

Ottimizzazione di un protocollo di tracciabilità genetica per la salvaguardia delle produzioni di castagne

Daniela Torello Marinoni, Vera Pavese, Paola Ruffa,
Alberto Acquadro, Lorenzo Barchi, Lorenzo Antonio Marino, Nadia
Valentini, Roberto Botta

Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari

VIII Convegno nazionale del castagno 14-16 Settembre 2022 – Portici (NA)

IL CASTAGNO IN ITALIA

La produzione mondiale di castagne si concentra in due grandi macroaree, l'Asia e l'Europa, che rappresentano rispettivamente l'82% e il 14% della produzione mondiale (Faostat, 2020)

L'Italia figura oggi come il principale importatore di castagne anche se tradizionalmente la sua posizione sui mercati internazionali è stata di esportatore, prima dell'emergenza del cinipide.



La comparsa sui mercati di castagne di ibridi eurogiapponesi o di *C. mollissima* importate da Paesi terzi richiede una **politica che tuteli il consumatore ed il produttore** attraverso norme chiare e misure tecniche adeguate



Il consumatore medio di solito non distingue una varietà dall'altra e può capitare che acquisti castagne poco soddisfacenti.



TRACCIABILITA' e RINTRACCIABILITA'

In questo contesto, la tracciabilità e la rintracciabilità delle produzioni nazionali sono aspetti fondamentali per garantire il legame con il territorio e l'identità della castagna italiana.

Tracciabilità



Origine



Frutto



Lavorazioni industriali



Prodotti finiti

Obiettivo del piano nazionale del settore castanicolo (2022-2027)!!!

Rintracciabilità

OBIETTIVI



L'individuazione di marcatori molecolari da utilizzare per la caratterizzazione varietale e l'identificazione delle specie potrebbe rappresentare una garanzia per i controlli a livello vivaistico e sui mercati, rendendo possibile la **tracciabilità di filiera**

“VALTIFRU:4.0 Valorizzazione delle filiere di frutta a guscio e fresca trasformata ad alto valore aggiunto”

OR1 : Materiale vegetale

Gli scopi sono: la ricerca di cultivar con caratteristiche idonee alle esigenze del mercato, la caratterizzazione delle varietà locali di maggior interesse e la messa a punto di tecnologie innovative per la gestione e l'ottimizzazione della tracciabilità di filiera, intesa come capacità di individuare e seguire l'identità di varietà locali, e certificare la rispondenza di quanto venduto con quanto dichiarato, sia al consumatore sia alle industrie di trasformazione, consentendo di identificare eventuali frodi.

L'obiettivo di questo lavoro ha riguardato la messa a punto di un metodo di tracciabilità basato sull'analisi del DNA, al fine di consentire l'identificazione delle specie e delle cultivar tipiche, dal castagneto fino al prodotto confezionato, con particolare riferimento a varietà del Sud Italia

FASI DEL LAVORO



- ottimizzazione dei protocolli di estrazione di acidi nucleici da diverse matrici;
- utilizzazione di marcatori molecolari microsatelliti per definire i profili genetici tipici delle castagne italiane e valutazione della loro efficienza nel riconoscimento della cultivar in alimenti trasformati;
- identificazione di marcatori molecolari SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e INDEL mediante tecniche di *Next Generation Sequencing* (NGS), attraverso il ri-sequenziamento di cultivar del Nord e Sud Italia.

SSR (Simple Sequence Repeats)

**SNP (Single Nucleotide Polymorphism)
e INDEL (INsertion/DELetion)**



- Foglie
- Semi
- Episperma
- Farina

Il materiale del SUD ITALIA è stato gentilmente fornito dall'ARSAC:
Azienda Regionale per lo Sviluppo dell'Agricoltura Calabrese



ANALISI SSR

ESTRAZIONE DNA

Doyle & Doyle protocol (1987) per matrici vegetali e alimentari



PCR a 9 loci SSR

CsCAT₁, CsCAT₃, CsCAT₆, CsCAT₈, CsCAT₁₄,
CsCAT₁₆, CsCAT₁₇, CsCAT₄₁, QpZAG₁₁₀



ELETTROFORESI CAPILLARE

3130 Genetic Analyzer capillary sequencer (Applied Biosystems)

Dati analizzati mediante il software Gene Mapper 4.0

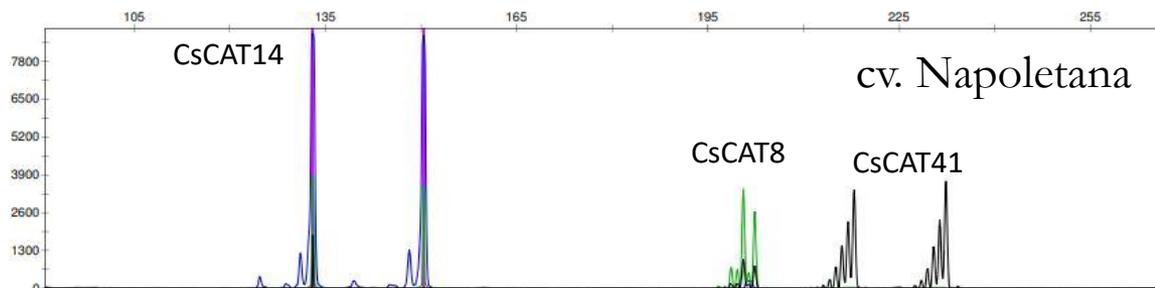
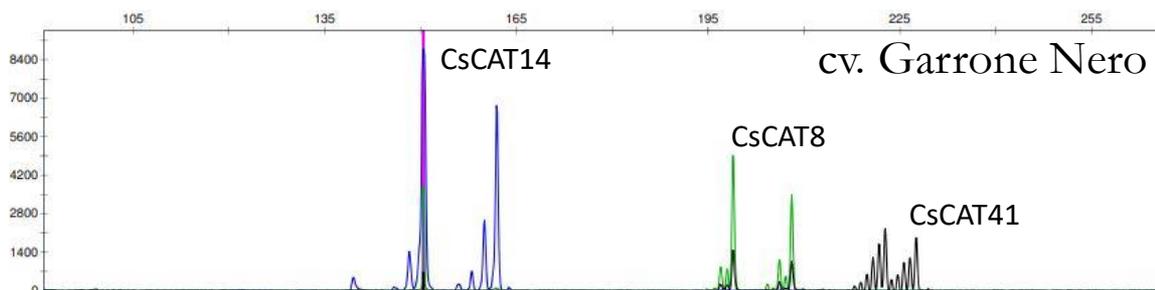


ANALISI SSR - RISULTATI

Buoni profili SSR per **FOGLIE**



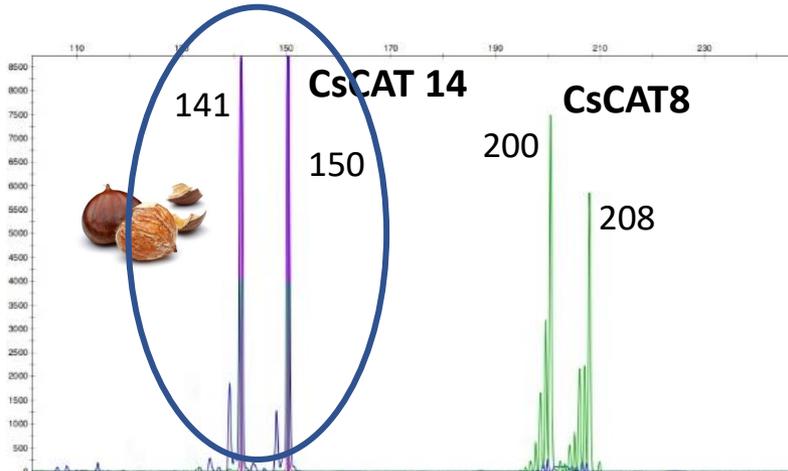
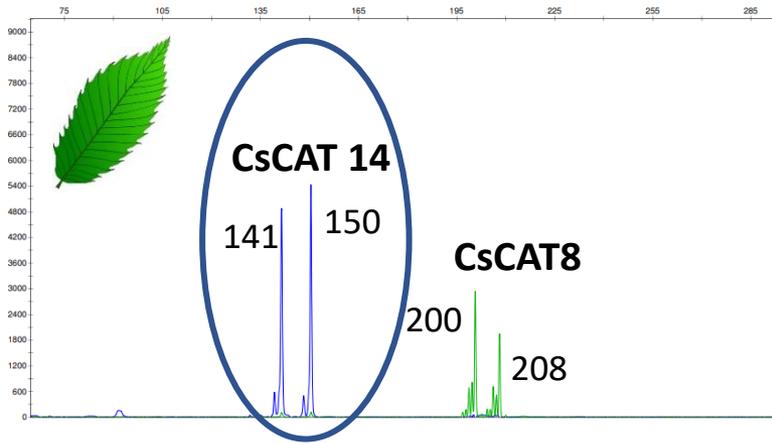
Corrispondenza con la cultivar di appartenenza per queste matrici



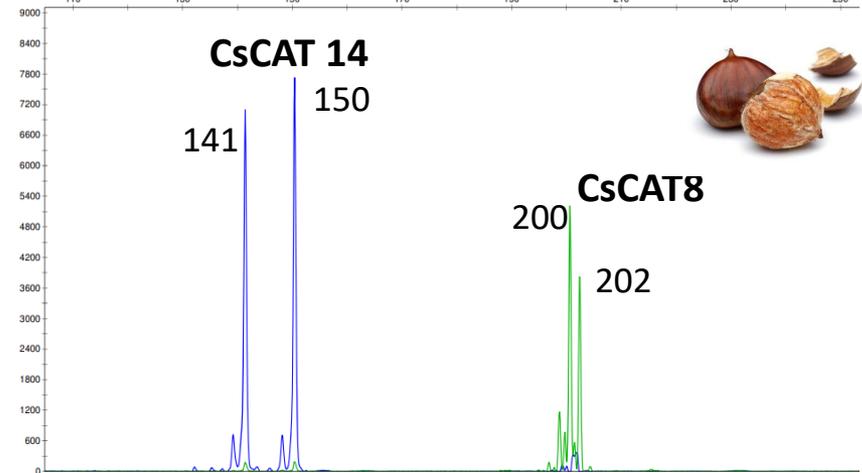
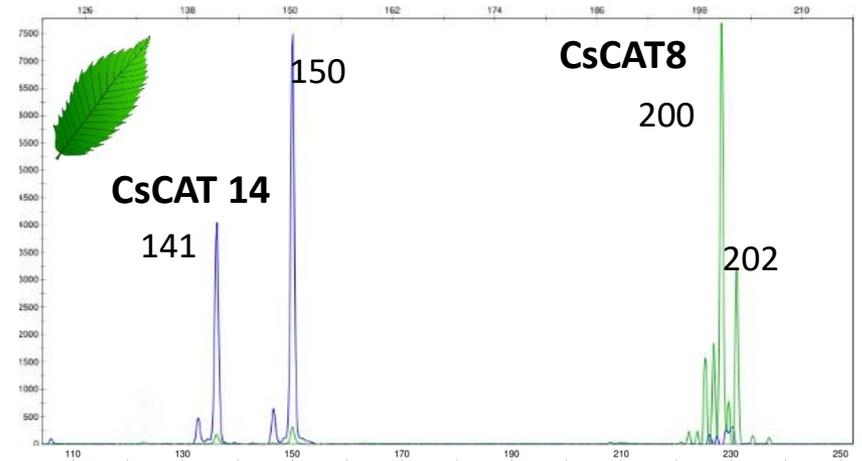
Buoni profili SSR per EPISPERMA



Corrispondenza con la cultivar di appartenenza per queste matrici



Cultivar: Riggiola



Cultivar: Nserta

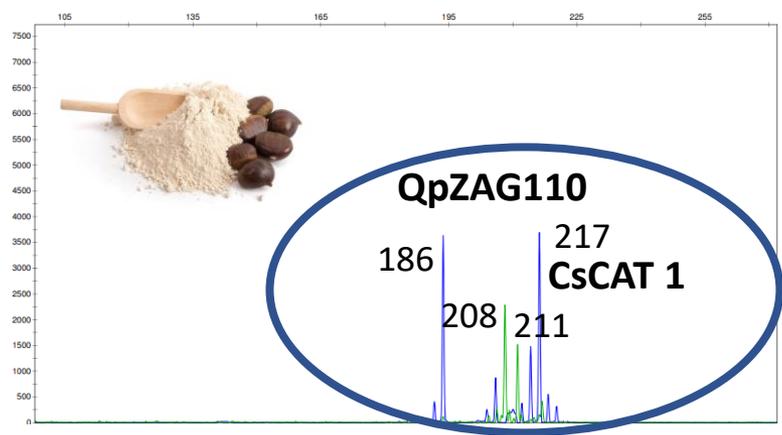
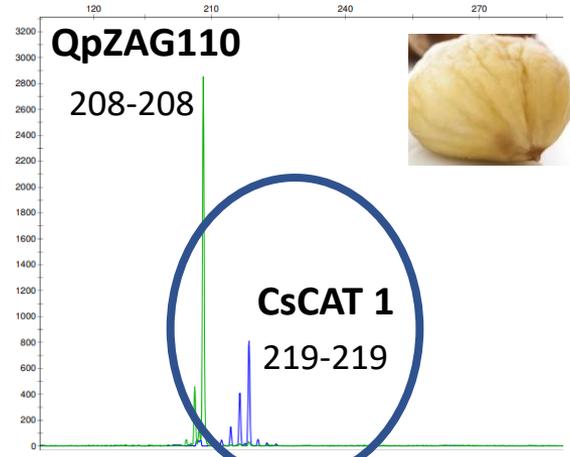
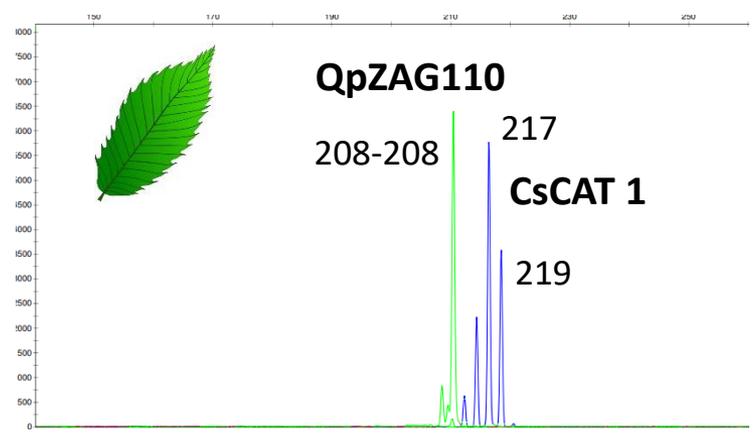
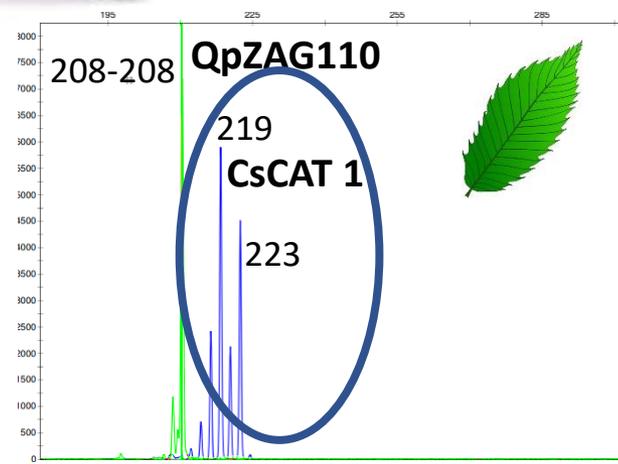
L'unico tessuto materno del seme è l'episperma, la sottile pellicola che circonda l'embrione, originato dai tegumenti dell'ovulo.



Buoni profili SSR per **SEME** e **FARINA**



Ma difficoltà per l'identificazione della cultivar!! la presenza del DNA paterno dovuto all'impollinatore non consente l'identificazione sicura della cultivar

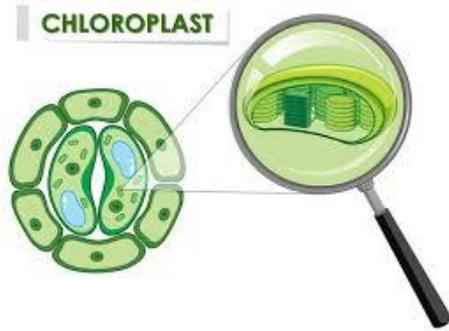


Cultivar: Nserta

Cultivar: Riggiola



Come risultato dell'impollinazione incrociata, il seme contiene sia il DNA materno che paterno, e questo ultimo interferisce nell'identificazione della cultivar materna mediante marcatori molecolari microsatelliti.



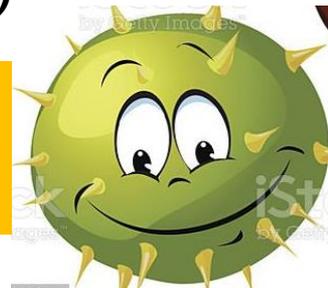
ANALISI SNP/INDEL

PERCHÉ IL GENOMA CLOROPLASTICO?

- eredità materna!!
- elevato numero di copie all'interno di una cellula (40-50 cloroplasti)

- Risequenziamenti 20X di cultivar di *Castanea sativa* e in particolare interesse per il Sud Italia
- Utilizzo del genoma cloroplastico di *C. mollissima* per identificare a livello bioinformatico SNP e/o INDEL in grado di discriminare le specie
- Conferma degli SNP e/o INDEL mediante sequenziamento “Sanger”
- Validazione degli SNP e/o INDEL con **HRM** (*High Resolution Melting*)

- **4 SNP identificati fissati in tutti i campioni di *Castanea sativa* rispetto a *Castanea mollissima***

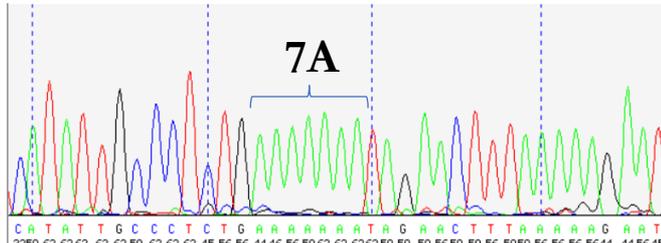


SNP 1a

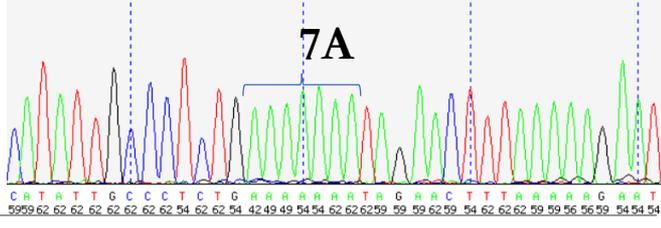
<i>C. sativa</i>	1. Mamma SNP1	TGATATAACATAAATTTTCATATTGCCCTCTGAAAAAAAAA - TAGAAC TTTAAAAA GAATTA TTTTGATTCAACCTTCTC
<i>C. sativa</i>	2. Garrone SNP1	TGATATAACATAAATTTTCATATTGCCCTCTGAAAAAAAAA - TAGAAC TTTAAAAA GAATTA TTTTGATTCAACCTTCTC
<i>C. mollissima</i>	3. D1 SNP1	TGATATAACATAAATTTTCATATTGCCCTCTGAAAAAAAAA TAGAAC TTTAAAAA GAATTA TTTTGATTCAACCTTCTC
<i>C. mollissima</i>	4. D5 SNP	TGATATAACATAAATTTTCATATTGCCCTCTGAAAAAAAAA TAGAAC TTTAAAAA GAATTA TTTTGATTCAACCTTCTC



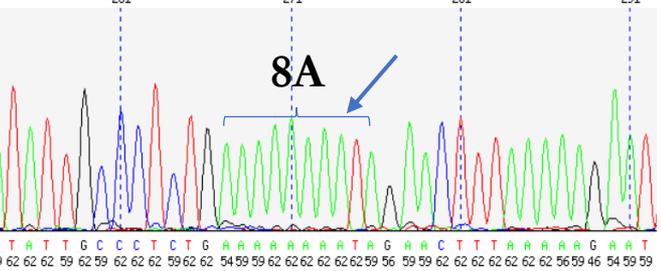
Delezione di 1 A in *C. sativa* rispetto a *C. mollissima*



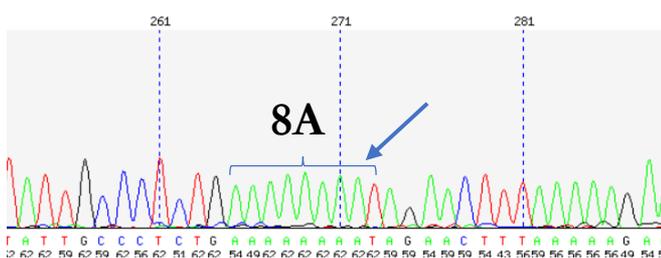
C. sativa
(Sud Italia)



C. sativa
(Nord-Italia)



C. mollissima



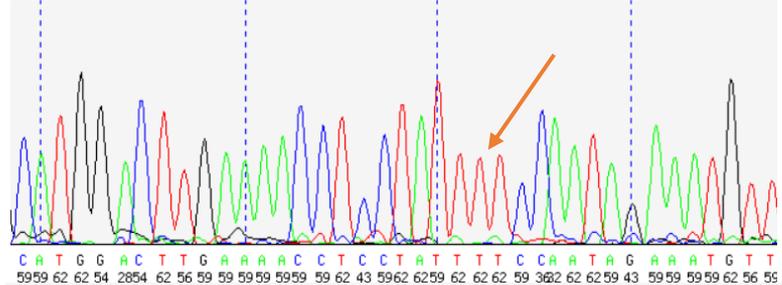
C. mollissima

SNP 1b

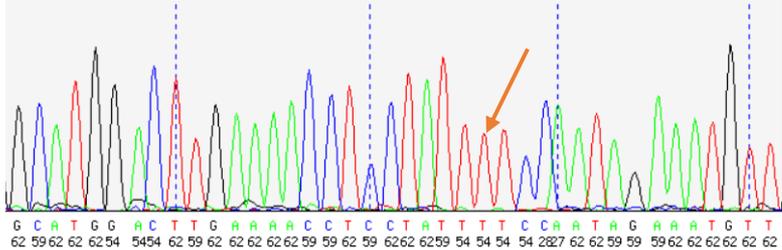
C. sativa
C. sativa
C. mollissima
C. mollissima

1. Mamma SNP1	GGCATGGACTTGAAAACTTCCTATTTTCCAATAGAAATGTTGGCCGAC TTCCACACCGGATATATCATATAAGCC TT
2. Garrone SNP1	GGCATGGACTTGAAAACTTCCTATTTTCCAATAGAAATGTTGGCCGAC TTCCACACCGGATATATCATATAAGCC TT
3. D1 SNP1	GGCATGGACTTGAAAACTTCCTATTTCCAATAGAAATGTTGGCCGAC TTCCACACCGGATATATCATATAAGCC TT
4. D5 SNP	GGCATGGACTTGAAAACTTCCTATTTCCAATAGAAATGTTGGCCGAC TTCCACACCGGATATATCATATAAGCC TT

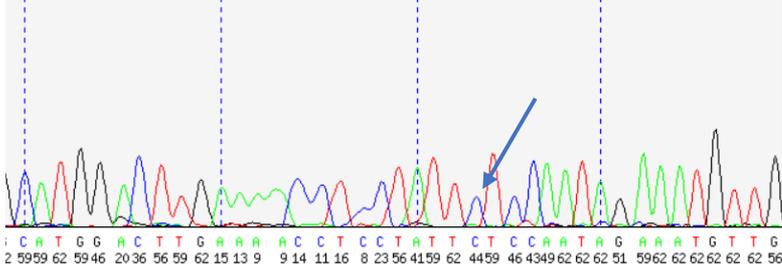
Sostituzione di T in *C. sativa*
 con C in *C. mollissima*



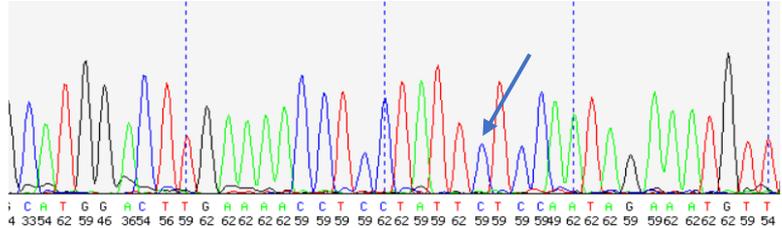
C. sativa
 (Sud Italia)



C. sativa
 (Nord-Italia)



C. mollissima

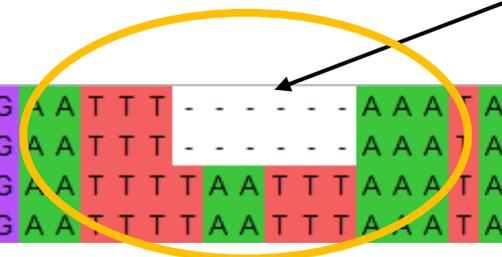


C. mollissima

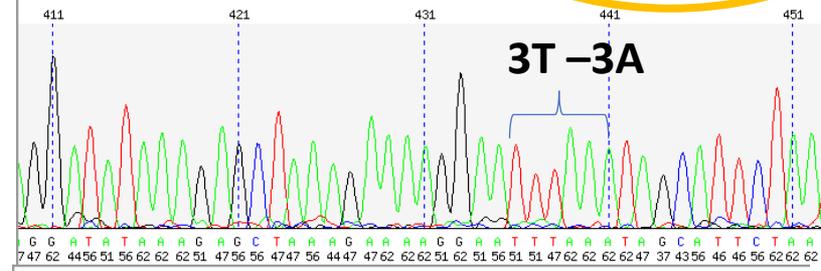
SNP 2

C. sativa
C. sativa
C. mollissima
C. mollissima

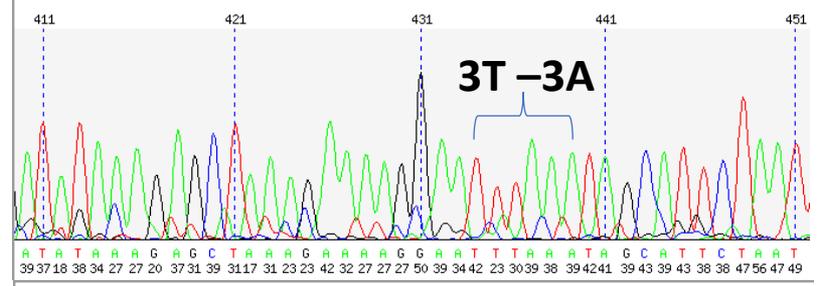
1. MAMMA SNP2	A A A G A G C T A A A G A A A A G G G A A T T T T - - - - - A A A T A G C A T T C T A A T T
2. GARRONE SNP2	A A A G A G C T A A A G A A A A G G G A A T T T T - - - - - A A A T A G C A T T C T A A T T
3. D1 SNP2	A A A G A G C T A A A G A A A A G G G A A T T T T A A T T T A A A T A G C A T T C T A A T T
4. D3 SNP2	A A A G A G C T A A A G A A A A G G G A A T T T T A A T T T A A A T A G C A T T C T A A T T



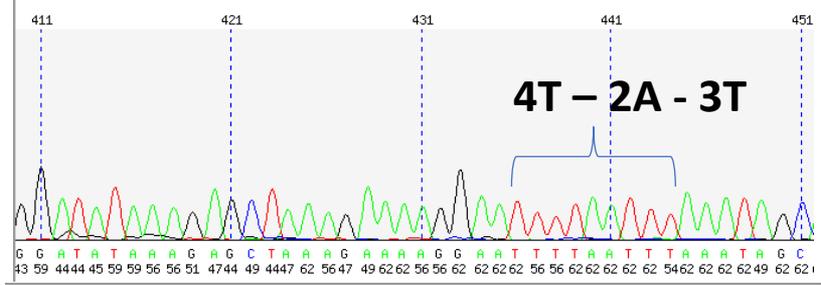
Delezione di 6 bp in *C. sativa* rispetto a *C. mollissima*



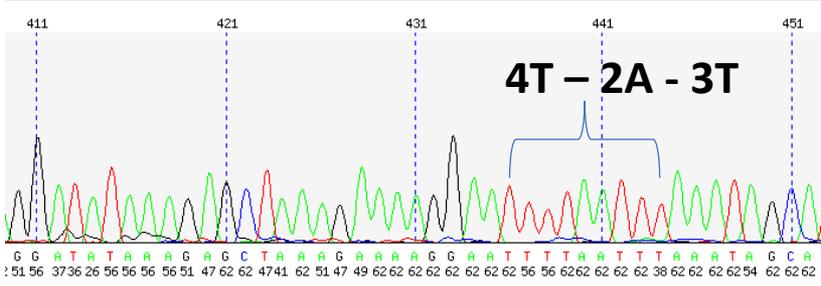
C. sativa
 (Sud Italia)



C. sativa
 (Nord Italia)



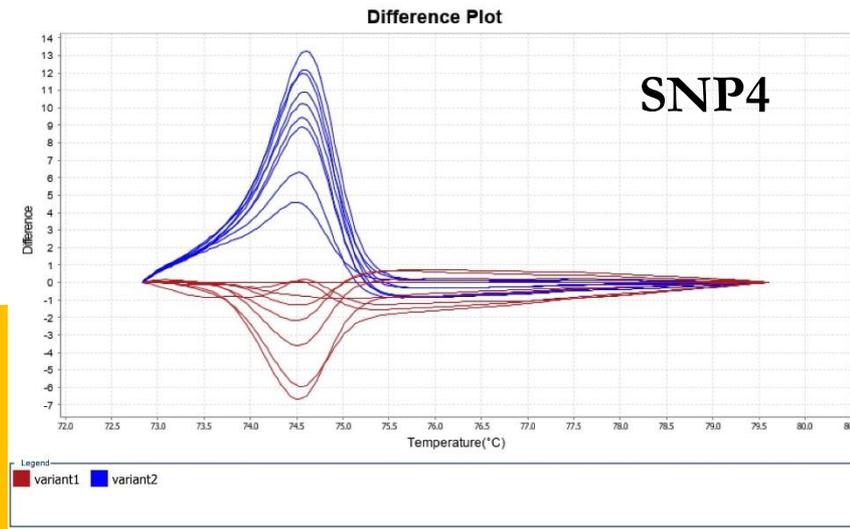
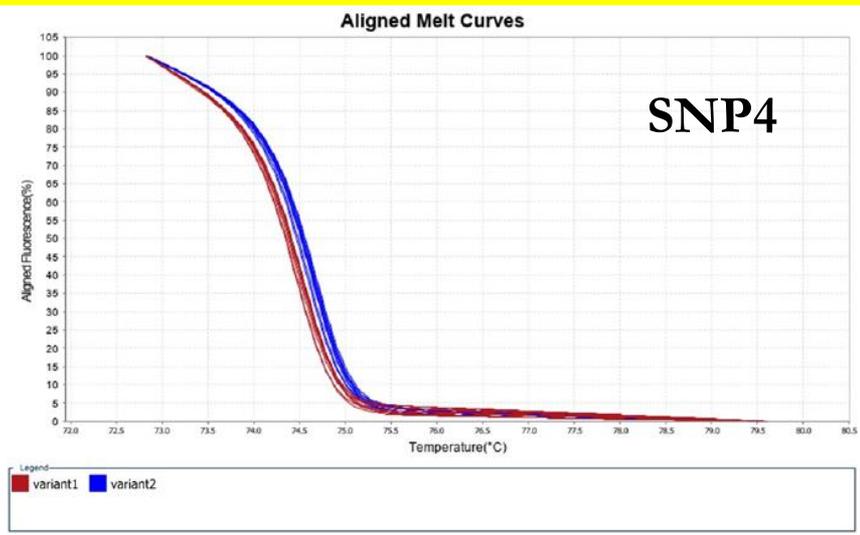
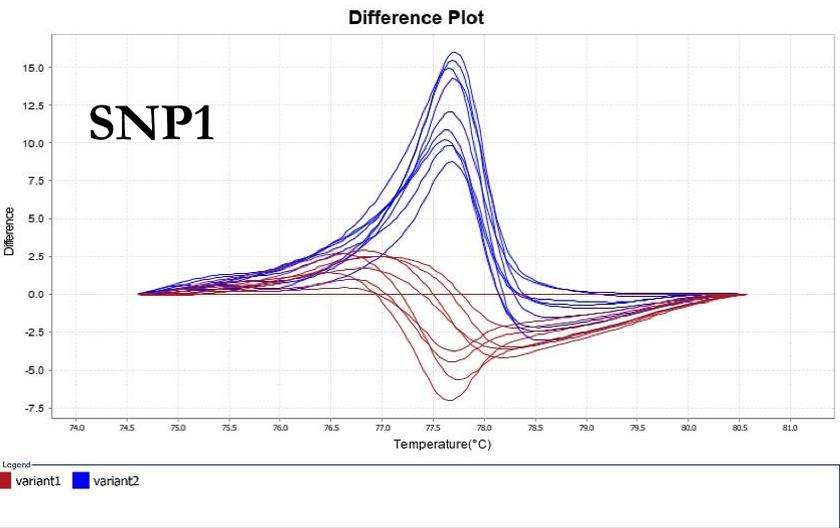
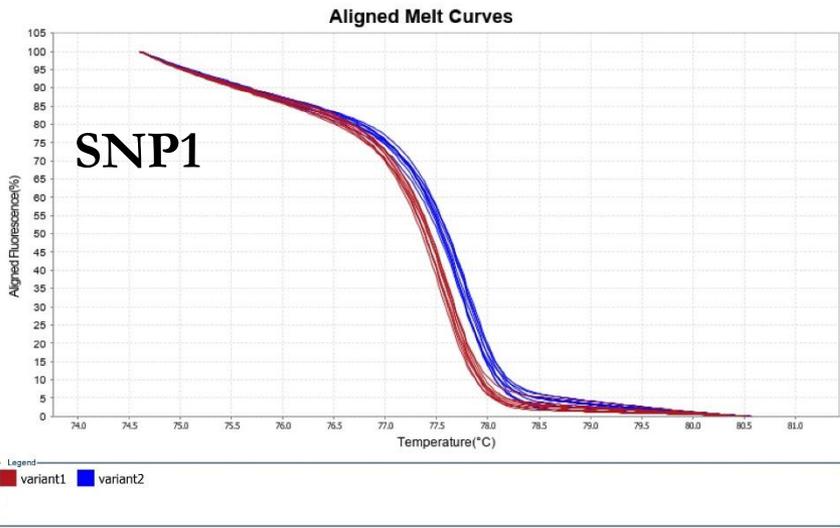
C. mollissima



C. mollissima

PRIME PROVE DI HRM

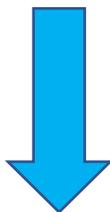
L'analisi HRM può discriminare sequenze di DNA in base alla loro composizione, lunghezza, contenuto GC. Questo si basa sulla tecnica di PCR e sull'analisi della curva di dissociazione o curva di melting (dissociazione caratteristica del DNA a doppia elica durante il riscaldamento), utilizzando coloranti fluorescenti



L'analisi HRM utilizza due modalità di analisi dei profili: una modalità distingue le curve sulla base delle differenze di temperatura di melting (T_m); l'altra distingue le curve sulla base della forma della curva caratteristica di ciascun amplicone

CONCLUSIONI e SVILUPPI FUTURI

- Efficiente **analisi SSR** per identificazione di cultivar da **foglie**
- Efficiente **analisi SSR** per l'identificazione di cultivar da partite di castagne a partire da **episperma**
- **SNP/INDEL cloroplastici** per l'identificazione delle **diverse specie**



*Validazione dell'utilizzo degli
SNP/INDEL su diverso materiale
vegetale e prodotti trasformati per la
tracciabilità di filiera*



GRAZIE A TUTTI PER L'ATTENZIONE!!

