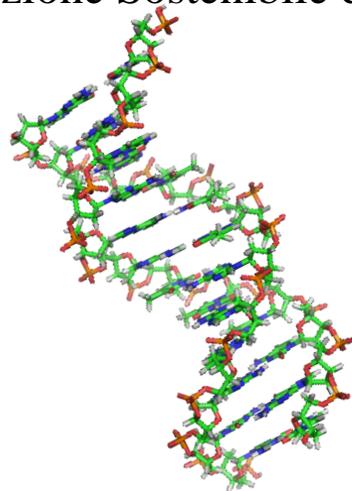


INDIVIDUAZIONE DI GENOTIPI DI CASTAGNO RESISTENTI/TOLLERANTI AL CINIPIDE IN REGIONE CAMPANIA: CARATTERIZZAZIONE BIO-AGRONOMICA E MOLECOLARE

Angelina Nunziata¹⁾, Francesco Nugnes²⁾, Pietro Rega¹⁾, Elvira Ferrara¹⁾, Anna Magri¹⁾ Milena Petriccione¹⁾

- 1) CREA - Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura, Agrumicoltura, Caserta, Italia
- 2) Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP) – CNR, Portici;



*VIII Convegno Nazionale del Castagno
14, 15 e 16 settembre 2022
Portici – Napoli*

INTRODUZIONE

Ad oggi, una delle problematiche fitosanitarie che ha destato maggiori preoccupazioni è causata dalla vespa asiatica *Dryocosmus kuriphilus Yasumatsu*, che viene considerato, a livello mondiale, l'insetto più nocivo per il castagno, in quanto provoca veloce deperimento, arresto della crescita vegetativa e riduzione della fruttificazione.

Sin dal 1959 sono state descritte fonti di resistenza in *C. crenata*, alla base della costituzione di cultivar come 'Tanzawa', 'Tsukuba', and 'Ishizuchi'. Le sole fonti di resistenza in *C. sativa* descritte in letteratura sono le due cultivar 'Pugnenga' and 'Savoye' (Sartor et al 2015) ed un ecotipo rosso salernitano (Nugnes et al. 2018)



SCOPO DEL LAVORO



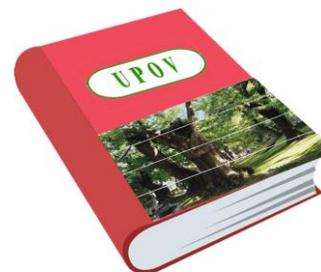
Lo scopo del lavoro è stato di recuperare e caratterizzare genotipi di *C. sativa* resistenti al cinipide da un punto di vista bio-agronomico, attraverso la predisposizione e compilazione di schede conoscitive utilizzando i descrittori agronomici e morfologici riconosciuti a livello internazionale (UPOV), e molecolare, mediante marcatori KASP.



MATERIALI E METODI

Al fine di caratterizzare i 68 differenti ecotipi resistenti al cinipide presenti in Campania, sono stati effettuati rilievi morfo-biometrici sulle foglie e rilievi carpologici sui frutti, il tutto correlato da materiale fotografico e analisi molecolari attraverso tecniche di PCR.

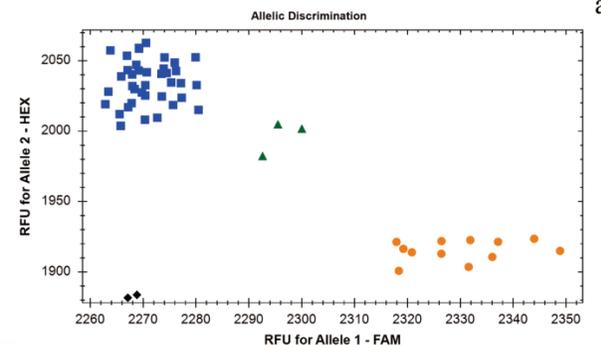
CARATTERIZZAZIONE BIO-AGRONOMICA



Di tutti gli ecotipi sono state campionate tutte le fasi fenologiche per la compilazione delle schede UPOV. Inoltre, per la caratterizzazione bio-agronomica, sono state effettuate misurate le foglie, mentre sulle castagne sono stati effettuati i rilievi carpologici, quali altezza, larghezza e spessore del frutto, spessore della buccia, lunghezza della torcia, altezza e larghezza dell'ilo e peso del frutto, ed è stato calcolato il numero di frutti per kg. Sui 14 ecotipi con un numero di frutti inferiori a 70 frutti/kg è stata valutata anche l'attitudine del frutto alla pelatura, molto importante per la trasformazione industriale.

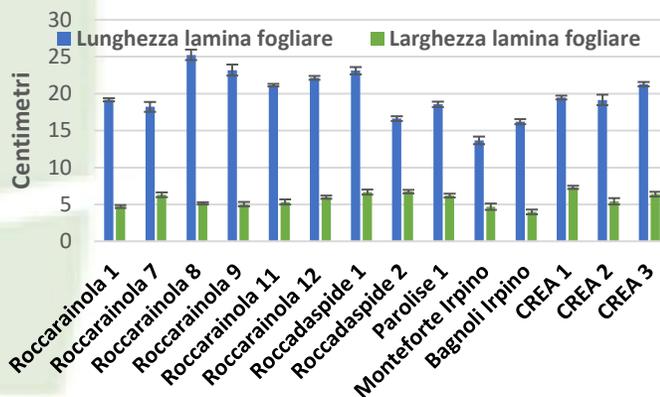
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

I campioni di foglie sono stati polverizzati in azoto liquido e sottoposti ad estrazione del DNA genomico mediante DNAsy Plant Mini Kit (Qiagen). Il DNA è stato quantizzato mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm e sottoposto ad analisi molecolari. La stima della diversità genetica è stata effettuata utilizzando un particolare tipo di sonde fluorescenti (FRET), alla base della una tecnica PCR allele-specifica di tipo competitivo (Kompetitive allele specific PCR - KASP). Le sonde utilizzate sono in grado di caratterizzare la conformazione allelica di loci contenenti polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) uniformemente distribuiti sull'intero genoma.



RISULTATI DELLA CARATTERIZZAZIONE BIO-AGRONOMICA

I rilievi morfometrici e carpologici hanno consentito di evidenziare una buona diversità fenotipica tra i vari ecotipi. Tra gli ecotipi agronomicamente interessanti alcuni provengono dalla Foresta Demaniale di Roccarainola, i migliori per quanto riguarda la grandezza del frutto sono: R 11, 8, 7, 1, 9 e 12 anche se nel 2022 gli ecotipi R9, 11 e 12 hanno mostrato un discreto attacco da cinipide; molto interessante, dal punto di vista bioagronomico, anche la pezzatura degli ecotipi di Monteforte, Bagnoli Irpino, Crea 2, Crea 3 e Roccadaspide 1 e 2.



Sono stati effettuati rilievi sulla pelabilità del frutto, il genotipo Roccarainola 9 mostra la più bassa pelabilità (79%) a differenza dei genotipi Bagnoli Irpino, Monteforte I., Parolise 1 e Roccadaspide 1 che mostrano pelabilità del 100%.



CONCLUSIONI

Gli ecotipi resistenti/tolleranti al cinipide, con una buona e costante produttività, buona pezzatura del frutto ed elevati standard qualitativi potrebbero essere interessanti per il rilancio della castanicoltura da frutto in Campania. Nel nostro studio rispetto ai 14 ecotipi resistenti/tolleranti quelli che risultano particolarmente validi da poter essere innestati per l'allestimento di un campo sperimentale sono Monteforte e Bagnoli Irpino, Crea 2, Crea 3 e Roccadaspide 1 e 2, tutti geneticamente diversi tra loro e non ascrivibili a cultivar locali.

RISULTATI DELLA CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

Sample	A5096	A9081	B0042	B2082	C1083	G0115	G4120	K0049
R 12	A	A	T	G	C		T	C
SM	A	A	T	R	Y	R	T	Y
R 30	A	A	Y	G	Y		C	C
RD2	A	W	C	R	C	R	T	Y
M2	A	W	T	R	Y	G	Y	Y
R 14	A	W	Y	G	Y	G	T	C
BI	A	W	Y	G	Y	R	T	C
C2	C	A	T	G	C	R	Y	Y
R 6	C	A	Y	G	C	G	T	Y
R 1	C	A	Y	R	Y	G	Y	C
MF	C	W	Y	G	Y	G	T	C
R 7	C	W	Y	G	Y	G	T	C
R 13	C	W	Y	G	Y	G	T	C
R 43	C	W	Y	G	Y	G	T	C
R 11	C	W	Y	G	Y	G	T	C
R 9	C	W	Y	G	Y	G	Y	C
MV	M	A	Y	G	C	G	Y	Y
V	M	A	Y	G	C		Y	C
R 8	M	A	Y	G	Y	G	C	C
P2	M	A	Y	G	Y	G	Y	Y
P3	M	A	Y	G	Y	G	Y	Y
RD3	M	W	Y	G	Y	G	T	C

Tra i 37 SNPs utili per la discriminazione varietale riportati nel lavoro di Nunziata e collaboratori (2020) sono stati scelti, in maniera randomizzata, 16 assay. Dallo screening dei primi otto primer KASP è stato possibile definire una notevole diversità tra molti degli ecotipi considerati, mentre non sono state riscontrate differenze tra gli ecotipi 7, 9, 11, 13 e 43 di Roccarainola, 2 e 3 di Parolise e il campione prelevato a Monteforte.

Sample	C0114	D3098	E0104	F3045	H0106	J0109	K1126	L1117
MF	T	G	C	G	W	A	Y	W
R 7	T	G	C	G	W	A	Y	W
R 13	T	G	C	G	W	A	Y	W
R 43	T	G	C	G	W	A	Y	W
R 11	T	T	T	G	W	A	Y	W
R 9	T	G	C	R	W	A	T	A
P 2	T	G	C	G	W	A	T	W
P 3	T	G	C	G	W	A	T	W

Sfruttando la scalabilità d'uso della tecnica KASP, per i campioni che risultavano avere la stessa composizione genotipica sono state effettuate altre KASP-PCR con ulteriori otto primer. Dalle analisi si evince che tra l'ecotipo di Monteforte e gli ecotipi 7, 13 e 43 di Roccarainola non esistono differenze genotipiche mentre si differenziano da loro gli ecotipi 9 e 11. Gli ecotipi 2 e 3 di Parolise risultano essere identici.

BIBLIOGRAFIA

- Mellano et al. Castanea spp. biodiversity conservation: collection and characterization of the genetic diversity of an endangered species. *Genet Resour Crop Evol* 59, 1727–1741 (2012).
- Nunziata et al. Single Nucleotide Polymorphisms as Practical Molecular Tools to Support European Chestnut Agrobiodiversity Management. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 4805.
- Nugnes et al. Resistance of a Local Ecotype of *Castanea sativa* to *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae) in Southern Italy. *Forests* 2018, 9, 94.
- Sartor et al. Impact of the Asian wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu) on cultivated chestnut: Yield loss and cultivar susceptibility. *Sci. Hortic.* 2015, 197:454–460.