ambito del progetto regionale "BIODIVERSAMENTE CASTAGNO" è stato analizzato a livello molecolare tramite marcatori microsatelliti un pannello di 146 accessioni di *Castanea sativa* Mill., conservato in due collezioni di germoplasma situate nell'Appennino tosco-emiliano. La distanza genetica tra le accessioni è stata calcolata attraverso il coefficiente DICE ed è stato costruito un dendrogramma con il metodo di clustering (UPGMA). I risultati hanno evidenziato le relazioni tra le accessioni analizzate (marroni e castagne); è stato prodotto un profilo molecolare molto uniforme per le varietà innestate mentre per le antiche varietà locali è stata osservata una variabilità allelica in specifici loci. Queste informazioni saranno utilizzate per definire e condividere linee guida per la caratterizzazione e la conservazione della biodiversità della castagna.

### Introduzione

*Castanea sativa* Mill. è l'unica specie nativa del suo genere in Europa. L'ampia diffusione e la domesticazione da parte dell'uomo hanno portato alla selezione di genotipi caratterizzati da ampia variabilità genetica, funzionale all'areale di diffusione.

Lo sviluppo socio-economico durante il XX secolo ha causato l'abbandono di molti castagneti da frutto che stanno lentamente diventando bosco. Le varietà locali rappresentano una risorsa genetica importante e la perdita di questi castagneti aumenterebbe l'erosione genetica della specie.

Obiettivo principale del progetto regionale 'BIODIVERSAMENTE CASTAGNO' è volto a caratterizzare la biodiversità della specie sia a livello di germoplasma che a livello ambientale, indagando infatti anche la biodiversità del suolo.

Le analisi con marcatori molecolari (SSR o Simple Sequence Repeat) hanno dimostrato di saper affiancare le analisi pomologiche per la caratterizzazione varietale nelle diverse specie arboree da frutto.

Anche per il castagno sono disponibili marcatori molecolari in grado di analizzare con efficacia la diversità genetica all'interno delle popolazioni e di fornire un utile supporto all'analisi di identificazione varietale e alla determinazione delle relazioni parentali esistenti tra gli ecotipi/varietà presenti sul territorio italiano ed europeo (Marinoni *et al.*, 2003; Buck *et al.*, 2003; Berghè *et al.*, 2013; Quintana *et al.*, 2015, Pereira-Lorenzo *et al.*, 2017).

### Materiali e metodi

I campioni sono stati prelevati principalmente nell'area dell'Appennino tosco-emiliano: in particolare all'interno di tre campi collezione (Parco Didattico della Castagna di Granaglione, Collezione di Zocca e Campo di Pianta Madri (CPM) caratterizzati da varietà di castagne innestate e descritte a livello pomologico. Per ogni varietà sono stati raccolti due campioni indipendenti (A e B) da due diverse piante aventi la stessa denominazione. Successivamente, sono stati eseguiti campionamenti in quattro aziende agricole partner del progetto (La Martina, Antico Bosco, M. Picciardi e Tizzano) per identificare le varietà di castagno e i gruppi di marroni presenti.

Per ogni campione, il DNA genomico è stato estratto da 50 mg di giovani foglie liofilizzate seguendo il protocollo standard CTAB (Maguire *et al.*, 1994). Le accessioni sono state caratterizzate con 16 marcatori microsatelliti (SSR) marcati con quattro fluorocromi (FAM, VIC, PET e NED) al fine di caratterizzare le varietà regionali a rischio di erosione genetica. I primer sono stati analizzati in multiplex secondo Pereira-Lorenzo *et al.* (2017).

Sulla base dei dati ottenuti, è stata effettuata un'analisi cluster con la costruzione del dendrogramma relativa alle distanze genetiche, elaborata utilizzando il metodo UPGMA (metodo Unweighted Pair-Group). La distanza genetica tra le cultivar è stata calcolata utilizzando il coefficiente DICE (Dice1945) con la procedura SimQual NTSYSpc 2.0 (Rohlf 1994) e condotta con un approccio Bayesiano combinato con

il metodo di simulazione Markov Chain Monte Carlo (MCMC).

Per l'analisi di struttura si sono considerati solo i genotipi unici; il dataset è stato allineato con quello disponibile di Pereira-Lorenzo *et al.*, (2017). Il programma STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) è stato utilizzato per valutare la struttura della popolazione, per definire il numero di cluster (pool genici) e per calcolare la frazione del genoma (valore Q) che indica l'appartenenza di ogni individuo al cluster. L'analisi è stata eseguita utilizzando un "modello di miscelazione" sull'intero set di dati, impostando il numero di cluster (k) da 1 a 10. Ciascun ciclo includeva una durata di burn-in di 50.000, a 1.000.000 di repliche MCMC.

## Risultati

I risultati molecolari hanno confermato la capacità dei microsatelliti di analizzare la diversità genetica della specie castagno grazie all'elevato polimorfismo riscontrato nei loci analizzati all'interno della popolazione in esame.

Il dendrogramma elaborato ha permesso di identificare le somiglianze e/o identità tra i campioni in esame. Il confronto tra le accessioni raccolte in doppio all'interno delle collezioni ci è servito per definire riferimenti varietali. Le accessioni si sono suddivise principalmente in due cluster principali: il primo comprendente le varietà di castagne; il secondo racchiude il gruppo dei 'Marroni' che condividono un elevato numero di alleli a conferma di un elevato grado di similarità tra i campioni analizzati.

All'interno del gruppo delle castagne si può notare che le varietà principalmente coltivate nell'Appennino Tosco-emiliano formano cluster solidi: 'Pelosa', 'Piusela', 'Garfagnina', 'Carrarese', 'Svizzera',

'Molana', Pastonese e 'Ceppa' a sostegno di una corretta propagazione nei diversi areali. Questi risultati saranno particolarmente utili a supporto di una necessaria attività vivaistica che ne sostenga la valorizzazione.

I marroni si potrebbero definire come popolazioni con un elevato grado di omogeneità genetica derivata dalla propagazione per innesto. La diffusione di questi cloni in aree geografiche distinte ha permesso l'identificazione di caratteri pomologici distintivi che hanno portato a denominazioni differenti. L'analisi molecolare ha permesso di evidenziare occasionali differenze alleliche, dovute probabilmente a mutazioni accumulate nel corso del tempo che permettono di separare da un gruppo principale alcuni genotipi (es. Drena).

I genotipi unici così ottenuti sono stati allineati con i profili SSR delle accessioni uniche tratte dal lavoro di Pereira-Lorenzo *et al.*, (2017). L'analisi è stata condotta su 216 genotipi totali.

Il dataset è risultato essere suddiviso in due gruppi principali che evidenziano una chiara distinzione tra le cultivar italiane e quelle spagnole (fig. 1).

Il primo cluster (C1 – in verde) è rappresentato dalle varietà di castagne del Nord della Spagna (Galizia e Asturie) e del Sud della Spagna, in particolare della zona dell'Andalusia e dell'Estremadura. All'interno di quest'ultimo si possono osservare anche accessioni originarie del Sud Italia (Calabria e la Campania). Questo fenomeno è chiaramente spiegabile tendendo in considerazione l'importanza della dominazione spagnola nel sud del paese.

Al secondo cluster (C2 – in rosso) appartengono le varietà italiane, in cui sono presenti anche la maggior parte dei Marroni dell'Appennino Tosco-Emiliano. I due cluster principali dovranno essere analizzati in modo indipendente per esplorare l'ipotesi di una sottostruttura all'interno di ciascun gruppo.



Fig 1 - Barplot dell'analisi della struttura sui genotipi diploidi. Il rosso indica il cluster 1 mentre il verde rappresenta il cluster 2.

## Conclusioni

Il progetto regionale ‘BIODIVERSAMENTE CASTAGNO’ sta caratterizzando la biodiversità del castagno tramite marcatori molecolari SSR all’interno dei campi collezione presenti in regione (Parco Didattico della Castagna di Granaglione, Collezione di Zocca e Collezione di Zocca CPM) e successivamente nelle aziende partner (La Martina, Antico Bosco, M. Picciardi e Tizzano) localizzate nell’Appennino Tosco-Emiliano. Il progetto regionale ha il merito di favorire il mantenimento di questa diversità genetica nelle aziende partner allo scopo di limitare il rischio di erosione genetica. Il dataset molecolare generato in questo progetto deve costituire la base per la caratterizzazione della diversità genetica del castagno presente nella Regione Emilia Romagna e sarà implementato a breve con le accessioni campionate nella parcella sperimentale del germoplasma castanicolo “Faggeto” situata nel comune di Brisighella (Ravenna).

## Bibliografia

- BERGHÈ D., GANINO T., DALL’ASTA C., SILVANINI A., CIRLINI M., FABBRI A., 2013. *Identification and characterization of ancient Italian chestnut using nuclear microsatellite markers*. *Scientia Horticulturae* 161:50-57.
- BUCK E.J., HADONOU M., JAMES C.J., BLAKESLEY D., RUSSELL K., 2003. *Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (Castanea sativa Mill.)*. *Molecular Ecology Notes* 3:239-241.
- DICE L.R., 1945. *Measures of the amount of ecologic association between species*. *Ecology* 26:297-302.
- MARINONI D., AKKAK A., BOUNOUS G., EDWARDS K.J., BOTTA R., 2003. *Development and characterization of micro satellite markers in Castanea sativa (Mill.)*. *Molecular Breeding* 11:127-136.
- MAGUIRE T.L., COLLINS G.G., SEDGLEY M., 1994. *A modified CTAB DNA extraction procedure for plants belonging to the family Proteaceae*. *Plant Mol Biol Rep* 12:106-109
- QUINTANA J., LA CONTRERAS A., MERINO I., VINUESA A., OROZCO G., OVALLE F., GOMEZ L., 2015. *Genetic characterization of chestnut (Castanea sativa Mill.) orchards and traditional nut varieties in El Bierzo, a glacial refuge and major cultivation site in northwestern Spain*. *Tree Genetics and Genomes* 11: 826.
- PEREIRA-LORENZO S., RAMOS-CABRER A.M., BARRENECHE T., MATTIONI C., VILLANI F., DÍAZ HERNÁNDEZ M.B., MARTÍN L.M., MARTÍN Á., 2017. *Database of European chestnut cultivars and definition of a core collection using simple sequence repeats*. *Tree Genetics and Genomes* 13:114.
- PRITCHARD J.K., STEPHENS M., DONNELLY P., 2000. *Inference of population structure using multilocus genotype data*. *Genetics* 155:945-959.
- ROHLF F.J., 1994. *NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system (version 1.80)*. State University of New York.