

Il germoplasma di *C. sativa* in Friuli Venezia Giulia: nuovi ritrovamenti e strategie regionali di valorizzazione della filiera

Michele Fabro^{1*}, Rosario Raso¹, Dario Donno^{2,3}, Isidoro Riondato³, Gabriele Loris Beccaro^{2,3}

¹ERSA - Agenzia regionale per lo sviluppo rurale, Gorizia, Italy

²Chestnut R&D Center Piemonte, Chiusa Pesio (CN), Italy

³Department of Agriculture, Forestry and Food Science – DISAFA, University of Torino, Italy

Introduzione

L'interesse per la castanicoltura e per le risorse genetiche localmente ancora presenti sul territorio è in grande crescita nell'ultimo decennio in Italia. Nel corso della storia, nelle aree montane e pedemontane, i castanicoltori hanno selezionato dalle popolazioni di castagno selvatico gli ecotipi che dimostravano maggiore adattabilità all'ambiente e resistenza alle avversità e, allo stesso tempo, producevano semi dalle particolari caratteristiche alimentari.

Questa evoluzione si è verificata anche in Regione Friuli Venezia Giulia, che presenta aree, un tempo frutteti ed oggi boschive, ancora ricche di esemplari di castagno talvolta secolari. Nel corso dei secoli, in particolare nella zona denominata "Valli del Natisone", la popolazione locale ha selezionato, coltivato e valorizzato diverse cultivar di castagno europeo per numerose applicazioni come consumo fresco, alimentazione animale e produzione di legname, contribuendo così attivamente al mantenimento della biodiversità del germoplasma. Dall'inizio del secolo scorso e in particolare dagli anni '50 in poi, le aree montane della Regione Friuli Venezia Giulia, sono stati caratterizzate da alcuni importanti cambiamenti sociali: emigrazione massiva, calo dei tassi di natalità e invecchiamento marcato della popolazione che hanno portato a un progressivo abbandono dell'agricoltura e della zootecnia: il patrimonio varietale locale è stato così dimenticato, a scapito del suo potenziale valore storico-culturale, agronomico, economico o alimentare.

L'Agenzia Regionale per lo Sviluppo Rurale (ERSA) della Regione Friuli Venezia Giulia, insieme al Centro Regionale di Castanicoltura del Piemonte, è impegnata in uno studio per la caratterizzazione e il recupero del germoplasma di *Castanea sativa* presente nella Regione: in particolare, il progetto prevede lo studio genetico, morfologico e nutraceutico-nutrizio-

nale di diverse cultivar di castagno locali, definendo per ogni genotipo un profilo descrittivo.

I risultati preliminari dello studio sono di notevole interesse nell'ottica della valorizzazione di un patrimonio etico, paesaggistico ed alimentare in via di estinzione.

Materiali e metodi

Con una serie di sopralluoghi sono stati individuati, sotto la guida dei referenti dell'ERSA, 58 esemplari di *Castanea sativa* situati nelle province di Pordenone e Udine. Ogni esemplare è stato numerato con un contrassegno metallico di riconoscimento e fotografato, mentre la localizzazione delle singole piante è stata effettuata mediante sistema GPS per ottenere una cartografia dettagliata sulla quale collocare ogni esemplare. Durante i sopralluoghi è stato campionato materiale vegetale dalle singole piante per l'esecuzione delle analisi di laboratorio.

I campioni delle cultivar di *C. sativa* esaminati (tab. 1) sono stati raccolti manualmente, nella tarda primavera degli anni 2017 e 2018.

Con le tecniche di biologia molecolare, è possibile studiare il genotipo di ciascun individuo analizzando particolari zone del DNA chiamate "marcatori molecolari" che consentono d'identificare un individuo come appartenente ad una specifica cultivar, definendone l'impronta genetica. Tra i numerosi marcatori molecolari oggi disponibili, i microsatelliti (o SSR, simple sequence repeats) risultano particolarmente affidabili per la caratterizzazione varietale. I campioni di DNA estratti dalle foglie raccolte sui castagni della Regione secondo il protocollo di Doyle e Doyle (1990), previa amplificazione PCR, sono stati caricati sul gel di separazione, insieme a uno standard di peso molecolare, ed analizzati mediante il software Genescan abbinato al sequenziatore automatico presente presso il Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari.

* michele.fabro@regione.fvg.it

Tab. 1 - Elenco degli esemplari campionati suddivisi per genotipo (in rosso gli esemplari campionati nel 2018)

Pianta	Genotipo	Varietà	Sinonimi	Località	Comune
1	CF1	Marrone di Mezzomonte		Mezzomonte	Polcenigo
3	CF2	Marrone del Landre		Mezzomonte	Polcenigo
4	CF2	Marrone del Landre		Mezzomonte	Polcenigo
6	CF2	Muron	Maron, Moron, Marrone	Stregna	Stregna
31	CF2	Muron	Maron, Moron, Marrone	Iainich	San Leonardo
32	CF2	Muron	Maron, Moron, Marrone	Altana	San Leonardo
41	CF2	Marrone di Vito d'Asio		Castelnovo del Friuli	Castelnovo del Friuli
7	CF3	Čufa	Muronica, Rezijan	Tribil Inferiore	Stregna
19	CF3	Čufa	Muronica, Rezijan	Spignon	Pulfero
30	CF3	Čufa	Muronica, Rezijan	Dughe	Stregna
33	CF3	Čufa	Muronica, Rezijan	Raune	Stregna
46	CF3	Moron		Capovilla	Montenars
8	CF4	Objak	Obiacco	Tribil Inferiore	Stregna
10	CF4	Objak	Obiacco	Raune	Stregna
15	CF4	Objak	Obiacco	San Leonardo	San Leonardo
21	CF4	Kurin		Coceanzi	Pulfero
22	CF4	Purčinjac	Purčinka, Canalutta, Golec, Goleš	Mezzana	San Pietro al Natisone
24	CF4	Muron	Maron, Moron, Marrone	Mezzana	San Pietro al Natisone
29	CF4	Objak	Obiacco	Dughe	Stregna
58	CF4	Objak		Clastra	San Leonardo
9	CF5	Purčinjac	Purčinka, Canalutta, Golec, Goleš	Tribil Inferiore	Stregna
16	CF5	Purčinjac	Purčinka, Canalutta, Golec, Goleš	San Leonardo	San Leonardo
17	CF5	Purčinjac	Purčinka, Canalutta, Golec, Goleš	Spignon	Pulfero
27	CF5	Purčinjac	Purčinka, Canalutta, Golec, Goleš	Costne	Grimacco
13	CF6	Ranac Svančeron		San Leonardo	San Leonardo
23	CF6	Ranac	Grivar	Mezzana	San Pietro al Natisone
28	CF7	Ranac	Grivar	Costne	Grimacco
34	CF7	Ranac	Grivar	Raune	Stregna
53	CF7	Maruja		Tercimonte	Savogna
2	CF8	Castagna di Mezzomonte	corrisponde a genotipo comune di Marrone	Mezzomonte	Polcenigo
5	CF8	Marrone di Vito d'Asio	corrisponde a genotipo comune di Marrone	Vito d'Asio	Vito d'Asio
39	CF8	Castagna di mezzomonte		Polcenigo	Polcenigo
40	CF8	Castagna di mezzomonte		Polcenigo	Polcenigo
44	CF8	-		Vito D'Asio	Vito D'Asio
12	CF 12	Čufa	Muronica, Rezijan	Raune	Stregna
14	CF 14	Marujac		San Leonardo	San Leonardo
49	CF 14	Kobilca		Tercimonte	Savogna
18	CF 18	Bogatac		Spignon	Pulfero
20	CF 20	Kurin		Coceanzi	Pulfero
35	CF 35	Ranac	Grivar	Raune	Stregna
36	CF 36	Kobilčar	Zelenac	Raune	Stregna
37	CF 37	Marujac		Brizza superiore	Savogna
38	CF 38	Rossitta di Montenars		Montenars	Montenars
42	CF 42	-		Vito D'Asio	Vito D'Asio
43	CF 42	-		Vito D'Asio	Vito D'Asio
45	CF 45	Rossitta		Capovilla	Montenars
47	CF 47	Rossitta		Capovilla	Montenars
48	CF 48	Murona		Zampariul	Montenars
50	CF 50	Posniak		Tercimonte	Savogna
51	CF 50	Posniak		Tercimonte	Savogna
52	CF 52	Hriuniak		Tercimonte	Savogna
54	CF 52	Hriuniak		Tercimonte	Savogna
55	CF 55	Čivaz		Tercimonte	Savogna
56	CF 56	Čivaz		Tercimonte	Savogna
57	CF 57	Ranac		Clastra	San Leonardo

I rilievi morfologici sono stati eseguiti sui frutti sulla base di differenti parametri ivi compresi i descrittori UPOV: sul riccio è stata valutata la densità degli aculei e la loro ramificazione; gli aculei sono stati classificati in 4 gruppi in base alla lunghezza: sono stati definiti “corti” gli aculei di lunghezza inferiore ai 7 mm, “medi” quelli con lunghezza compresa fra 7,1 e 14,9 mm, “lunghi” quelli con lunghezza compresa fra 15 e 25 mm e “molto lunghi” quelli più lunghi di 25 mm. Per ogni esemplare sono state contattate le castagne per chilogrammo, al fine di definirne la categoria commerciale. Per quanto riguarda l'esterno del frutto sono stati valutati: dimensioni, forma, pelosità, colore, striature, dimensioni dell'ilo e presenza della torcia. Internamente al frutto sono stati valutati poliembrionalità, penetrazione e intrusioni dell'episperma, percentuale di distacco episperma/ seme, aderenza dell'embrione e colore interno del seme.

Sulla base dei risultati genetici e della disponibilità di materiale, sono stati selezionati i campioni di castagne di 16 esemplari appartenenti a genotipi differenti su cui sono state effettuate analisi cromatografiche (cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a rivelazione UV-Vis a serie di diodi) e spettrofotometriche per valutare e quantificare la presenza di composti ad elevate caratteristiche nutraceutiche e nutrizionali (fingerprint fitochimico) tali da conferire al prodotto un alto valore salutistico oltre che alimentare ed industriale:

- contenuto in polifenoli totali: Folin Ciocalteu assay²;
- capacità antiossidante: FRAP assay (Ferric Reducing Antioxidant Power)³;
- fingerprint fitochimico (acidi fenolici, catechine, flavonoli, tannini, terpeni, vitamine, acidi organici, zuccheri): metodi HPLC-DAD⁴.

I campioni per le analisi chimiche sono stati sottoposti a una selezione visiva, per eliminare le castagne difettose. Dopo la sbucciatura e l'eliminazione dell'episperma, le castagne sono state ridotte in pezzi di circa 5X5 mm ed essiccati in stufa a 30-40°C per 48 ore, sino al raggiungimento del peso costante. Successivamente i campioni sono stati macinati con Moulinex (modello 505; 180 W) e conservati in sacchetti di plastica sigillati ermeticamente, a temperatura ambiente, fino al momento dell'analisi.

I risultati delle analisi chimiche e sensoriali sono stati analizzati mediante SPSS 22.0 Software e sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) per il confronto delle medie con il test di confronto multiplo HSD Tukey (Tukey's Honest Significant Difference), al fine di identificare quali valori medi fossero significativamente differenti fra loro. I risultati delle analisi

nutraceutico-nutrizionali sono stati sottoposti ad analisi statistica multivariata (*Principal Component Analysis*, PCA) per meglio evidenziare eventuali correlazioni tra le diverse cultivar identificate, determinate da affinità nella composizione fitochimica.

Risultati e discussione

Le analisi genetiche hanno permesso di definire il profilo di DNA, per nove loci microsatelliti, degli esemplari identificati (tab. 1). Dai risultati è emerso che alcune piante appartengono allo stesso gruppo genotipico, ma un numero relativamente elevato di piante è rappresentato da individui unici per i quali non è stato possibile trovare un altro esemplare con lo stesso profilo genetico. In totale sono stati delineati 24 genotipi diversi. A parte gli esemplari n. 2 e 5, appartenenti allo stesso genotipo (CF8), corrispondente alla cultivar Marrone (es. Marrone di Chiusa Pesio, Marrone di Marradi), per tutti gli altri genotipi non è stata trovata nessuna corrispondenza all'interno del database del DISAFA, che comprende gran parte delle cultivar italiane. Il gruppo genetico di esemplari omogenei più numeroso comprende gli esemplari 8,10,15, 21, 22, 24, 29 e 58 appartenenti tutti al gruppo genotipico CF4 (denominato Obiaccio). Un altro gruppo di esemplari a genotipo uguale era rappresentato dalle piante 3, 4, 6, 31,32 e 41 facenti parte tutte del gruppo CF2 (denominato Muron) e situate presso le zone di Polcenigo, Stregna e San Leonardo; il profilo genetico dell'esemplare 1 (Marrone di Mezzomonte) presente in questo stesso sito (Polcenigo), invece, è risultato a sé stante.

Dal punto di vista morfologico, la maggior parte dei ricci presenta aculei mediamente fitti, o fitti con presenza di ramificazioni. La lunghezza degli aculei è piuttosto variabile a seconda del gruppo genotipico con una media di 10-15 mm. In particolare, i ricci appartenenti a gruppi genotipici CF1, CF2, CF4, CF6 e CF7 sono quelli con gli aculei più lunghi. Gli esemplari appartenenti ai gruppi genotipici CF5 e CF7 presentano il numero di castagne per kg maggiore, rispettivamente 204 e 210. Gli esemplari 1 (Marrone di Mezzomonte), 3 (Marrone del Landre), 4 (Marrone del Landre), 5 (Marrone di Vito d'Asio) e 6 (Muron) sono quelli con il minore valore (media di 90 frutti per kg). La maggior parte dei frutti è di dimensione piccola o molto piccola con un forma di tipo ovoidale allargata o globosa con pelosità mediamente presente: solo le castagne appartenenti agli esemplari 22 (Purčinjac) e 29 (Objak) sono completamente glabre. Il colore dei frutti varia dalle tonalità più scure di marrone (ad esempio, esemplari del gruppo genotipi-

co 2) fino a quelle più chiare (genotipi CF1, CF5, CF7, CF8) con presenza di striature quasi sempre in rilievo come già rilevato in studi simili ⁵. Le castagne degli esemplari 13 (Ranac Svančeron), 15 (Objak), 24 (Muron) e 36 (Kobilčar) sono di colore marrone rossastro. La torcia è presente, in media, nel 75% delle castagne considerate. A parte le castagne degli esemplari 16 (Purčinjac) e 33 (Čufa), in tutti gli altri casi i frutti sono risultati monoembrionali con una elevata penetrazione dell'episperma. Il distacco dell'episperma dal seme è stato valutato sia su campione fresco sia su campione essiccato. Il colore predominante è il bianco, ma in alcuni casi le castagne erano di colore crema (esemplari 8 - Objak, 22 - Purčinjac, 24 - Muron, 28 - Ranac, 36 - Kobilčar e 38 - Rossitta di Montenars).

Le classi di composti antiossidanti (fig. 1) più presenti sono gli acidi fenolici (espressi come acidi cinnamici e acidi benzoici) e i tannini per una percentuale complessiva di polifenoli pari al 20-30% del totale dei composti bioattivi (con un massimo del 50-60% nel caso dei gruppi genotipici 6, 20 e 36). La più bassa percentuale di polifenoli è stata riscontrata nei gruppi CF2, CF3, CF7 e CF38 (5-10%). Di notevole interesse è risultato anche il contenuto in vitamina C che varia da circa 7 mg/100 g di prodotto secco (gruppo 36) fino a 20-23 mg/100 g di prodotto secco (gruppi 8 e 12) similmente ad altri studi ⁶. Questi dati hanno avuto importanti conferme dalla determinazione dell'attività antiossidante (tab. 2): le castagne ana-

lizzate presentano buoni valori soprattutto in relazione ai gruppi genotipici CF6 e CF20 (circa 20-25 mmol di Fe²⁺ per kg di prodotto secco).

Di interesse è anche la presenza di una buona percentuale di monoterpeni (in media 30-40% del totale), in particolare limonene e sabinene, noti come composti dall'elevata attività anti infiammatoria.

Dal punto di vista nutrizionale, le castagne dei diversi gruppi presentano un valore medio-basso di acidi organici (in media 700-900 mg/100 g di prodotto secco) e un elevato contenuto in zuccheri (definito come somma dei valori di fruttosio, glucosio e saccarosio) pari a circa 20 g/100 g di prodotto secco. In particolare, i genotipi CF4, CF7 e CF20 presentano il valore di zuccheri totale più alto (22-23 mg/100 g di prodotto secco).

A partire dalle 11 variabili iniziali (polifenoli totali, attività antiossidante, contenuto delle 9 classi di composti) si sono ottenute 4 componenti principali (PC) che rappresentano più del 70% della varianza totale del sistema. Si sono evidenziati 5 gruppi principali al cui interno sono distribuiti gli esemplari dei gruppi identificati dalle analisi genetiche (fig. 2).

Il gruppo più ampio comprende i gruppi genotipici CF1, CF6, CF14, CF18, CF20, CF36 e CF37, mentre gli altri gruppi sono limitati da 2-3 genotipi fino al caso limite dell'ultimo gruppo comprendente solo il genotipo CF12. E' interessante notare, quindi, come gruppi di cultivar geneticamente diverse abbiano caratteristiche nutrizionali e nutraceutiche simili.

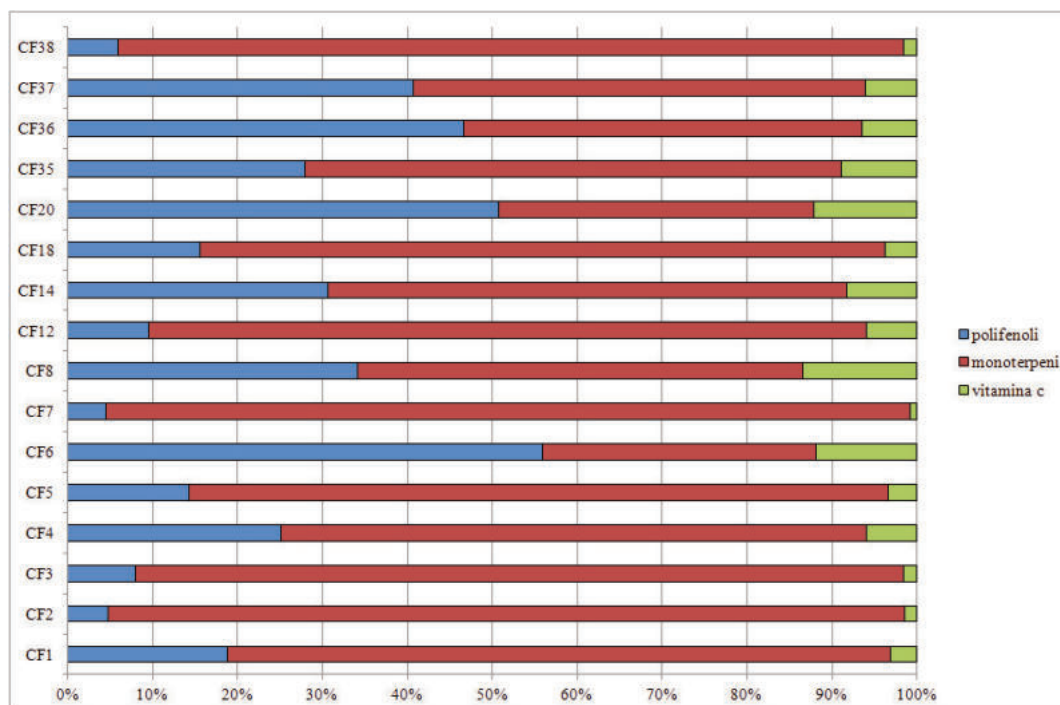


Fig. 1 - Profilo fitochimico dei genotipi analizzati espresso come percentuale di composizione (classi di composti bioattivi).

Tab. 2 - Contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante dei campioni analizzati.

ID	Genotipo	Total Polyphenolic Content m _{GAE} /100 g _{DW}		Antioxidant activity mmol Fe ²⁺ /kg _{DW}	
		mean value	SD	mean value	SD
1	CF1	83,97	0,12	14,93	0,34
6	CF2	95,30	0,88	19,17	0,75
30	CF3	56,05	0,86	8,55	0,90
22	CF4	45,84	0,90	8,46	0,63
17	CF5	51,99	0,02	10,64	0,40
23	CF6	59,65	1,12	11,79	0,90
34	CF7	60,33	0,81	9,88	0,47
2	CF8	83,71	0,63	13,42	0,85
12	CF12	65,39	0,78	12,03	0,74
14	CF14	59,71	0,19	10,54	0,49
18	CF18	82,38	0,64	13,35	1,12
20	CF20	81,32	0,67	26,99	1,26
35	CF35	62,09	0,96	13,38	0,99
36	CF36	81,43	0,78	15,71	0,95
37	CF37	82,60	0,68	15,60	0,90
38	CF38	59,89	0,69	12,05	0,89

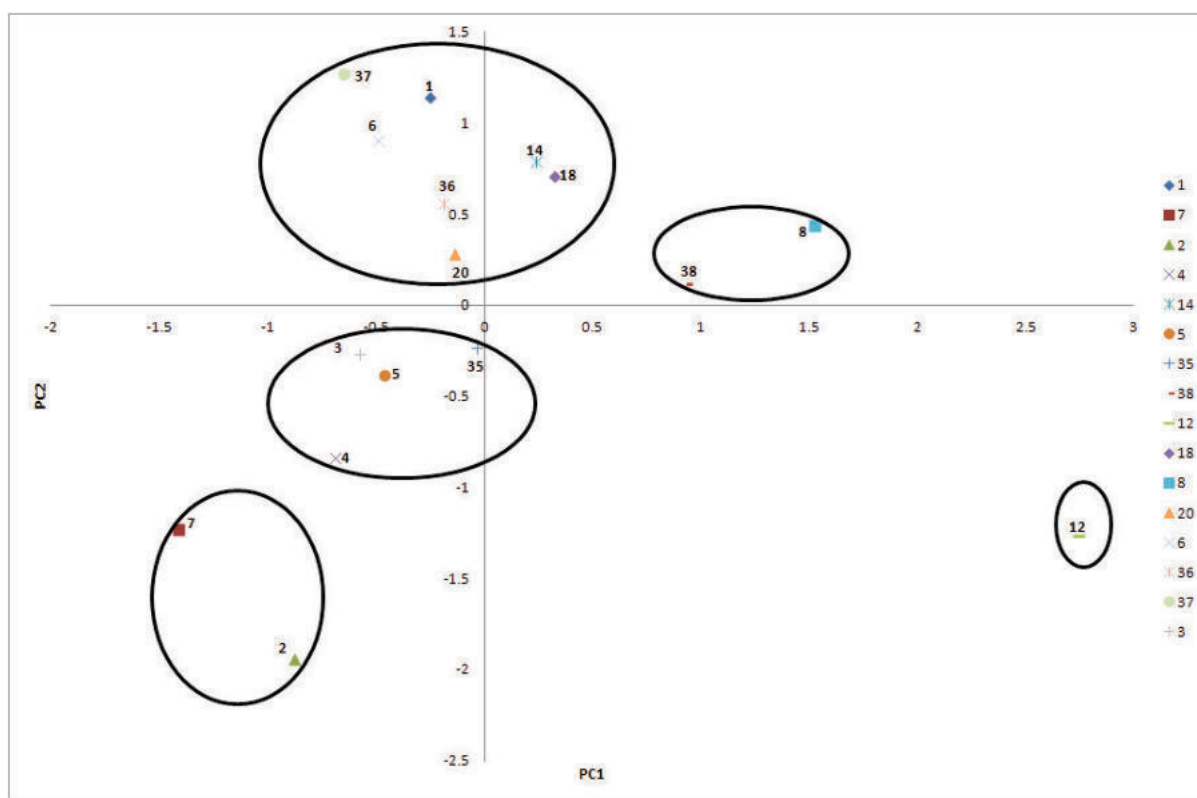


Fig. 2 - PCA (score plot) dei genotipi analizzati.

Conclusioni

I rilievi eseguiti hanno permesso di descrivere approfonditamente una porzione di biodiversità castanicola della Regione Friuli Venezia Giulia e comprendere che nella Regione sono ancora presenti esemplari

appartenenti a 24 presunte cultivar, le cui piante madri sono state identificate geneticamente e georeferenziate. Operazioni di valorizzazione e tutela di questa biodiversità potrebbero contribuire a indurre una nuova attenzione per questo interessante patrimonio ambientale e storico-culturale.

Queste cultivar presentano discrete caratteristiche nutraceutiche e nutrizionali, ma tratti morfologici non sempre di pregio da un punto di vista merceologico. Per le cultivar non idonee al consumo fresco (difficoltà di distacco dell'episperma, intrusioni, poliembrionia) si potrebbe quindi ipotizzare la valorizzazione del prodotto trasformato. CF4 (varie omonimie), CF5 (Purčinjac) e CF7 (Ranac) presentano un buon contenuto in zuccheri, che le renderebbe interessanti per la produzione di farine. La bassa pelabilità (che può tuttavia essere dovuta in parte anche alle condizioni agronomiche) ne ostacola però tale utilizzazione. CF12 (Čufa) presenta un contenuto interessante di vitamina C.

I risultati preliminari di questo studio mostrano come alcune cultivar di *C. sativa* in Friuli Venezia Giulia possano essere commercialmente competitive,

anche attraverso un'efficace valorizzazione dei servizi ecosistemici derivanti dall'uso sostenibile di queste risorse naturali. La cultivar Muron, in particolare, sembra offrire caratteristiche interessanti a conferma di un antico glorioso passato.

Bibliografia

- DOYLE J. J., DOYLE J. L., 1990. *Focus* 1990, 12, 39.
- SLINKARD K., SINGLETON V. L., 1977. *American Journal of Enology and Viticulture* 1977, 28, 49.
- BENZIE I.F., STRAIN J.J., *Methods in Enzymology* 1999, 299, 15.
- DONNO D., MELLANO M., HASSANI S., DE BIAGGI M., RIONDATO I., GAMBA G., GIACOMA C., BECCARO G., 2018. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2018, 23, 2707.
- MELLANO M.G., BECCARO G.L., DONNO D., TORELLO D., BOCCACCI P., CANTERINO, S., CERUTTI A.K., BOUNOUS, G., 2012. *Genet Resour Crop Evol* 2012, 59, 1727.
- DE BIAGGI M., RAPALINO S., DONNO D., MELLANO M.G., BECCARO G.L., 2018. In *VI International Chestnut Symposium 1220* 2018, p 215.