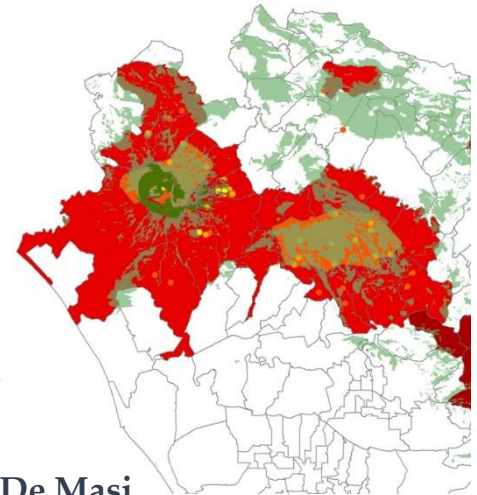
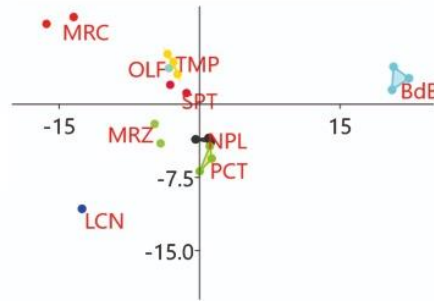
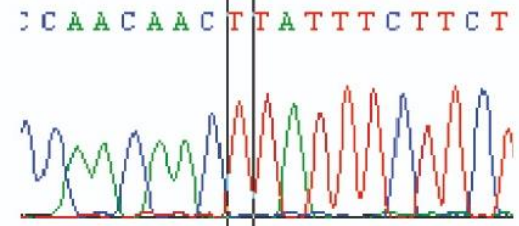
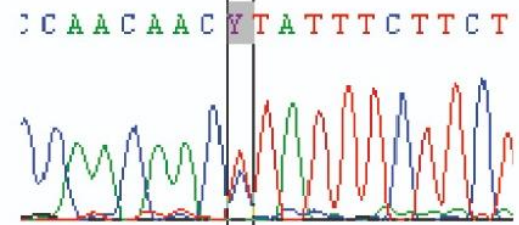




TRASFERIMENTO DI INNOVAZIONE PER LA VALORIZZAZIONE DEL CASTAGNO DA FRUTTO



a cura di
Marina Maura Calandrelli e Luigi De Masi



Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri
© Cnr Edizioni, anno 2022
Piazzale Aldo Moro, 7 - 00185 Roma
ISBN 978-88-8080-366-9 (electronic edition)
www.edizioni.cnr.it

TRASFERIMENTO DI INNOVAZIONE PER LA VALORIZZAZIONE DEL CASTAGNO DA FRUTTO

Curatori

Marina Maura Calandrelli - CNR, Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (IRET), <https://www.iret.cnr.it>
Luigi De Masi - CNR, Istituto di Bioscienze e Biorisorse (IBBR), <https://www.ibbr.cnr.it>

Autori

Andrea Becchimanzi, Marina Maura Calandrelli, Mario Conti, Emiddio de Franciscis di Casanova,
Luigi De Masi, Flora Della Valle, Franco Di Pippo, Elvira Ferrara, Rosario Nicoletti, Angelina Nunziata,
Milena Petriccione, Giulia Verrilli

Editing e impaginazione

Marina Maura Calandrelli

Immagine copertina

Marina Maura Calandrelli, Francesco Caracciolo, Angelina Nunziata

Ringraziamenti

Le attività svolte nell'ambito del progetto "CASTARRAY" sono state finanziate dalla Regione Campania in attuazione del Piano di Sviluppo Rurale (PSR) 2014-2020. Il Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA) è stato il coordinatore del progetto. Il Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) e l'Azienda agricola "Franco Di Pippo" sono stati Partner del progetto.

Indice

<i>Prefazione</i>	pag.	7
Flora Della Valle, Emiddio de Franciscis di Casanova		
<i>Cenni di biogeografia ed etnobotanica del castagno</i>	“	11
Elvira Ferrara, Milena Petriccione		
<i>La castanicoltura in Campania: stato di fatto e sviluppi futuri</i>	“	27
Marina Maura Calandrelli		
<i>Profili genetico-molecolari per l'identificazione varietale del castagno</i>	“	41
Luigi De Masi		
<i>Fattibilità tecnica del trasferimento alla filiera castanicola di strumenti per il riconoscimento genetico varietale</i>	“	57
Angelina Nunziata, Giulia Verrilli, Elvira Ferrara		
<i>Risposta del castagno alle avversità, miceti endofiti e ruolo ecologico</i>	“	69
Rosario Nicoletti, Andrea Becchimanzi, Luigi De Masi		
<i>Attività agronomiche e studi di fattibilità di un'azienda castanicola pilota</i>	“	91
Mario Conti, Franco Di Pippo		

Prefazione

Flora Della Valle ^{1,*}, Emiddio de Franciscis di Casanova ²

Affiliazioni

¹ Regione Campania, Responsabile Unità Operativa Dirigenziale “Foreste”, Via S. Lucia, 81 - 80134 Napoli

² Regione Campania, Responsabile della Sottomisura 16.1.1 “Sostegno per la costituzione e il funzionamento dei Gruppi Operativi del PEI in materia di produttività e sostenibilità dell’agricoltura” del PSR Campania 2014 – 2020, Via S. Lucia, 81 - 80134 Napoli

* E-mail: flora.dellavalle@regione.campania.it

Sin dal 2008 il Consiglio Europeo ha sottolineato la necessità di perseguire l’innovazione, la ricerca e lo sviluppo della produzione agricola, rivolta in particolare a migliorarne l’efficienza energetica, la crescita della produttività e la capacità di adattarsi ai cambiamenti climatici.

Al fine di introdurre l’innovazione nelle pratiche agricole per *colmare il divario tra queste e la scienza.*, si è individuato – anche sulla scorta dell’esperienza positiva della Misura 124 della programmazione 2007-2013- lo strumento della *cooperazione* ed in particolare il PEI-AGRI (partenariato europeo per l’Innovazione in materia di produttività e sostenibilità dell’agricoltura -acronimo: *PEI-AGRI*); quale strumento per promuovere, attraverso un approccio europeo di cooperazione, l’innovazione nel settore agricolo.

Tra gli obiettivi operativi del PEI-AGRI vi è quello di fungere - attraverso i Gruppi Operativi (G.O.) - da efficace collegamento tra la ricerca e la tecnologia più all’avanguardia e i soggetti interessati a fruire degli output messi a disposizione dalla ricerca e dalle applicazioni tecnologiche più innovative, tra cui, *in primis*, gli agricoltori, le imprese agricole, le cooperative, l’industria agroalimentare, i servizi di consulenza e le ONG.

Il PEI-AGRI, attraverso i G.O., intende realizzare sinergie attraverso lo scambio tra i partner in diversi ambiti strategici, settori, iniziative e progetti; contribuendo in tal modo a migliorare l'efficacia degli strumenti d'azione esistenti e integrandoli, se necessario, con nuovi interventi.

Ciò dovrebbe contribuire a tradurre i risultati della ricerca in innovazione effettiva, a trasferire più rapidamente l'innovazione nella pratica, a fornire un ritorno sistematico di informazione dalla pratica alla scienza sui bisogni di ricerca, a rafforzare lo scambio di conoscenze e a diffondere la consapevolezza della necessità di unire le forze per investire nell'innovazione sostenibile.

L'approccio perseguito attraverso i Gruppi Operativi del PEI è quello dell'*innovazione interattiva* i cui "mattoni" costitutivi, a differenza del modello di *innovazione lineare*, provengono non solo dalla scienza, ma anche dalla pratica e dagli attori intermedi: agricoltori, servizi di consulenza, ONG, ricercatori, ecc.; quali attori di un processo "dalla base alla cima" (*bottom up*).

L'innovazione interattiva si basa principalmente sulla cooperazione, la condivisione di conoscenze e l'intermediazione della consulenza. Questo approccio favorisce lo sviluppo dei risultati della ricerca in applicazioni pratiche e la creazione di idee attraverso l'interazione tra gli attori.

L'innovazione interattiva includendo le conoscenze esistenti, che non sempre sono puramente scientifiche, dovrebbe fornire soluzioni che si adattano bene alle circostanze e che sono più facili da implementare, in quanto il processo partecipativo è favorevole ad accelerare l'introduzione, la diffusione e l'accettazione delle nuove idee.

I gruppi operativi del PEI uniscono insieme gli attori dell'innovazione quali, ad esempio, agricoltori, gestori forestali, ricercatori, consulenti, formatori, imprese, associazioni di categoria, consumatori, ONG.

La formazione di tali Gruppi Operativi, che è oggetto di sostegno a valere sulla Misura 16.1, si svolge su iniziativa degli stessi attori dell'innovazione. Un gruppo operativo è pensato, infatti, per essere "*operativo*" e affrontare un certo problema pratico o una opportunità che può portare a una soluzione innovativa

La Misura 16 Cooperazione del PSR Campania 2014-2020, Sottomisura 16.1 "*Sostegno per la costituzione e il funzionamento dei Gruppi Operativi del PEI in materia di produttività e sostenibilità dell'agricoltura*", di cui è Soggetto Attuatore la UOD 500720, è stata articolata in due azioni finalizzate l'una allo start up dei Gruppi Operativi

(Azione 1 *“Sostegno per la costituzione e l'avvio dei GO”*) e l'altra alla realizzazione pratica delle attività progettuali (Azione 2 *Sostegno ai Progetti Operativi di Innovazione - POI*)”.

Il progetto Castarray, in particolare, è stato realizzato nell'ambito dell'attuazione della Azione 1 *“Sostegno per la costituzione e l'avvio dei GO”* che aveva l'obiettivo di sostenere le attività connesse alla formazione dei Gruppi Operativi (G.O.), nonché della impostazione e predisposizione dei Progetti Operativi di Innovazione (POI), veri e propri. Ciascun P.O.I. avrebbe dovuto affrontare la risoluzione di problematiche specifiche individuate dagli operatori dei settori agricoli, alimentari e forestali e/o per cogliere una opportunità che potesse condurre a soluzioni innovative.

In questa prima fase il partenariato del Progetto, denominato Team di Progetto, ha dovuto presentare un'idea progettuale, definita Proposta di Innovazione (P.I.), ed impegnarsi nelle attività di animazione necessarie essenzialmente alla ricerca ed al reclutamento dei partner ed alla implementazione del network tra loro necessario a definire il progetto (anche attraverso studi di fattibilità, indagini di mercato, ecc).

L'Azione 1 ha avuto, perciò, il compito di accompagnare i Team di Progetto a evolvere/maturare in Gruppi Operativi ed a raccogliere ed elaborare gli strumenti necessari affinché una semplice idea progettuale si potesse eventualmente tramutare in un progetto più puntuale (Progetto Operativo di Innovazione) che, a sua volta, potesse eventualmente trovare sostegno nell'ambito della Azione 2 *“Sostegno ai Progetti Operativi di Innovazione (POI)”* , dedicata a sostenere la realizzazione di progetti pilota, sviluppo di nuovi prodotti, pratiche, processi e tecnologie nel settore agroalimentare.

In tale contesto il progetto Castarray, in particolare, realizzato nell'ambito dell'attuazione della Misura 16.1 Azione 1, ha inteso tutelare il comparto, definendo protocolli certi per l'identificazione ed il riconoscimento genetico varietale del castagno da frutto. Tale caratterizzazione e il conseguente trasferimento tecnologico consentirà di certificare il materiale vegetale utilizzato, offrendo garanzie per i nuovi impianti e determinando un impatto positivo sull'utilizzo e la tutela del vasto patrimonio genetico e varietale che connota la castanicoltura campana.

La castanicoltura campana, infatti, riveste un ruolo di estrema rilevanza, non solo per gli evidenti riscontri economici e occupazionali, ma anche per i risvolti paesaggistici, a cui si associa la cura e la manutenzione del territorio.

In questa ottica tutte le azioni, quali appunto quelle declinate nel progetto Castarray, volte a tutelare il grande giacimento di risorse genetiche insito nella castanicoltura campana e ad introdurre innovazioni sostenibili nella gestione degli impianti già esistenti o da realizzarsi, rappresentano un importante volano di sviluppo per un comparto come detto davvero nevralgico dell'agricoltura campana sia in termini economici che per i suoi insostituibili riverberi ambientali, paesaggistici e di difesa idrogeologica.

Cenni di biogeografia ed etnobotanica del castagno

Elvira Ferrara^{1,2}, **Milena Petriccione**²

Affiliazioni

¹ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali Biologiche e Farmaceutiche, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Via Vivaldi, 43 - 81100 Caserta

² CREA - Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (OFA), Via Torrino, 3 - 81100 Caserta

* E-mail: milena.petriccione@crea.gov.it

Il genere *Castanea* appartiene alla famiglia delle *Fagaceae* e include 13 specie. L'areale di distribuzione del castagno europeo (*Castanea sativa* Mill.) si estende a tutti i Paesi del bacino del Mediterraneo fino ad arrivare alle Regioni extraeuropee, dalla penisola iberica alle vicinanze del Mar Nero. In Asia, in particolare in Cina, Corea, Giappone e Vietnam, sono diffuse le specie: *Castanea crenata* Siebold & Zucc., *Castanea mollissima* Blume, *Castanea seguinii* Dode e *Castanea henryi* (Skan) Rehder & E.H.Wilson; mentre nel Nord America troviamo *Castanea dentata* (Marshall) Borkh. e *Castanea pumila* (L.) Mill. [Bounous, 2002].

Le diverse specie di castagno mostrano un elevato livello di diversità con tratti morfologici ben differenziati, che riflettono l'adattamento alle differenti condizioni ambientali [Beccaro et al., 2019].

Il genere *Castanea* probabilmente si è differenziato alla fine del Miocene, così come dimostrato dalla presenza in Europa di ritrovamenti fossili di un castagno simile a quello europeo [Adua 1999; Bounous, 2002]. La ricostruzione filogeografica di questo albero indica il proprio centro di origine nell'Asia Minore. La specie ancestrale avrebbe dato origine a due linee filogenetiche, la prima in loco da cui si è evoluta *Castanea sativa*, la seconda diretta verso l'estremo Oriente, la quale, a seguito di una seconda separazione, ha dato origine alle

specie vicarianti asiatiche (*Castanea mollissima* e *Castanea crenata*) e alla loro migrazione attraverso lo stretto di Bering, con il successivo differenziamento della specie *Castanea dentata* in Nord-America. Inoltre, il materiale fossile ha consentito di evidenziare la presenza in Italia di una specie ancestrale ormai estinta *Castanea latifolia* [Giannini e Paffetti, 2011].

Il castagno, a seguito dell'ultima glaciazione di Würm, che segnò la fine del Pleistocene e l'inizio dell'Olocene (11.700 anni fa), subì una forte contrazione come altre specie di interesse forestale sia in Europa che in altre parti del mondo. I diagrammi pollinici testimoniano la scomparsa del *Castanea latifolia* e la sopravvivenza solo di *Castanea sativa*. In Europa, durante il pleniglaciale würmiano, l'Italia e la penisola Iberica divennero due importanti aree ottimali di rifugio per il castagno, consentendo la persistenza di popolazioni sparse ed esigue nelle zone climaticamente più favorevoli. Al termine della glaciazione a causa del riscaldamento climatico nella prima metà dell'Olocene, il castagno riuscì ad accrescere la sua entità numerica e l'areale delle sue popolazioni anche in ampie zone dell'Europa meridionale [Krebs et al. 2019a]. A partire dall'Età del Bronzo (dal 3.400 a.C. al 600 a.C. circa), l'ulteriore estensione dell'areale geografico del castagno è avvenuta per azione antropica, infatti, studi di paleobotanica dimostrano che intorno al 1000 a.C. la presenza di polline di castagno si attestava intorno all'8% del totale della flora arborea e che tale percentuale raggiungeva il 48% all'inizio dell'era cristiana [Bellini, 2019]. Il castagno europeo attualmente è diffuso latitudinalmente tra il 20° e il 60° parallelo Nord e longitudinalmente da circa il 17° O nelle Azzorre al 49° E in Azerbaigian e Iran con una distribuzione ampia e frammentata [Krebs et al. 2019b].

Nel nostro Paese il castagno giunse attraverso la Grecia, dove è stato per secoli un'importante fonte di cibo e legno, specie per le popolazioni delle zone montane. Il suo nome scientifico *Castanea sativa* deriva da *Kastania*, villaggio della Tessaglia o da *Kastanis*, città dell'Asia Minore dove questa specie era molto diffusa, mentre il termine *sativa* deriva dal latino e significa coltivato [Aliotta e Petriccione, 2008].

Numerose sono le fonti che testimoniano l'esistenza del castagno e la conoscenza dei suoi frutti nell'antica Grecia. Lo storico e filosofo ateniese Senofonte, che accompagnò il persiano Ciro il Giovane nella spedizione contro il fratello Artaserse II, nella sua *Anàbasi* (IV sec a.C.) descrive la presenza, nei solai delle case dei Mossineci, di pani secchi dell'anno precedente, vino e "una gran quantità di strane noci (κάρυα) piatte senza

diaframmi all'interno" sconosciute ai Greci, che, variamente cotte, costituivano il piatto di base della popolazione. Esse appaiono a Senofonte un po' come un cibo da maiali, in considerazione dell'obesità dei figli dei notabili, nutriti proprio con queste "noci" (V.4.32) [Tripodi, 1995]. Senofonte testimonia anche la coltivazione nell'area descrivendo come i Mossineci avessero sfruttato il territorio in modo evoluto e razionale mettendo a dimora in collina la vite e a quote superiori il castagno [Manfredi, 1987]. Teofrasto (IV sec a.C.) definisce il castagno *Dios Balano*, ovvero ghianda di Zeus (Giove), e descrive come in Grecia questa specie selvatica o coltivata amava i luoghi ombrosi ed umidi (1, 3 c.7). Il suo legno era di lunga durata (1, 5, c.5) e la scorza del frutto non era legnosa come quella della nocciola ma di natura coriacea (1, 1 c.18). Le varietà coltivate di questa specie hanno ricevuto diversi nomi: *Euboikè Karyon*, noce euboica, poiché si coltivava nell'isola di Eubea in Magnesia; *Sinopike Karyon*, noce di Sinope, *Sardinia Balanos*, ghianda di Sardi e *Platy Karyon* ovvero noce larga. Gli Arcadi, popolazione greca che ha conservato a lungo gli antichi costumi, erano chiamati *Balanophagoi*, poiché facevano largo consumo delle castagne.

Galeno di Pergamo, medico greco che viveva a poche miglia da Sardi, città della Lidia, conferma la provenienza delle castagne da questa città, inoltre sostiene che questa specie era denominata anche *balani leuceni*, da Leucene, luogo situato sul monte Ida [Targioni-Tozzetti, 1853]. Nell'opera *De victu attenuante* ne descrive la scarsa digeribilità "*le castagne e le ghiande si usano crude, mentre sono indigeste se vengono bollite, cotte oppure abbrustolite*" (X, 80).

Nicandro (III sec. a. C.) descrive quattro varietà di castagne con diverse caratteristiche, Lopima difficile da sbucciare, Malaca con seme tenero, Gimnolopa senza peluria e Sardinia dalla città di Sardi in Libia [Bounous e De Guarda, 2002].

Dopo i Greci, furono i Romani a diffondere in modo sistematico il castagno su larga scala, essendo interessati anche alla selezione di materiale genetico per poter migliorare la qualità delle castagne e del legno. Catone il Censore (II sec. a.C.) nel trattato *De Agricoltura* descrive gli alberi che possono abbellire i poderi tra cui le "noci nude" alludendo al castagno; Marco Terenzio Varrone (I sec. a.C.) nel suo manuale di agricoltura *De re rustica* menziona la castagna con il termine *castanea*; Ovidio nel suo *Ars amatoria* (I sec. a.C.) riporta che le castagne erano vendute nei mercati frutticoli della Via Sacra a Roma e che, come l'uva, erano offerte in dono dai giovani

innamorati alle donne amate. Le castagne insieme alle noci erano utilizzate dai Romani per l'allevamento dei ghiri nei *glirarium*, recinti chiusi da muri di pietra levigata o intonacata per impedirne la fuga quando mancavano le ghiande. Questi animali erano molto apprezzati per le loro carni, infatti ghiri in salsa di miele e di papavero furono presentati fra gli antipasti nella famosa cena di Trimalcione descritta da Petronio (*Satyricon*, XXXI, 10) e i ghiri erano anche la regalia che il contadino portava al padrone (Marziale, *Epigrammata*, XIII, 58, v. 36) [Malossini, 2011].

Il poeta Publio Virgilio Marone (I sec. a.C.) nelle Bucoliche descrive il paesaggio padano sotto le spoglie del pastore Titiro descrivendo il castagno ed i suoi frutti, e ricordando come questo frutto, insieme a latte e formaggio, abbia rappresentato per secoli un elemento fondamentale della dieta. Nell'opera, Titiro invita Melibeo a restare per una notte presso di lui, promettendogli come cena formaggio, frutta e castagne *"Potevi tuttavia riposare qui con me per questa notte sulle foglie verdi: ho mele mature, castagne molli e formaggio abbondante, e già di lontano fumano i tetti delle cascine e più grandi scendono dagli alti monti le ombre"* (Buc. I Ecloga 80-83). Nella II Ecloga descrive il monologo del pastore Coridone che canta il suo amore disperato per il giovanissimo Alessi descrivendo ciò che gli donerà: *"Ed io stesso coglierò le grigie cotogne dalla tenera lanuggine e i frutti del castagno, che la mia Amarilli prediligeva"*. Nella VII Ecloga descrive i castagni e i loro frutti che fuoriescono dai ricci *"Stan ritti i ginepri ed i castagni irti di ricci, giacciono sparsi qua e là i frutti ciascuno sotto il suo albero, ogni cosa è lieta ora; ma se il bell'Alessi andasse via da questi monti, vedresti anche i fiumi senz'acqua"* (Buc. VII Ecloga 80-83).

Il castagno è riportato da Virgilio anche nelle Georgiche, sia per la facilità con cui può nascere da seme *"Altre a l'opposto dai sepolti semi Nascono sol, come il castagno e l'ischio"* (L. II, 33-34) che per la capacità di essere innestato sul faggio *"Ma l'ispido corbezzolo l'innesto Brama del noce, e inserte mele anch'esso Fruttar si vide il platano infecondo; Sovente a l'orno incanutir le chioime Dai bianchi fior del pero, irte castagne Crebbero in cima al faggio, e appiè degli olmi Cadute ghiande masticar i porci"*. (L. II, 112-118).

Nella *Naturalis Historia*, Plinio il Vecchio (12-79 d.C.) descrive il castagno in diversi libri, in particolare narra come gli Indi ricavassero dalle castagne un olio particolare *"Si dice che gli Indi lo ricavano dalle castagne, dal sesamo e dal riso, i popoli che si nutrono di pesce dai pesci."* (NH XV, 28). Inoltre, considera le castagne affini alle ghiande, ma rivestite da una *"scorza spinosa"* e ne descrive diverse varietà e i loro usi. *"Chiamiamo noci anche*

le castagne, sebbene più vicine al genere delle ghiande. Esse hanno protezione rinforzata da una scorza spinosa, che risulta appena abbozzata nelle ghiande, è strano che siano pochissime apprezzate quelle che tanta cura della natura avevano nascosto. In alcune da uno stesso guscio tre frutti; e cedevole la scorza, la membrana poi vicina alla polpa sia in queste sia nelle noci guasta il sapore, se non viene tolta. Più gradevole per i cibi tostarle, e vengono macinate, e al digiuno delle donne offrono una certa illusione del pane. Queste giunsero dapprima Sardi, perciò presso i Greci le chiamano ghiande sarde, infatti imposero dopo il nome di ghianda di Zeus a quelle rese più eccellenti con la coltivazione. Attualmente molte le specie di queste. Le tarantine facili e non pesanti per il cibo, piatte nella forma. Più rotonda quella che è detta balanite, soprattutto facile a sbucciarsi e che si presenta pulita spontaneamente. È piatta anche la salariana, meno malleabile la tarantina, più pregiata la corelliana e la tereiana ottenuta da essa in un modo che diremo a proposito di innesti, la scorza rosa l'antepone a quelle triangolari e a quelle nere comuni, che sono dette da cuocere. Patria per le più pregiate Taranto e Napoli in Campania. Le altre sono prodotte per il cibo dei maiali, per la ripetizione rugosa della cortecchia anche nei nuclei" (NH XV, 92-94). Nel XVII libro, Plinio descrive la pratica dell'innesto e l'attribuzione di nomi alle diverse varietà di castagno. "Il cavaliere romano Corellio nato ad Ateste innestò uno stesso castagno con il suo medesimo germoglio nel territorio napoletano. Così fu prodotta una castagna fra quelle rinomate, che prese il suo nome. Poi il suo liberto Tereo innestò di nuovo la corelliana. Questa è la differenza fra esse: quella più abbondante, questa tereiana migliore" (NH XVII, 122).

L'aristocrazia romana durante il primo periodo di espansione della coltivazione a frutto non dà particolare attenzione a questa coltura, come testimonia un epigramma di Marziale (I sec. d.C.) in cui il castagno viene addirittura utilizzato come simbolo di inferiorità [Conedera et al. 2004]. "Torquato possiede una splendida villa alla quarta pietra miliare; Otacilio ha comprato un poderetto alla quarta pietra miliare. Torquato ha costruito magnifiche terme di marmo di vario colore; Otacilio ha fatto un piccolo bagno. Torquato ha messo a dimora un laureto nel suo campo; Otacilio ha piantato cento castagni. Quando Torquato era console, Otacilio fu capo di un distretto, ed era convinto di non essergli inferiore con una carica così importante. Come una volta il grosso bue fece scoppiare la piccola rana, così io credo che Torquato farà scoppiare Otacilio."

Ai suoi ospiti, lo stesso Marziale, invece, alla fine della cena faceva servire “dalla dotta Napoli partorite, castagne a lento fuoco abbrustolite”. Non è noto però se tra le varietà coltivate ci fossero già i più pregiati marroni.

Palladio Rutilio Tauro Emiliano (IV sec. d.C.), ultimo autore di agronomia dell'età classica, nella sua opera, *Opus Agriculturae* descrive il castagno nell'ultimo libro dedicato agli innesti degli alberi (*De insitione*), raccomandando la propagazione da seme, il trapianto dei semenzali dopo due anni e la tecnica dettagliata dell'innesto.

I Romani con la conquista di nuovi territori contribuirono alla forte espansione del castagno in Europa grazie anche alla multifunzionalità di questo albero con la realizzazione di castagneti da frutto e cedui per l'utilizzo del legno. In Europa, la caduta dell'Impero Romano d'Occidente e le successive invasioni barbariche portarono a secoli caratterizzati da guerre, carestie e col tempo si andarono a perdere molte tecniche colturali a causa di un drastico cambiamento di mentalità e di una profonda crisi. Nella generale situazione di degrado politico ed economico dei secoli anteriori al Mille, con la decadenza della vita urbana e con la disgregazione dell'habitat naturale paradossalmente le pratiche agricole segnarono con le forme proprie del paesaggio agrario gli spazi all'interno dei confini dei feudi o dei giardini monastici.

Con l'unificazione dei territori romano-germanici da parte di Carlo Magno (742-814) si ebbe una ripresa dell'agricoltura con l'emanazione nel IX secolo del *Capitulare de villis vel curtis imperii*, un regolamento delle terre di diritto regio scritto ad Aquisgrana, per ordine di Carlo Magno dal monaco Benedettino Ansegis, che raccomandava di inserire nei broli e i giardini oltre agli ortaggi, fiori e piante aromatiche anche le specie da frutto, tra cui il castagno [Agnoletti, 2020].

Nei primi secoli del Medioevo, in molte regioni il castagno domina il paesaggio boschivo che assume un'inedita centralità rispetto all'epoca classica con una forte valenza positiva, come non accadeva nel mondo romano, grazie anche alle raccolte di leggi prodotte dai regni romano-barbarici, che avevano dedicato ampio spazio allo sfruttamento delle specie arboree. In particolare, l'Editto di Rotari con una severa regolamentazione dell'uso delle risorse boschive aveva tutelato soprattutto specie fruttifere come olivi, castagni e vite, caratteristiche del suolo italico, confermando come questa legislazione tenesse ben presente le

specificità del paesaggio peninsulare. La diffusione del castagno in molte regioni quali Piemonte, Liguria, Toscana, Campania e Calabria è documentata dalla rete censuale, dagli statuti e dai cartari delle certose e dei monasteri [Cherubini, 1984].

La grande espansione dei castagneti in Italia avvenne grazie alla contessa Matilde di Canossa (1046-1115) che, convinta dell'importanza delle castagne nell'alimentazione dei contadini, ne favorì la diffusione grazie all'aiuto dei monaci benedettini, ideando anche il criterio di disposizione degli alberi che da allora prese il nome di "sesto matildico", dove le piante erano allevate in forma libera e disposte ai vertici di triangoli sfalsati a una distanza di circa 12 metri, in modo che l'erba del sottobosco poteva essere adibita a pascolo per le greggi. L'incremento demografico dopo l'anno Mille portò all'aumento della domanda di nuovi spazi da dissodare e mettere a coltura, pertanto molte comunità cominciarono a preoccuparsi di regolamentare, attraverso leggi e statuti, la gestione dei boschi e dei castagneti. Al contrario della quercia, il castagno veniva curato, coltivato e innestato al fine di migliorarne il frutto, la cui raccolta era aperta a tutti. La castagna veniva definita "pane dei poveri" in quanto si poteva essiccare e macinare ottenendo così una farina per la panificazione, ma soprattutto per fare dolci e polentine dette *puls*. I frutti si mangiavano anche interi, da soli o spezzati nella minestra per dare sostanza, ed erano molto apprezzati soprattutto nei periodi di quaresima, quando non si mangiava carne. Le castagne potevano essere conservate per molto tempo e anche il legno di castagno era molto pregiato e richiesto dai falegnami per realizzare mobili di valore.

Al miglioramento delle qualità del castagno contribuirono con molta probabilità i monaci, sia perché depositari della cultura del tempo e sia perché intravidero in questa specie un valido sostentamento alimentare durante l'inverno. Ancora oggi molti eremi di montagna sono ancora strettamente legati alla presenza nei dintorni di castagneti con piante secolari, produttori castagne di ottima qualità.

I castagneti venivano tutelati dalle norme contenute nei testi statutari medievali per evitare danneggiamenti, era vietato l'accesso agli animali durante l'epoca di caduta dei frutti e il pascolo abusivo del bestiame. Inoltre, venivano disciplinati gli usi civici e regolamentate le consuetudini secolari, i forestieri non potevano approvvigionarsi di legna mentre gli abitanti locali non potevano effettuare prelievi eccessivi. La ceduzione veniva organizzata in parcelle con intervalli temporali di 5-7 anni e venivano obbligatoriamente innestati ogni

anno un certo numero di piante sia su terreni privati che comuni. Il paesaggio forestale registrava un'espansione del castagno a spese di altre specie forestali, ciò è stato descritto dal vescovo Ottone di Freising (Baviera) durante la sua visita in Italia nel 1154 nel *Gesta Frederici seu rectius Cronica* [Pitte, 1986].

Norme specifiche venivano disposte per evitare i danni da incendi con il divieto della pratica del debbio nelle vicinanze di un bosco, il divieto e la limitazione della costruzione di carbonaie e con l'obbligo di accorrere a spegnere gli incendi. Multe pesantissime venivano addebitate a chi incendiava per dolo o non, ed era previsto anche il taglio della mano. La raccolta illecita era vietata e veniva concessa dalle autorità comunali solo dopo la raccolta. Negli statuti di Monbasiglio (CN) al termine della raccolta era concesso l'accesso agli spigolatori per un giorno, poi per due ai porci per mangiare i frutti danneggiati ed infine alle pecore [Agnoletti, 2020].

Nel Medioevo il castagno ebbe una diffusione di gran lunga superiore a quella consigliata dalle condizioni ambientali, risultando presente anche in zone pianeggianti. Nella regione Campania, la coltivazione di questa specie fu incentivata e migliorata grazie alla diffusione dell'innesto introdotto dai monaci dell'Abbazia della SS. Trinità di Cava dei Tirreni (SA). Il castagno era presente nell'agro nocerino-sarnese nel territorio compreso tra gli attuali comuni di Nocera Superiore, Roccapiemonte, Mercato Sanseverino e Cava dei Tirreni. In quest'area i rapporti tra i proprietari delle terre ed i coloni, le tecniche di coltivazione del castagno da frutto, distinto da quello da taglio, e di essiccazione delle castagne, nonché le varietà prodotte, erano regolati dai contratti agrari [Vitolo, 2017]. Nell'area tra Salerno, Cava e Amalfi, le castagne più diffuse per la loro dolcezza erano le "zenzale" e le "robirole", ascrivibili probabilmente alle "riggiole" coltivate nell'Avellinese con un frutto non molto dolce, simili alle "raggiolane", presenti in altre regioni italiane come Toscana, Emilia-Romagna e Calabria. Erano presenti anche le "granacce" probabilmente utilizzate per la produzione di farina. Nel territorio di Avellino alcuni contratti agrari prevedevano per il concessionario l'obbligo di innestare la "Palummina", una varietà di castagne che insieme alla "Verdole" ha ottenuto il riconoscimento di Indicazione Geografica Protetta (IGP) come "Castagna di Montella" (Reg. CE n. 1107/96). Nel comune di Atripalda (AV) sono documentate le "Ensetazze", che dovrebbero essere, analogamente alle "Insites" di Cava, le castagne nate da innesti, ma non è da escludere che fossero una varietà particolare, da assimilare alle "Enzerte" di Acerno

(SA) [Caprese, 1979]. In Campania era importante anche la produzione del legno che era esportato dagli armatori della Repubblica di Amalfi [Bonous e De Guarda, 2002].

La castagna in quegli anni era associata all'alimentazione della povera gente, ma ben presto fu utilizzata anche come cibo dei contadini di pianura e collina e la si ritrova anche sulle mense signorili e dei ceti più abbienti e sui mercati di diverse città italiane e straniere così come dimostrato dai dazi di esportazione, i più antichi dei quali fissati da Federico II di Svevia nel 1231 con un tarì a salma, per i *fundicarii* di Napoli [Vitolo, 2017].

Le produzioni in eccesso per le comunità venivano commercializzate nei paesi vicini così come annotato nei rendiconti dei pedaggi e della *gabella castanearum* per le esportazioni e i trasporti da un comune all'altro. Nei conti delle Castellanie Sabaude era annotato se il raccolto era di buona qualità o i frutti erano piccoli o danneggiati. Nel 1300 i marroni della Brianza vengono citati da Giovannino de' Grassi nel *Tacuinum sanitatis* e quelli di Milano da Pietro de' Crescenzi nel trattato *Liber ruralium commodorum* per la loro qualità [Comba e Naso, 2000]. Pietro de' Crescenzi nel suo trattato descrive anche la modalità di raccolta delle castagne che avveniva con l'uso di pertiche mediante la tecnica della bacchiatura quando i ricci erano verdi e chiusi, successivamente erano prelevati con pinze di legno e ammucchiati nella ricciaia, che veniva realizzata all'interno di una siepe per proteggerla dai porci. I cumuli di ricci venivano ricoperti di foglie e terra ben pressati e bagnati per favorire la fermentazione dei frutti al fine di conservarli fino a primavera. Il legno di castagno, invece, era utilizzato per la palificazione dei vigneti allevati a contospalliera.

La realizzazione della ricciaia è descritta anche da Michelangelo Tanaglia nel *De agricultura*, per favorire l'apertura dei ricci e poi i frutti erano riposti nella sabbia per la conservazione fino al mese di maggio. Le castagne successivamente erano selezionate in base alla pezzatura e quelle più grandi (prima scelta) erano destinate ai mercati dei censi signorili, mentre quelle più piccole erano utilizzate per il consumo domestico e l'essiccazione.

La castagna era definita *virida* se era fresca e non matura all'interno del riccio, *munda* cioè priva del riccio, *sicca* se essiccata e sbucciata, e *pista* se macinata e frantumata dopo l'essiccazione. Le castagne bianche o secche erano lessate in acqua o vino e per renderle più digeribili si consigliava di cuocerle in due momenti, per

accentuarne il sapore si raccomandava di consumarle con legumi o frutta secca. Le castagne erano anche arrostiti in padelle forate o sotto la brace e questo metodo di cottura migliorava il sapore e la loro qualità.

La farina di castagne fu utilizzata a partire dalla fine del '400 dalle popolazioni montane nei periodi di carenza delle graminacee, e la macinazione era effettuata in ambito domestico per evitare il pagamento delle tasse. Avendo una composizione simile a quella del frumento, le castagne furono definite anche "pane d'albero" [Braudel, 1977].

Nel 1400 i castagneti erano diffusi in collina ed in montagna, ma verso la fine del medioevo la coltivazione subisce una regressione e resta limitata alle popolazioni dell'entroterra che continuano a consumare castagne nella loro alimentazione. In Liguria vi fu una diffusione del castagno, utilizzato anche come legno per l'edilizia e come combustibile. La specie successivamente si diffuse in Toscana, dove in alcune zone come la Garfagnana nel '400 fu emanata la prima legge sul castagno, mentre in Lombardia erano rinomati i marroni prodotti a Tremezzo, Limonta e Lecco ed in alcuni comuni venivano regolamentati i tributi relativi a marroni secchi o verdi.

Con il passare dei secoli la specie fu conosciuta e apprezzata in tutta Europa. In Italia assunse un ruolo rilevante nella storia agraria, soprattutto in tempo di guerra quando vi era necessità di sfamare molte persone. In Campania, il castagno era diffuso soprattutto nell'avellinese, ma anche nell'area vulcanica del massiccio di Roccamonfina, dove aveva un'importanza considerevole. Ciò è dimostrato da un antico documento della cancelleria aragonese che ne attesta la commercializzazione nella fiera annuale di San Giacomo e nei mercati settimanali che si tenevano nell'Università della Terra di Marzano. I mercanti, nelle contrattazioni di vendita e di acquisto, dovevano versare al feudatario dell'Università il pagamento del diritto di piazza per la commercializzazione di diverse merci, tra cui le castagne. L'importanza crescente della coltura è documentata da leggi e statuti che si preoccupavano di tutelare gli usi civici dei castagneti fissando multe pesantissime a chi raccoglieva i frutti illecitamente o fraudolentemente e vietando l'accesso degli animali nei fondi, specialmente durante i periodi di caduta dei frutti [Migliozzi, 2005].

Nella statistica del 1752 il prezzo delle castagne era di poco inferiore a quello del frumento e il forte incremento della coltura in questo periodo era dovuto alla costruzione di numerosi essiccatoi. Questi ultimi erano costruiti

su due piani, nel piano inferiore veniva acceso il fuoco e in quello superiore si versavano su un graticcio le castagne che si rigiravano. In un secondo momento gli essiccatoi furono costruiti accanto ai castagneti per facilitare il trasporto. Le castagne essiccate venivano sbucciate con la battitura eseguita dagli uomini con mazze, mentre alle donne era affidata la vagliatura con grossi cesti di vimini, a cui seguiva la cernita dove si separavano i frutti rotti da quelli più piccoli. In questo periodo iniziò anche la pratica della cura delle castagne.

Nell'era moderna le castagne costituiscono ancora il cibo principale per le popolazioni montane, ma esse sono note anche fuori da questo ambiente. Il medico e scrittore Lando Ortensio (1510-1558) elogia sia i marroni chiavennaschi, sia le castagne di zucchero che si trovano sui mercati napoletani. Anche Costanzo Felici (1525-1585), medico e naturalista marchigiano, ne descrive i vari usi affermando che si può mangiare secca o in minestra. Il bresciano Agostino Gallo (1499-1570) nella sua opera *“Le dieci giornate della vera agricoltura e piaceri della villa”* ci parla della conservazione dei marroni, che si raccolgono maturi e bene asciutti e si conservano in luoghi chiusi. Anche il letterato modenese Giacomo Castelvetro (1546-1616) consiglia di bollire i marroni nel vino bianco e farli seccare al fumo e conservarli tutto l'anno, se cotti in acqua questi si chiamano lessi, consiglia inoltre anche l'uso di castagne per farcire capponi e oche [Agnoletti, 2020].

Le forme di utilizzo delle castagne si accrescono e si estendono anche ai ceti borghesi assumendo il ruolo di frutta o dolce. Pian piano la castagna ha assunto il suo rango in cucina e il suo utilizzo è legato alla tradizione e al ceto del consumatore. Nel corso dei secoli oltre alle aree coltivabili a cereali si è diffuso anche il castagneto da frutto. In Piemonte le zone castanicole sono Cuneo, Mondovì e Ivrea. In Liguria, con le castagne prima sopperivano all'insufficienza dei cereali, ma poi impiantarono nuovi castagneti e la diffusione della coltura si moltiplicò, creando nuovi essiccatoi e diventando una delle regioni più prospere. In Toscana si ebbe una produzione di farina di castagna considerevole; mentre prima le popolazioni si nutrivano di castagnaccio e castagne per sopravvivere, col passare del tempo ci furono nuovi impianti e le produzioni divennero copiose e grossi quantitativi furono esportati in Romagna. L'uso del legno come combustibile per le fonderie nel Veneto e le grandi quantità usate per le fondamenta o palafitta delle abitazioni a Venezia ne determinò quasi

la scomparsa, ma una nuova legge del 1756 che imponeva di piantare quattro castagni per ogni campo ne frenò l'uso smodato.

Per la Campania lo scrittore Giuseppe Maria Galanti nel suo libro *“Della descrizione geografica e politica delle Sicilie”* riferiva che alla fine del 1700 le province di Avellino e Benevento abbondavano di castagni, noci e nocelle e che nel Cilento le montagne erano ricoperte da enormi castagneti che erano utili per il legno che si consumava nel Regno e per il frutto. Nelle montagne si allevavano i porci sia per le castagne che per le ghiande di cui erano ghiotti, come pure nella costiera amalfitana era diffuso l'impiego del castagno nella costruzione di imbarcazioni, oltre ai barili esportati in Sicilia e Genova per la conservazione di vino, olio e pesce salato. In Molise vi sono solamente dei castagneti spontanei e il loro frutto è piccolo e insipido. Per la Calabria i castagni sono eccellenti e occupavano i pendii dei monti di Cosenza, Catanzaro e Reggio Calabria. La Sicilia, che nel Medioevo aveva subito una riduzione del manto boschivo, mantenne sui rilievi delle Madonie e dei Peloritani e sulle pendici dell'Etna ampi boschi di conifere, querce e castagni. Le castagne di Paternò sono famose ed è anche nota la lavorazione del legno da parte degli artigiani di Valdemone e dei bottai di Messina. In Sicilia, presso le pendici dell'Etna, nel comune di Sant'Alfio, si trova uno degli alberi più antichi al mondo, denominato *“Castagno dei Cento Cavalli”*, cosiddetto perché sotto la sua chioma trovò riparo da un temporale una leggendaria regina, probabilmente Giovanna moglie di Giovanni II d'Aragona (1397-1479), con tutto il suo seguito a cavallo.

Nel XX secolo la castanicoltura italiana restava ancora un comparto importante, rispetto ad altre specie frutticole, con un ruolo strategico per la sopravvivenza di una larga fascia di popolazione della montagna italiana. La produzione castanicola era destinata sia ai mercati nazionali, europei e d'oltreoceano con prezzi comparabili al frumento [Agnoletti, 2020]. Nella seconda metà del '900 diversi fattori hanno contribuito ad una progressiva crisi della castanicoltura italiana, come lo spopolamento di molte aree interne che si basavano su questa economia. A ciò si sono aggiunti problemi di carattere fitopatologico, come il mal dell'inchiostro e il cancro corticale, che hanno determinato una riduzione delle superfici coltivate. Ai noti insetti parassiti dei frutti (balanino, cidie) si è recentemente affiancato il cinipide galligeno, che danneggia pericolosamente la vegetazione e la fruttificazione delle piante. I dati sull'evoluzione del numero delle aziende agricole e della

superficie investita dal 1970 al 2007 mostrano, infatti, una drastica diminuzione di entrambe le variabili del 51,3% e del 47,5% [Castellotti e Grassi, 2011]. Oggi, l'Italia rimane tra i più importanti attori sul mercato internazionale con esportazioni che provengono principalmente dalla Campania e dal Piemonte [Castellotti, 2010].

Nella frutticoltura moderna, il castagneto assume anche una funzione ecosistemica alla luce dei cambiamenti climatici in atto e dell'utilizzo di tecniche di gestione ecocompatibili derivanti dallo sviluppo tecnologico e scientifico, che consentono di operare in modo responsabile, contribuendo a ridurre al minimo gli impatti negativi sia per l'ambiente che per la salute umana.

Riferimenti bibliografici

- Adua, M. The sweet chestnut throughout history from the Miocene to the third millennium. *Acta Horticulturae* **1999**, 494, 29-36.
- Agnoletti, M. Storia del bosco. Il paesaggio forestale italiano. Edizione Economica Laterza, Bari-Roma, **2020**.
- Aliotta, G.; Petriccione, M. Biodiversità e Agri-Cultura. Aracne Editrice – Roma, **2008** (ISBN 978-88-548-2004-3).
- Beccaro, G.; Bounous, G.; De Biaggi, M.; Donno, D.; Torello Marinoni, D.; Zou, F.; Mellano, M.G. Botany, anatomy and nut composition. In "The Chestnut Handbook". CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 5-34, **2019**.
- Bellini, E. Coltura e cultura del castagno. Una sintesi attraverso suggestive immagini fotografiche. CSDC-Marradi (FI), **2019**.
- Bounous, G.; De Guarda, A. In: Bounous G (ed) Il castagno: coltura, ambiente ed utilizzazioni in Italia e nel mondo. Edagricole, Bologna, 173-176, **2002**.
- Bounous, G. Inquadramento sistematico e distribuzione geografica. In "Il Castagno. Coltura, ambiente ed utilizzazioni in Italia e nel mondo". Ed. Bounous G. Edagricole de il Sole 24 ORE s.r.l., Bologna, 19-28, **2002**.
- Braudel, F. Capitalismo e civiltà materiale, Einaudi, Torino, **1977**.

- Caprese M. Giornata del castagno in collaborazione con la Società Orticola Italiana Firenze, **1979**; p. 275.
- Castellotti, T. Luci ed ombre della castanicoltura italiana nel commercio internazionale. *Agriregionieuropa*, n. **22**, **2010**.
- Castellotti, T.; Grassi, G. Situazione e prospettive della castanicoltura da frutto in Italia. *Agriregionieuropa*, n. **24**, **2011**.
- Cherubini, G. La civiltà del Castagno in Italia alla fine del Medioevo in Id. *L'Italia rurale del basso Medioevo*, Laterza Roma-Bari: 147-171, **1984**.
- Comba, R.; Naso, I. Uomini, boschi e castagne. Incontri nella storia del Piemonte. Soc. Studi Stor. Archeologici ed Artistici della Provincia di Cuneo, **2000**; p. 161.
- Conedera, M.; Krebs, P.; Tinner, W.; Pradella, M.; Torriani, D. The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Vegetation History and Archaeobotany* **2004**, **13**, 161-179.
- Giannini, R.; Paffetti, D. L'impiego del DNA fossile nella filogenesi. Notiziario di informazione a cura dell'Accademia dei Georgofili, **2011**: <https://www.georgofili.info/contenuti/limpiego-del-dna-fossile-nella-filogenesi/258#>
- Krebs, P.; Pezzatti, B.; Conedera, M. L'Italia principale area rifugio del castagno nell'ultima glaciazione. *Italus Hortus* **2019a**, **25**, 185-188.
- Krebs, P.; Pezzatti, G.B.; Beffa, G.; Tinner, W.; Conedera, M. Revising the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) refugia history of the last glacial period with extended pollen and macrofossil evidence. *Quaternary Science Reviews* **2019b**, **206**, 111-128.
- Malossini, F. Gli allevamenti animali nel fondo rustico dell'antica Roma. *Atti Acc. Rov. Agiati* **2011**, ser. IX, vol. I, B: 145-215.
- Manfredi, V. Incontro di popoli in Senofonte. *L'Umana avventura*, **1987**; 56-60.
- Migliozzi, G. La civiltà del castagno. Nell'area vulcanica del Roccamonfina. D'Arco Edizioni, Formia (LT), **2005**; pp. 94.
- Pitte, J.R. *Terres de Castanide, Hommes et paysages du Châtaignier de l'Antiquité à nos jours*. Fayard, Paris, **1986**.

- Targioni-Tozzetti, A. Cenni storici sull'introduzione di varie piante nell'agricoltura e orticoltura toscana. Tipografia Galileiana, Firenze, **1853**; pp. 349.
- Tripodi, B. Il cibo dell'altro: regimi e codici alimentari nell'Anabasi di Senofonte, Dans les pas des Dix-Mille (ed. P. Briant), Pallas, 43/**1995**; 41-58.
- Vitolo, L. Produzione e commercio del vino e delle castagne nella Campania medievale. Cibo, territorio e socialità L'alimentazione nel territorio campano fra vita quotidiana e rappresentazioni, **2017**.
<https://cibocampania.it>

La castanicoltura in Campania: stato di fatto e sviluppi futuri

Marina Maura Calandrelli

Affiliazione

CNR – Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (IRET), Via Pietro Castellino, 111 - 80131 Napoli

Email: marinamaura.calandrelli@cnr.it

Il castagno europeo (*Castanea sativa* Miller) è una delle specie forestali più antiche; già Plinio il Vecchio nella *Naturalis Historia* (77 d.C.) ne elenca e descrive le principali varietà. Nel Medioevo ha fornito nutrimento e materiale da costruzione e combustione alle popolazioni montane. Nei primi anni del '900 è cominciato il suo lento declino a causa dell'aumentata richiesta di cereali e dell'abbandono delle aree montane. Oggi si riscontra una ripresa della coltivazione di castagno non solo per l'uso commestibile dei suoi frutti e per i differenti usi del fusto, ma soprattutto per l'elevato valore ambientale e paesaggistico. Di probabile origine dal Vicino Oriente, *C. sativa* si è largamente diffuso in Europa. L'Italia rappresenta il principale produttore europeo di castagne con il 42% della produzione continentale. Il castagno è distribuito su tutto l'arco alpino e sul versante tirrenico dell'appennino, occupando circa 800.000 ettari di territorio, in maggior parte localizzato in contesti collinari e montani fra 500 e 1.000 m s.l.m. [Manetti et al. 2017].

La sua presenza e diffusione è strettamente legata all'attività umana [Conedera et al. 2004]. Lo sviluppo e diffusione della castanicoltura intensiva ha portato nel corso del tempo a profonde modifiche del paesaggio forestale. Data la ridotta concorrenzialità di questa pianta in un regime di libero dinamismo naturale, l'assenza di una gestione dei castagneti da parte dell'uomo li rende facilmente colonizzabili da altre specie vegetali fino ad evolvere a boschi misti, in seguito al deperimento dei vecchi castagni da frutto [Stanga 2006].

Il cinipide del castagno

A partire dal 2002 il patrimonio castanicolo italiano è stato compromesso dall'attacco di un parassita, il cinipide del castagno, che ha fatto il suo ingresso in provincia di Cuneo [Paparatti e Speranza 2006]. Il cinipide o vespa asiatica del castagno (Asian Chestnut Gall Wasp, ACGW), *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera, Cynipidae), fa parte di una lunga lista di imenotteri alieni invasivi che si sono stabiliti al di fuori del loro areale nativo [Avtzis et al. 2019]. Originario della Cina, per le sue capacità di rapida espansione, insieme ai danni ecologici ed economici arrecati, è uno dei più importanti parassiti del castagno (*Castanea spp.*) in tutto il mondo [EFSA 2010]. In Europa, l'ACGW ha devastato la produzione di castagneti con perdite di resa fino all'80% [Battisti et al. 2014]. La velocità di dispersione a livello di popolazione locale è stimata (utilizzando un modello di dispersione stratificato) inferiore a 7 km/anno [Gilioli et al. 2013] e la dispersione a lungo termine è assistita esclusivamente dall'uomo, con il commercio di materiale vegetale [Graziosi e Santi 2008].

Gravi infestazioni del cinipide, combinate con fattori di stress abiotici (es. siccità) e/o biotici (es. infezioni fungine) degli alberi, possono portare alla mortalità degli esemplari più giovani [Moriya et al. 2003]; ciò è particolarmente preoccupante nei castagneti mediterranei già soggetti ad ulteriori fattori di stress ambientale, quali i cambiamenti delle condizioni climatiche e la siccità estiva [Lieutier e Payne 2016]. Tuttavia, nell'ecosistema castagneto sono state segnalate reazioni positive all'invasione. Alcuni studi hanno accertato la presenza di diversi parassitoidi autoctoni che sono in grado di attaccare le larve della vespa cinese all'interno delle galle [Guerrieri et al. 2010; Santi e Maini 2011], mentre altri studi hanno riscontrato la presenza di funghi colonizzatori sia dei tessuti delle galle sia degli insetti in esse contenuti [Magro et al. 2010; Addario e Turchetti, 2011]. In particolare, un aumento di *Cryphonectria parasitica* (Murill) Barr, un agente fungino invasivo e virulento, noto anche come peronospora, è stato registrato nei popolamenti di castagneti infestati da ACGW [Prospero e Forster 2011].

In Europa, nonostante i tentativi falliti di rilevare la resistenza naturale [Brussino et al. 2002], soltanto l'ibrido euro-giapponese *C. crenata* x *C. sativa* "Bouche de Bétizac" è risultato resistente all'ACGW ed è ora utilizzato

come valida alternativa dai castanicoltori [Dini et al. 2012]. Recentemente, l'ecotipo rosso salernitano di *C. sativa* del sud Italia ha mostrato una moderata tolleranza all'ACGW [Nugnes et al. 2018].

In Italia, sono stati attuati numerosi tentativi per controllare le popolazioni di ACGW poco dopo il loro insediamento, dalle misure agrotecniche (ad es. potatura e combustione di germogli infestati, materiale di propagazione in serra) all'applicazione di insetticidi chimici convenzionali [EFSA 2010]. E' stato sperimentato anche il controllo biologico classico, considerando i nemici naturali negli areali nativi del parassita risultati efficaci per contenere la specie invasiva.

Nel 2005, l'Italia è stato il primo paese europeo a controllare la diffusione dell'ACGW importando dal Giappone galle infestate da *Torymus sinensis* Kamijo, antagonista naturale del cinipide [Quacchia et al. 2008]. Gli studi iniziali nel Nord Italia hanno mostrato una lenta dispersione della popolazione [Bosio et al, 2013], ma solo 9 anni dopo i rilasci del parassitoide, i tassi di infestazione da ACGW sono notevolmente diminuiti [Ferracini et al. 2018], con conseguente riduzione del relativo impatto economico. Nell'Italia settentrionale il livello di parassitizzazione ha superato il 90% [Colombari e Battisti 2016] e dopo 13 anni dal primo rilascio di *T. sinensis* non vi è stata alcuna segnalazione di rinascita del cinipide [Ferracini et al. 2018]. I primi studi successivi all'introduzione del parassitoide hanno dimostrato che il controllo biologico classico di ACGW con *T. sinensis* è un metodo altamente efficiente ed economicamente conveniente per gestire questo parassita invasivo. Paparella et al. [2016] hanno previsto, mediante un modello matematico, nuove ondate di densità sia dell'ospite sia del parassitoide nel tempo, mentre Ferracini et al. [2018] hanno evidenziato alcuni casi di infestazione ricorrente da ACGW seguite da picchi di popolazioni di *T. sinensis*. È quindi importante implementare studi post-rilascio a lungo termine per seguire le dinamiche della popolazione ospite-parassitoide e per valutare le potenziali interazioni di *T. sinensis* con parassitoidi nativi e ospiti non bersaglio [Avtzis et al. 2019].

La coltura del castagno in Campania

Il patrimonio castanicolo in Campania è costituito in massima parte dalla specie *C. sativa*. Nel periodo 1999-2007 (fonte ISTAT) la Campania da sola contribuiva al 42% della produzione castanicola totale nazionale, con 251.277 quintali in media [Manzo & Porcu 2015]. Nel 2008 le aziende del settore hanno superato i 100 milioni di euro di fatturato, con una quota del 40% destinata alle esportazioni, mentre gli addetti che operavano nella filiera erano oltre 2000 (dati INPS) distribuiti in più di 6.000 aziende agricole e circa 30 imprese di trasformazione. Tali valori sono stati fortemente ridimensionati dagli effetti negativi del cinipide, introdotto accidentalmente in Campania nel 2005 attraverso gemme fortemente infestate [Graziosi & Santi 2008].

L'amministrazione regionale della Campania a partire dal 2008 ha emanato una serie di Decreti, recependo le raccomandazioni introdotte dal D.M. 30 ottobre 2007, attraverso cui sono state definite le zone delimitate dall'infestazione. Nel 2009 l'Assessorato regionale all'Agricoltura ha promosso la lotta biologica mediante l'introduzione del *T. sinensis* in oltre 100 castagneti da frutto e cedui opportunamente scelti e monitorati. Nel periodo compreso tra il 2008 e il 2012 l'infestazione si è estesa su gran parte del territorio (**Figura 1**).

Il Consiglio Regionale, riconoscendo l'alto valore economico della coltura del castagno, con la L. R. n. 13 del 21 maggio 2012 ha ritenuto l'infezione da cinipide un'emergenza e ha stanziato risorse per favorirne la lotta. Dopo i lanci del *T. sinensis*, in Campania il territorio ha restituito risultati a macchia di leopardo, a causa della mancata attività di prevenzione e di cura sui castagneti demaniali abbandonati che hanno favorito la propagazione dei focolai del cinipide. La vespa cinese, pur essendo stata contenuta grazie alla lotta biologica, è ancora fortemente presente nel territorio, dato l'elevato numero di galle che ogni anno vengono rinvenute sulle foglie e sui rami delle piante di castagno.

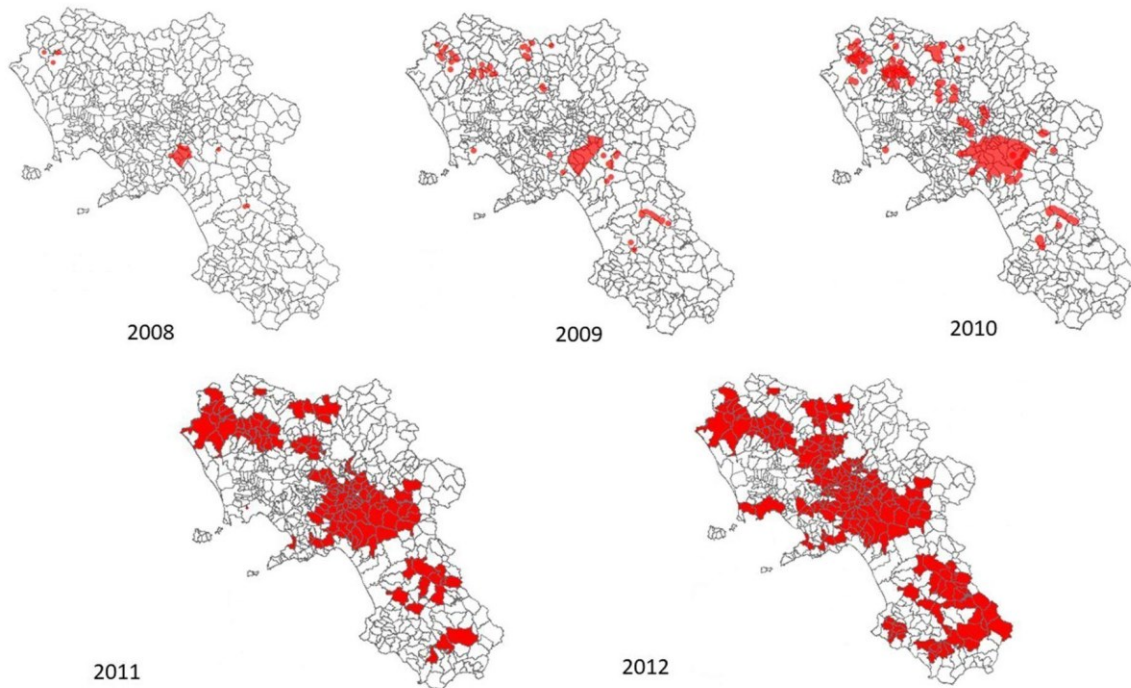


Figura 1 – Diffusione del cinipide galligeno del castagno per gli anni 2008-2012 (elaborazione dati forniti dalla Regione Campania). In rosso le aree colpite dal parassita.

Secondo i dati relativi al 2013, le esportazioni italiane di castagne provengono per il 65% dalla Campania (CREA, Banca dati Commercio estero). Tuttavia, le esportazioni di questa regione mostrano un trend decrescente nel triennio 2012-2014, passando da poco più di 10.000 tonnellate a quasi 8.000 (-24,5%) mentre le importazioni sono passate da poco più di 2.000 tonnellate a circa 15.000 tonnellate [Castellotti 2016].

Gli attuali cali produttivi sono connessi anche ai cambiamenti climatici, così come è emerso dal quarto incontro dei rappresentanti europei del settore castanicolo (Bologna, settembre 2013).

Il MiPAAF con il D. M. del 25 agosto 2015 ha abrogato il DM 30 ottobre 2007 “in quanto le misure indicate per impedirne la diffusione non hanno impedito al *D. kuriphilus* di diffondersi ampiamente nel territorio della Repubblica italiana favorevole al suo insediamento”, nonostante si sia raggiunto un livello di parassitizzazione del 40% [Manzo & Porcu 2015]. Nel 2016, nell’ambito del Programma di Sviluppo Rurale (PSR 2014-2020), la Coldiretti ha chiesto alla Regione di attivare misure per favorire sia gli investimenti agronomici sia il ripristino del potenziale agricolo danneggiato delle aziende castanicole. Particolarmente lesa risulta la filiera produttiva nell’alto casertano, considerata una tra le più importanti d’Europa per volumi, per potenziale produttivo, per qualità e produzione lorda vendibile, che ha registrato un calo medio del 90% della produzione per gli anni 2012, 2014 e 2016.

Con la modifica alla legge regionale 11/96, introdotta con il Collegato alla legge di Stabilità 2017, la crisi della castanicoltura in Campania si avvia verso una svolta; infatti tale norma considera questo tipo di coltivazione un vero e proprio frutteto, conciliando la funzione produttiva dei castagneti con la molteplicità dei servizi ecosistemici. In particolare la norma individua un castagneto quale frutteto quando si tratta “*di un impianto specializzato per la produzione di frutti, castagne o marroni, costituito da una prevalente o esclusiva presenza di piante delle specie C. sativa, C. crenata e relativi ibridi, innestate per almeno il 70% dei soggetti arborei presenti, oppure in numero di almeno 70 piante di castagno innestate per ettaro, con sesto regolare o naturaliforme, sottoposto a cure colturali*”. Nel 2017 la produzione regionale dei castagneti si attesta in media al 20-30% di quella potenziale, ma risulta colpita per il 40% da patologie fungine che determinano un deprezzamento dei frutti italiani sul mercato, ancora a vantaggio di produzioni estere.

Il rilancio della coltivazione del castagno in Campania dipende fortemente da due fattori: l’introduzione di pratiche agronomiche tese a ridurre fenomeni di degrado di carattere vegetativo e produttivo conseguenti alle calamità naturali derivanti dai cambiamenti climatici e il conseguente rischio fitosanitario; l’adozione di innovazioni scientifiche e tecnologiche nelle aziende per migliorare la competitività del prodotto sui mercati.

Monitoraggio e variabilità genetica del castagno

Il monitoraggio degli ambienti agroforestali ha ricevuto un notevole impulso grazie allo sviluppo e alla diffusione di sistemi integrati di analisi che rendono possibile la gestione e l'interpretazione di elevate quantità di dati. Tra questi, l'uso combinato del telerilevamento al sistema informativo geografico (GIS), consente di mappare e modellizzare la distribuzione delle specie invasive [Joshi et al. 2004] e analizzare le variazioni spazio-temporali delle popolazioni di organismi nocivi e i loro effetti sull'economia e la salute delle piante. Le metodologie GIS possono essere rilevanti per la modellazione e la previsione di nuove aree di coltivazione e per l'implementazione della produzione del castagno da frutto e da legno, per la protezione ecologica o per il ripristino agroforestale [Rodrigues et al. 2021]. In particolare, il GIS ha contribuito significativamente a gestire e integrare dati molecolari e spaziali per la gestione e la conservazione delle risorse genetiche nelle specie arboree forestali [Chiocchini et al. 2016]. Le attività di ricerca svolte nell'ultimo decennio sul germoplasma castanicolo hanno permesso di identificare con una precisione senza precedenti le risorse genetiche disponibili e di individuare il materiale genetico adattabile alle diverse necessità territoriali e di coltivazione, con lo scopo di migliorare le piante dal punto di vista produttivo e di adattamento [Nunziata et al. 2020]. Gli ultimi sviluppi della genetica e la possibilità di utilizzare diversi marcatori molecolari per studi ecologici, aprono nuove prospettive per la comprensione del flusso genico associato all'origine della coltivazione del castagno in Europa [Conedera et al. 2004]. Recenti studi hanno portato alla creazione di paesaggi genetici per visualizzare la distribuzione della diversità genetica nello spazio geografico [Miller et al. 2006]. Nel 2010 Perry e colleghi hanno realizzato un toolbox di genetica del paesaggio per il software ArcGIS di Esri utile per mappare paesaggi genetici di una o più specie, come superfici medie e di varianza. Tale strumento utilizza database contenenti informazioni sulla distanza geografica e sulla diversità genetica, insieme alle coordinate della posizione del singolo campione (**Figura 2**).

L'uso integrato di tali strumenti permette di valutare le caratteristiche del paesaggio associate a modelli di diversità genetica con lo scopo di ottenere informazioni utili per la tutela e la gestione delle varietà tradizionalmente coltivate e a rischio di erosione genetica.

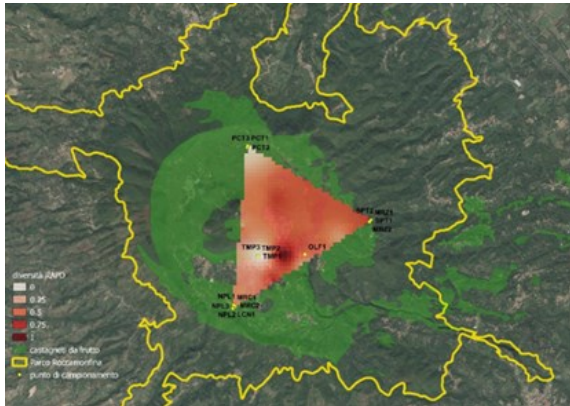


Figura 2 – Paesaggio genetico sulla distribuzione della variabilità molecolare nello spazio geografico del Parco del vulcano spento di Roccamonfina (CE).

Sviluppi futuri e adattamento del castagno al cambiamento climatico

Gli attuali boschi di castagno sono il risultato di una gestione antropica relativamente intensiva praticata a lungo termine, che ha esteso e parzialmente oscurato l'areale ecologico naturale e l'autoecologia della specie. I numerosi sforzi attuati per garantire la conservazione dei paesaggi boschivi sono messi oggi in discussione dalle proiezioni climatiche che suggeriscono una sostanziale ristrutturazione della vegetazione e dei regimi di disturbo in un recente futuro [Whitlock et al. 2017]. Il ripristino dei boschi a uno stato precedente potrebbe essere inadeguato per affrontare i rapidi cambiamenti climatici e le nuove condizioni ambientali che ci attendono. Sono ancora scarse le conoscenze sulla competitività e l'idoneità del castagno per le condizioni future [Conedera et al. 2021].

Sebbene studi recenti abbiano evidenziato la scarsa competitività del castagno quando è sottoposto a successione post-culturale in castagneti abbandonati [Conedera et al. 2001; Pezzi et al. 2011] e per la sensibilità alla siccità estiva [Conedera et al. 2009], sono necessarie conoscenze più dettagliate sulla specie per valutare l'idoneità a ripopolare le foreste del prossimo futuro.

L'ampia gamma di fattori che influenzano la gestione dei castagneti è correlata principalmente a variabili associate al clima, alla topografia, al suolo e alla vegetazione naturale. Tali fattori non sono direttamente controllabili da azioni antropiche, pertanto una gestione agroforestale dei castagneti dovrebbe essere intrapresa per ottimizzarne l'impatto e massimizzare la sostenibilità a lungo termine [Rodrigues et al. 2021]. E' ampiamente riportato in letteratura che i fattori ambientali e il loro impatto sulla gestione forestale hanno una grossa rilevanza per il potenziale produttivo dei castagneti. Le migliori condizioni climatiche per queste coltivazioni sono, in sintesi, quelle senza significativi rischi di gelo, in ambienti ombreggiati e freschi, con precipitazioni annue comprese tra 600 mm e 1500 mm, con periodi di luce solare annuale compresi tra 2400 h e 2600 h, con temperature medie annue comprese tra 8 °C e 15 °C e media massima a lungo termine delle temperature massime annuali di circa 27 °C. Il castagno predilige terreni sedimentari o silicei il cui drenaggio è una condizione necessaria poiché il castagno è sensibile ai ristagni idrici e pertanto occorre che il suolo sia sufficientemente profondo da dare la necessaria fertilità e fornire il fabbisogno idrico nelle estati secche [Raimundo et al. 2015]. I calcoli dei tassi di sopravvivenza degli individui di castagno in ambienti mediterranei sono problematici a causa di alcuni fattori avversi quali incendi, competitività con specie tardive, pressione del pascolo da capre o ripetuti attacchi di parassiti, come il cinipide (*D. kuriphilus*) [Avtzis et al. 2019]. Fatta luce su quanti e quali fattori biotici e abiotici possono influire sulla sopravvivenza delle varietà di *C. sativa* è indispensabile comprendere se il ritmo e l'entità dei cambiamenti climatici previsti supereranno la capacità di adattamento della specie. Uno studio condotto da Conedera et al. [2021], che si pone l'obiettivo di comprendere se il castagno riuscirà a sopravvivere al cambiamento globale, mette in risalto le seguenti conclusioni:

- ✓ Sotto la concorrenza naturale, il castagno si comporta in modo simile alle specie arboree che richiedono luce;
- ✓ Le specie tardive in competizione aumentano la mortalità dei castagni;
- ✓ La siccità estiva aumenta la mortalità dei castagni;
- ✓ Il grave danno da *D. kuriphilus* aumenta notevolmente il rischio di mortalità;
- ✓ Il castagno è molto sensibile all'assenza di interventi selvicolturali.

- Bonsignore, C.P. & Bernardo, U. Effects of environmental parameters on the chestnut gall wasp and its complex of indigenous parasitoids. *Sci. Nat.* **2018**, 105: 20, 14 pp. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00114-018-1545-1>
- Bosio, G.; Armando, M.; Moriya, S. Verso il controllo biologico del cinipide del castagno. *L'Informatore Agrario*. **2013**, 69(14):60–64.
- Brussino, G.; Bosio, G.; Baudino, M.; Giordano, R.; Ramello, F.; & Melika, G. Dangerous exotic insect for the European chestnut. *Informat. Agrario*. **2002**, 58: 59–61.
- Castellotti, T. Struttura, produzione e commercio estero della castanicoltura da frutto italiana, in “*La castanicoltura da frutto in Italia*” a cura di Castellotti T. e Doria P., **2016**, cap. 1, 9-21, CREA, Roma.
- Chiocchini, F.; Mattioni, C.; Pollegioni, P.; Lusini, I.; Martín, M.A.; Cherubini, M.; Lauteri, M. and Villani, F. Mapping the Genetic Diversity of *Castanea sativa*: Exploiting Spatial Analysis for Biogeography and Conservation Studies. *Journal of Geographic Information System*. **2016**, 8, 248-259. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/jgis.2016.82022>
- Colombari, F.; Battisti, A. Native and introduced parasitoids in the biocontrol of *Dryocosmus kuriphilus* in Veneto (Italy). *Bull OEPP*. **2016**, 46:275–285. DOI: <https://doi.org/10.1111/epp.12297>
- Conedera, M.; Stanga, P.; Oester, B.; Bachmann, P. Different post-culture dynamics in abandoned chestnut orchards and coppices *Forest Snow Landscape Res.* **2001**, 76, pp. 487-492
- Conedera, M.; Krebs, P.; Tinner, W. et al. The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Veget Hist Archaeobot.* **2004**, 13, 161–179. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00334-004-0038-7>
- Conedera, M.; Barthold, F.; Torriani, D.; Pezzatti, G. Drought sensitivity of *Castanea sativa*: case study of summer 2003 in the Southern Alps I European Congress on Chestnut-Castanea. **2009** (866), pp. 297-302. DOI: [10.17660/ActaHortic.2010.866.36](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.866.36)
- Conedera, M.; Krebs, P.; Gehring, E.; Wunder, J.; Hülsmann, L.; Abegg, M.; Maringer, J. How future-proof is Sweet chestnut (*Castanea sativa*) in a global change context? *Forest Ecology and Management*. **2021**, Volume 494, 119320. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119320>

- Dini, F.; Sartor, C.; Botta, R. Detection of a hypersensitive reaction in the chestnut hybrid “Bouche de Bétizac” infested by *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu. *Plant Physiol Biochem.* **2012**, 60:67–73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.023>
- EFSA. Risk assessment of the oriental chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* for the EU territory on request from the European Commission. EFSA. **2010** J 8:1619.
- Ferracini, C.; Ferrari, E.; Pontini, M.; Nova, LKH.; Saladini, MA.; Alma, A. Post-release evaluation of non-target effects of *Torymus sinensis*, the biological control agent of *Dryocosmus kuriphilus* in Italy. *Biocontrol.* **2017**, 62:445–456. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9803-2>
- Ferracini, C.; Ferrari, E.; Pontini, M.; Saladini, M. A.; & Alma, A. Effectiveness of *Torymus sinensis*: a successful long-term control of the Asian chestnut gall wasp in Italy. *Journal of Pest Science.* **2019**, 92(1), 353-359. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0989-6>
- Gilioli, G.; Pasquali, S.; Tramontini, S.; Riolo, F. Modelling local and long-distance dispersal of invasive chestnut gall wasp in Europe. *Ecol Model.* **2013**, 263:281–290. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2013.05.011>
- Graziosi, I.; Santi, F. Chestnut gall wasp (*Dryocosmus kuriphilus*): spreading in Italy and new records in Bologna province. *Bull Insectol.* **2008**, 61:343–348.
- Guerrieri, E.; Bernardo, U.; Iodice, L.; Gebiola, M. Morphobio-molecular characterization of autochthonous parasitoids of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu in Campania. *Atti della Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Rendiconti.* **2010**, 58:115-120
- ISTAT [URL: http://dati.istat.it/index.aspx?queryid=31592#](http://dati.istat.it/index.aspx?queryid=31592#) (accesso del 21/9/2021)
- Lieutier, F.; Payne, TD. Responses of mediterranean forest phytophagous insects to climate change. In: Paine T, Lieutier F (eds) *Insects and diseases of mediterranean forest systems*. Springer, **2016**, Cham. DOI: [10.1007/978-3-319-24744-1_28](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24744-1_28)
- Magro, P.; Speranza, S.; Stacchiotti, M.; Martignoni, D.; Paparatti, B. *Gnomoniopsis* associated with necrosis of leaves and chestnut galls induced by *Dryocosmus kuriphilus*. *New Disease Reports.* **2011**, 21, 15. DOI: [10.1111/j.1365-3059.2010.02336.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02336.x)

- Manetti, MC. Atti del 46° Corso di Cultura in Ecologia “Gestione multifunzionale e sostenibile dei boschi cedui: criticità e prospettive”, Centro Studi per l'Ambiente Alpino, **2010**, 119-134
- Manetti, MC.; Becagli, C.; Carbon, F.; Corona, P.; Giannini, T.; Romano, R.; Pelleri, F. Linee guida per la selvicoltura dei cedui di castagno. Rete Rurale Nazionale, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Roma, **2017**, pp. 52, ISBN: 9788899595579
- Manzo, A.; Porcu, F. Relazione conclusiva sui risultati della strategia nazionale nella lotta al Cinipide galligeno (*Dryocosmus kuriphilus*) attraverso il suo antagonista (*Torymus sinensis*), MiPAAF, **2015**, www.politicheagricole.it
- Miller, MP.; Bellinger, MR.; Forsman, ED.; Haig, SM. Effects of historical climate change, habitat connectivity, and vicariance on genetic structure and diversity across the range of the red tree vole (*Phenacomys longicaudus*) in the Pacific Northwestern United States. *Molecular Ecology*. **2006**, 15, 145–159. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02765.x>
- Moriya, S.; Shiga, M.; Adachi, I. Classical biological control of the chestnut gall wasp in Japan. In: Van Driesche RG (eds) Proceedings of the 1st international symposium on biological control of arthropods. USDA Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team, Washington, **2003**, pp 407–415.
- Muster, S.; Elsenbeer, H.; Conedera, M. Small-scale effects of historical land use and topography on post-cultural tree species composition in an Alpine valley in southern Switzerland *Landscape Ecol.* **2007**, 22, pp. 1187-1199. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10980-007-9099-1>
- Nugno, F.; Gualtieri, L.; Bonsignore, CP.; Parillo, R.; Annarumma, R.; Griffò, R.; Bernardo, U. Resistance of a local ecotype of *Castanea sativa* to *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae) in Southern Italy. *Forests*. **2018**, 9(2):94. DOI: <https://doi.org/10.3390/f9020094>
- Nunziata, A.; Petriccione, M.; Di Pippo, F.; Laratta, B.; De Masi, L. L'identità genetica delle cultivar di castagno nella Regione Campania: il progetto CASTARRAY. Atti del Convegno CASTANEA 2019, 11-14 Giugno **2019**, Pergine Valsugana (TN)
- Paparella, F.; Ferracini, C.; Portaluri, A.; Manzo, A.; Alma, A. Biological control of the chestnut gall wasp with *T. sinensis*: a mathematical model. *Ecological Modelling* **2016**, 338, 17-36, <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2016.07.023>

- Pezzi, G.; Maresi, G.; Conedera, M.; Ferrari, C. Woody species composition of chestnut stands in the Northern Apennines: the result of 200 years of changes in land use *Landscape Ecol.* **2011**, 26, pp. 1463-1476. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10980-011-9661-8>
- Paparatti, B.; Speranza, S. Prima segnalazione del cinipide galligeno del castagno (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu) in Italia centrale, **2006**, pp. 214-215. In: Atti del IV Convegno Nazionale Castagno, 2005, Parretti, Firenze, Italy
- Prospero, S.; Forster, B. Chestnut gall wasp (*Dryocosmus kuriphilus*) infestations: new opportunities for the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*? *New Dis Rep.* **2011**, 23:35. DOI: [doi:10.5197/j.2044-0588.2011.023.035](https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2011.023.035)
- Quacchia, A.; Moriya, S.; Bosio, G.; Scapin, I.; Alma, A. Rearing, release and settlement prospect in Italy of *Torymus sinensis*, the biological control agent of the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. *Biol Control.* **2008**, 53:829–839. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9139-4>
- Raimundo, F.; Coutinho, J.; Martins, A.; Madeira, M. Soil management system effects on N availability and productivity in chestnut plants under Mediterranean conditions. *Rev. Ciências Agrárias.* **2015**, 38. DOI: <https://doi.org/10.19084/RCA15139>
- Santi, F.; Maini, S. New association between *Dryocosmus kuriphilus* and *Torymus flavipes* in chestnut trees in the Bologna area (Italy): first results. *Bulletin of insectology.* **2011**, 64, pp. 275:278. ISSN 1721-8861
- Stanga P. Dinamismo evolutivo dei castagneti abbandonati, *Forestaviva.* **2006**, 39, 10-11.
- Turchetti, T.; Pennacchio, F.; D'Acqui, LP.; Maresi, G.; Pedrazzoli, F. Practices to manage chestnut orchards infested by the Chinese gall wasp. *Forest@ - Journal of Silviculture and Forest Ecology.* **2012**, 9, 227-235. DOI: [10.3832/efor.0701-009](https://doi.org/10.3832/efor.0701-009)
- Whitlock, C.; Colombaroli, D.; Conedera, M.; Tinner, W. Land-use history as a guide for forest conservation and management. *Conservation Biology.* **2018**, 32(1), pp. 84–97. DOI: <https://doi.org/10.1111/cobi.12960>

Profili genetico-molecolari per l'identificazione varietale del castagno

Luigi De Masi

Affiliazione

CNR – Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Bioscienze e Biorisorse (IBBR), Via Università, 133 - 80055 Portici
Email: luigi.demasi@ibbr.cnr.it

Il castagno appartiene al genere botanico *Castanea*, formato fino a 13 specie diverse, della famiglia *Fagaceae*, che include altri sette generi tra cui i noti *Fagus* e *Quercus* [Mellano et al. 2012]. Nel corso della storia, eventi naturali come le glaciazioni e i più relativamente recenti fattori antropici hanno influenzato significativamente la dispersione del castagno nel mondo, come evidenziato da dati palinologici e paleobotanici a riguardo [Roces-Díaz et al. 2018]. Fino ad arrivare a oggi, con quattro specie botaniche più largamente coltivate nelle aree temperate dell'emisfero settentrionale, distribuite nei tre continenti America, Asia, Europa e Paesi del Mediterraneo: castagno americano (*Castanea dentata* Borkh.), castagno cinese (*Castanea mollissima* Bl.), castagno giapponese (*Castanea crenata* Sieb. & Zucc.), e castagno europeo (*Castanea sativa* Mill.). Quest'ultima in particolare è la sola specie nativa del continente europeo che forma ecosistemi agroforestali di enorme rilevanza, fornendo fin dall'antichità importanti servizi ecosistemici (qualità dell'aria e dell'acqua, mitigazione climatica, resilienza, biodiversità, paesaggio, protezione del territorio etc.), insieme a risorse primarie (castagne, legno, tannini, fibre, biomassa etc.) e secondarie (miele, funghi etc.). Le sue castagne sono da sempre un prodotto tipico della dieta Mediterranea, rappresentando un'eccellente fonte di carboidrati complessi, come amido privo di glutine, fibre alimentari, vitamine (A, gruppo B, C ed E), minerali (fosforo, potassio, calcio e magnesio), acidi fenolici (acido gallico), e polifenoli (acido ellagico) [de Vasconcelos et al. 2010, Sharifi-Rad et al. 2022]. Inoltre, seppur in minore misura, contengono carboidrati semplici (saccarosio), acidi grassi, alcuni amminoacidi essenziali e non essenziali, e loro interessanti composti derivati [de

Vasconcelos et al. 2010, Servillo et al. 2016]. Il castagno è stato utilizzato nei tempi antichi anche come pianta medicinale, mentre solo in tempi più recenti è stata scoperta la presenza di composti naturali con importanti attività biologiche, anche nelle foglie e nelle parti non edibili del frutto, che fino a poco tempo fa rappresentavano solo degli scarti [Vella et al. 2019]. Questa biomassa, solo in parte valorizzata, è particolarmente idonea per il recupero di molecole bioattive da utilizzare come ingredienti funzionali nell'industria nutraceutica, farmaceutica e cosmetica. Per massimizzare i benefici sulla salute della popolazione ottenibili dal consumo delle castagne, è importante che ciascuna varietà tradizionale sia precisamente localizzata sul territorio e sia caratterizzata dal punto di vista nutrizionale-salutistico e attraverso moderni sistemi di identificazione genetica che ne possano certificare la varietà di appartenenza [Nunziata et al. 2020, Calandrelli et al. 2021]. Difatti, l'esteso utilizzo della propagazione vegetativa nella pratica agronomica ha portato a generare errori di classificazione varietale, quando ad esempio una nuova denominazione veniva data a un clone di castagno che era stato spostato dal suo areale d'origine in un'area differente (sinonimie) oppure quando il nome di una cultivar locale era attribuito a un nuovo clone importato (omonimie) sulla base di somiglianze esteriori. Di conseguenza, da questo punto di vista, è necessario identificare in maniera certa e univoca i genotipi di castagno di interesse per associarli correttamente alla loro composizione in bioattivi.

Il nostro Paese è tra i principali produttori mondiali di castagne di qualità, grazie soprattutto alla Campania (Dati FAOSTAT 2020). La stessa Regione vanta anche una tradizione antichissima in castanicoltura ed oggi rappresenta un'importante riserva di germoplasma castanicolo [Grassi 2006]. La caratterizzazione di queste risorse genetiche e la conoscenza delle relazioni genetiche tra le varietà locali sono necessarie per preservare l'agrobiodiversità castanicola dall'erosione genetica [Nunziata et al. 2020]. L'ampia diversità delle risorse genetiche del castagno rappresenta il punto di partenza per il miglioramento varietale combinando metodiche tradizionali e tecnologie innovative per identificare nuovi tratti di interesse ed aumentare la produttività e il valore nutrizionale del frutto. Le conoscenze scientifiche accumulate fino ad oggi offrono un'importante opportunità per sviluppare genotipi superiori di castagno attraverso programmi di miglioramento genetico tradizionale col fine di rinnovare le piantagioni esistenti.

Purtroppo, a dispetto della sua importanza, dagli ultimi decenni la coltivazione del castagno è in progressivo declino a causa di infezioni e infestazioni, anche associate all'introduzione accidentale di specie aliene [Nicoletti et al. 2021]. Queste avversità hanno seriamente decimato estese coltivazioni, mettendo a rischio di

estinzione molte delle varietà locali più pregiate [Mellano et al. 2012], un patrimonio unico tutelato anche da marchi nazionali ed europei. Un qualsiasi tentativo di rilancio della castanicoltura, per essere efficace, non può prescindere dal garantire l'identità genetica del materiale di propagazione da impiegare nei nuovi impianti. La rintracciabilità della reale identità genetica di cultivar locali, tra loro molto simili soprattutto nelle prime fasi di sviluppo, potrà consentire una maggiore sicurezza in tali investimenti. Inoltre, la caratterizzazione e la corretta catalogazione delle risorse castanicole dovranno essere disponibili agli *stakeholder* per una tutela mirata e un utilizzo efficace del patrimonio castanicolo, così come per contrastare il commercio fraudolento. L'auspicabile ripristino di questo rilevante comparto della Campania, solo in tempi più recenti considerato quanto realmente merita, potrà inoltre favorire una gestione agro-forestale sostenibile con immensi benefici in termini di qualità della vita.

L'identificazione genetica si realizza mediante l'analisi delle molecole di DNA

Nella prima metà del Novecento, una serie di esperimenti fondamentali di biologia molecolare ha consentito di dimostrare che il materiale ereditario che gli esseri viventi si tramandano attraverso le generazioni è costituito da molecole di DNA. A distanza di poco tempo venne determinata anche la struttura molecolare del DNA, la oramai nota "doppia elica", che consiste in due catene di verso opposto (antiparallele) legate chimicamente dalla complementarità delle quattro basi azotate costituenti: adenina +timina (A+T) e citosina+guanina (C+G). La struttura a doppia elica svelò anche il segreto dell'ereditarietà: il DNA può essere aperto, come una cerniera, consentendo la replicazione dell'informazione genetica, racchiusa nella sequenza ordinata delle basi azotate che ciascuna cellula trasmette alle cellule della propria discendenza. Tali scoperte, che hanno enormemente cambiato il nostro modo di concepire la vita e la sua evoluzione, furono insignite del premio Nobel nel 1962, dopo essere state pubblicate il 25 aprile del 1953 in tre articoli successivi sulla rivista scientifica *Nature* [Wilkins 2013]. Nel 1993, dopo 40 anni da questi importanti eventi storico-scientifici, Kary B. Mullis ottenne il premio Nobel per una delle più importanti invenzioni della biologia molecolare: la reazione a catena della polimerasi, più brevemente nota con l'acronimo "PCR" dall'inglese "*Polymerase Chain Reaction*" [Mullis e Faloona 1987]. L'amplificazione in laboratorio di determinate regioni di DNA attraverso la PCR, in modo relativamente semplice e rapido, si è subito diffusa come metodica estremamente selettiva e

sensibile, tanto che oggi è divenuta indispensabile in una varietà di applicazioni scientifiche che hanno portato ad una enorme accelerazione degli studi su tutti gli esseri viventi. In tal modo, attraverso sequenze di DNA specie- o varietà-specifiche, è possibile ad esempio certificare la specie botanica e la cultivar di appartenenza per semi e piantine che si desiderano utilizzare per una nuova piantagione.

Gli esseri viventi conservano e trasportano le informazioni codificate relative al loro patrimonio genetico nel proprio DNA, che è pertanto una macromolecola informazionale indispensabile per i processi vitali e per la generazione della discendenza. Il patrimonio genetico di un determinato organismo coincide quindi con la sequenza completa delle basi del DNA presente in ciascuna delle sue cellule nucleate ed è denominato genoma (**Figura 1**). La natura chimica delle molecole di DNA è tale che esse possono tollerare limitati cambiamenti (mutazioni) nelle informazioni genetiche che custodiscono. I principali meccanismi evolutivi (selezione naturale e/o deriva genetica) hanno consentito di fissare queste mutazioni nelle popolazioni e di portare alla creazione dell'ampia diversità genetica di specie e varietà vegetali oggi esistenti (biodiversità vegetale). I polimorfismi sono particolari mutazioni del DNA presenti con almeno l'1% di frequenza degli individui nella popolazione. All'interno delle popolazioni, la conoscenza dettagliata dei polimorfismi genetici, che sono la base molecolare della variabilità fenotipica, è essenziale per comprendere come le piante si evolvono e rispondono ai cambiamenti ambientali e alle nuove malattie, permettendo la creazione di nuove varietà coltivate (cultivar) migliorate nei tratti di interesse per caratteristiche produttive e qualitative superiori. I polimorfismi genetici consentono inoltre di tracciare la storia delle popolazioni, delle varietà e delle specie dai loro progenitori comuni. In genetica, un marcatore molecolare è una sequenza di DNA localizzata in una particolare regione del genoma. Le metodiche di analisi di biologia molecolare consentono di identificare uno specifico marcatore genetico-molecolare (e la sua sequenza di DNA) con le sue varianti polimorfiche in una popolazione. La caratterizzazione molecolare consiste propriamente nell'utilizzo dei marcatori genetico-molecolari basati sul DNA per determinare le caratteristiche genetiche di ciascun organismo in una popolazione e per tracciare le relazioni di parentela tra gli individui, anche lungo le generazioni precedenti fino alle loro origini.

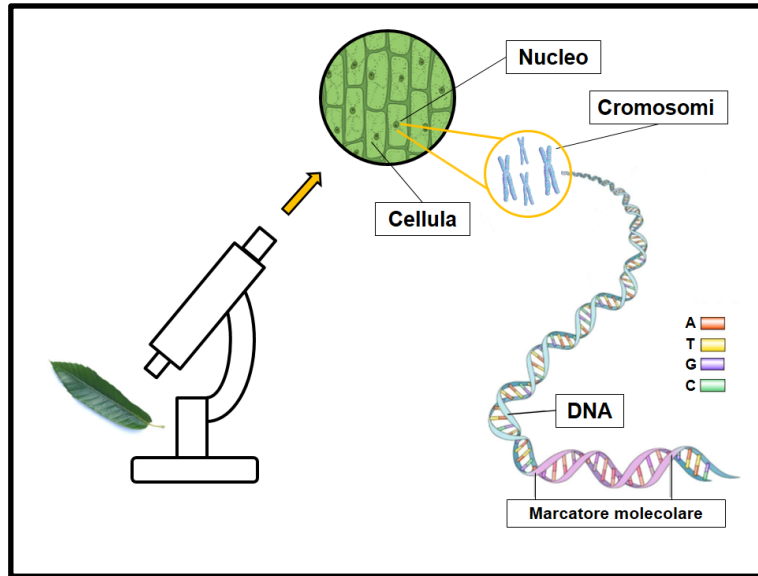


Figura 1 – Le variazioni nella sequenza del DNA genomico (polimorfismi) del castagno consentono la discriminazione varietale attraverso i marcatori molecolari.

Le tecnologie di biologia molecolare basate sulla PCR per l'amplificazione del DNA hanno consentito di effettuare analisi genetico-molecolari per la determinazione della variabilità genetica esistente a livello di DNA tra unità tassonomiche di numerose specie vegetali, incluso il castagno. Col fine di valutare la diversità genetica presente tra varietà strettamente correlate, le molecole di DNA del castagno sono state l'oggetto dell'analisi attraverso numerosi marcatori genetico-molecolari. Questi rappresentano infatti un insostituibile strumento d'indagine che consente di valutare la diversità genetica a livello molecolare essendo indipendenti dall'effetto confondente dovuto alle condizioni ambientali e di crescita della pianta. Nella pratica, un marcatore genetico-molecolare corrisponde esattamente ad una determinata regione di DNA compresa tra due tratti nucleotidici di sequenza nota in basi, localizzati rispettivamente a monte e a valle del marcatore. La

sequenza centrale può essere o meno nota a seconda della tipologia di marcatore. Una definizione più operativa di marcatore genetico-molecolare si riferisce ad una regione (*locus*) del genoma che si caratterizza in modo specifico tramite la sequenza di basi con la quale si identifica e che è rilevabile in maniera inequivocabile mediante sonde molecolari (*probe*) o inneschi (*primer*). I marcatori molecolari utilizzabili per rilevare le differenze nella sequenza di basi (polimorfismi) del DNA genomico sono numerosi e costituiscono strumenti di indagine estremamente efficaci, affidabili ed oggettivi che trovano larga applicazione sia nella ricerca di base sia in quella applicata. Tra i più noti e consolidati marcatori genetico-molecolari basati sulla PCR utilizzati per gli organismi vegetali, si possono citare senza dubbio AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), e SSR (*Simple Sequence Repeats*, conosciuti anche come microsatelliti) [Karp et al. 1996]. A questi, più di recente, si sono aggiunti i polimorfismi a singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP), considerati i marcatori genetico-molecolari del futuro in quanto consentono di raggiungere il limite di risoluzione della singola base nucleotidica intrinseco alla sequenza del DNA [Nunziata et al. 2020]. Tutti questi marcatori genetico-molecolari hanno numerosi vantaggi rispetto alle metodologie tradizionali di identificazione, in quanto mostrano un elevato potere discriminante grazie a selettività, sensibilità, rapidità operativa, e non necessitano di elevate quantità di materiale di partenza. I marcatori molecolari consentono un'efficace differenziazione di individui geneticamente distinti, ma che sono fenotipicamente molto simili tra loro e quasi indistinguibili esteriormente; inoltre, sono particolarmente adatti nel rivelare polimorfismi genetici a livello varietale nelle piante. L'introduzione dei marcatori nel campo dell'identificazione varietale ha suscitato un grande interesse e il numero di specie studiate a tutt'oggi con queste tecniche è considerevolmente elevato. Nei laboratori di biologia molecolare, l'identificazione delle varianti genetiche è eseguita con tecniche che si basano sulla complementarietà degli acidi nucleici (ibridazione) e sulla successiva amplificazione enzimatica di frammenti di DNA mediante PCR (ved. **Scheda**). I marcatori molecolari accertano le variazioni tra genotipi diversi identificando differenze nelle sequenze di basi che costituiscono il DNA genomico; questi marcatori, quindi, non essendo influenzati dall'ambiente, forniscono una impronta molecolare delle varietà (DNA fingerprint).

SCHEDA DI APPROFONDIMENTO

La PCR è alla base delle moderne tecnologie di biologia molecolare

*Nella cellula, il DNA si replica in maniera semiconservativa, cioè i due filamenti che formano la doppia elica del DNA parentale si separano longitudinalmente e ciascuno di essi, indipendentemente dall'altro, viene utilizzato come stampo per la formazione di un nuovo filamento complementare a quello preesistente. Il risultato di questo processo complesso e altamente regolato è la formazione di due molecole figlie di DNA a doppia elica, identiche tra loro e ciascuna composta da un filamento di DNA parentale e da un filamento complementare di nuova sintesi. L'enzima DNA polimerasi è responsabile della sintesi dei nuovi filamenti (polimerizzazione) a partire dai precursori nucleotidici delle basi azotate (dNTP): adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T). La DNA polimerasi può conservare la sua funzionalità anche in provetta (in vitro) al di fuori della cellula e può quindi essere utilizzata in laboratorio per sintetizzare nuove molecole di DNA tramite la PCR (**Figura 2**). Un sistema di sintesi enzimatica in vitro che permette di generare specifiche sequenze di DNA a partire anche da una singola molecola di DNA di partenza come stampo (template). I template sono filamenti singoli che possono essere ottenuti semplicemente riscaldando il DNA a temperature prossime all'ebollizione. La reazione utilizza due inneschi (primer), formati da oligonucleotidi (oligo) di sintesi, che si legano specificamente (annealing) con le sequenze a loro complementari situate all'estremità 3' di ciascuno dei due filamenti di DNA della sequenza bersaglio. La DNA polimerasi determina l'allungamento dei due primer appaiati utilizzando i quattro precursori (dNTP), in modo tale che nei filamenti di DNA di nuova sintesi siano presenti ancora i siti per l'appaiamento dei primer. La PCR consente così di generare, ed allo stesso tempo di amplificare in numero, specifici frammenti di DNA, denominati ampliconi, anche a partire da una singola molecola di DNA stampo di partenza attraverso una sintesi enzimatica in vitro. La PCR è una reazione ciclica, ripetuta in genere tra 25-40 cicli, ciascuno costituito da tre fasi, realizzate su apparecchiature dedicate denominate termociclatori (DNA Thermal Cycler) che permettono di programmare temperatura e durata di ciascuna fase: (i) denaturazione termica del DNA stampo, in cui il DNA "fonde" (melting) attraverso la separazione dei due filamenti della doppia elica; (ii) appaiamento complementare (annealing) dei primer al DNA stampo; (iii) nuova sintesi del DNA condotta dalla DNA polimerasi a partire dai primer appaiati. La PCR fornisce come risultato un accumulo esponenziale di ampliconi, difatti ad ogni ciclo il numero di molecole di DNA raddoppia per la replicazione semiconservativa, in quanto le molecole sintetizzate in un dato ciclo sono utilizzate come stampo nel ciclo successivo. Al termine di "N" cicli si produrranno un numero massimo teorico di 2^N molecole di DNA a doppia elica. Il polimorfismo molecolare rilevabile è dovuto a differenze di sequenza che determinano la formazione di un diverso prodotto di amplificazione oppure un*

frammento di DNA che è amplificato da una unità tassonomica ma non da un'altra, osservabili come bandeggi di amplificazione (paragonabili a codici a barre) che caratterizzano gli individui analizzati. I marcatori genetico-molecolari basati sulla metodica PCR rappresentano un sistema di elezione con elevata selettività e sensibilità per identificare variazioni nella sequenza del DNA genomico degli organismi e per determinare le distanze genetiche reciproche. Es. l'amplificazione del DNA tramite PCR con primer arbitrari consente di rilevare variazioni individuali mediante l'analisi RAPD: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrpad>

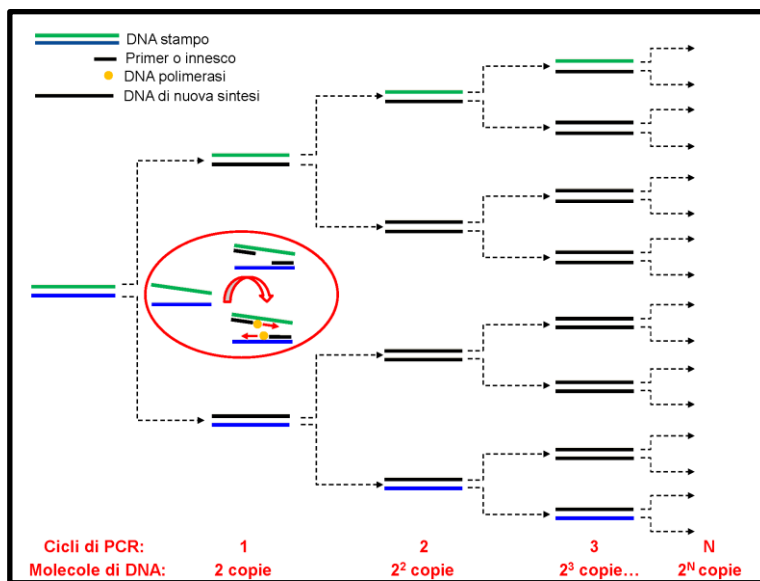


Figura 2 – Le variazioni di sequenza del DNA genomico (polimorfismi) possono essere rilevate attraverso marcatori molecolari basati sulla PCR.

La caratterizzazione del castagno mediante marcatori genetico-molecolari

In tempi recenti è stata dimostrata la trasferibilità di marcatori genetico-molecolari del DNA di castagno attraverso la barriera di specie, ciò ha mostrato l'evoluzione conservativa e la colinearità dei genomi (sintenia) tra differenti specie del genere *Castanea*. Questo spiega anche la presenza all'interno dello stesso genere del fenomeno più o meno frequente della ibridazione interspecifica con l'introggressione di nuovi caratteri. Nonostante ciò, la domesticazione del castagno e la successiva selezione per i caratteri desiderati ha portato progressivamente ad una riduzione generale nella variabilità genetica rispetto alle popolazioni naturali [De Masi et al. 2004]. Poiché la specifica costituzione genetica (genotipo) delle cultivar di castagno è strettamente legata alla loro zona di crescita, ulteriori studi sono necessari per studiare la ricchezza genetica e le varianti esistenti di ciascuna varietà. I polimorfismi, dunque, rappresentano dei marcatori genetico-molecolari che potenzialmente consentono di discriminare tra varietà di castagno anche strettamente correlate tra loro. I castanicoltori propagano vegetativamente le varietà di castagno con lo scopo di preservare i caratteri peculiari del frutto di ciascuna varietà, con la conseguenza che una cultivar è formata da popolazioni clonali di alberi aventi le stesse caratteristiche genetiche (genotipo). Il "profilo del DNA" (DNA fingerprint) di ciascun albero di castagno può quindi essere considerato rappresentativo della popolazione della cultivar di appartenenza e può consentire la differenziazione varietale (**Figura 3**) [Galderisi et al. 1998, De Masi et al. 2002, 2004]. I marcatori molecolari sono inoltre indispensabili per valutare il grado di diversità genetica delle popolazioni varietali e naturali, da cui poter attingere nuove risorse genetiche, e per stabilire la loro potenziale capacità adattativa, determinata geneticamente, alle sempre più mutevoli condizioni ambientali [Freitas et al. 2021].

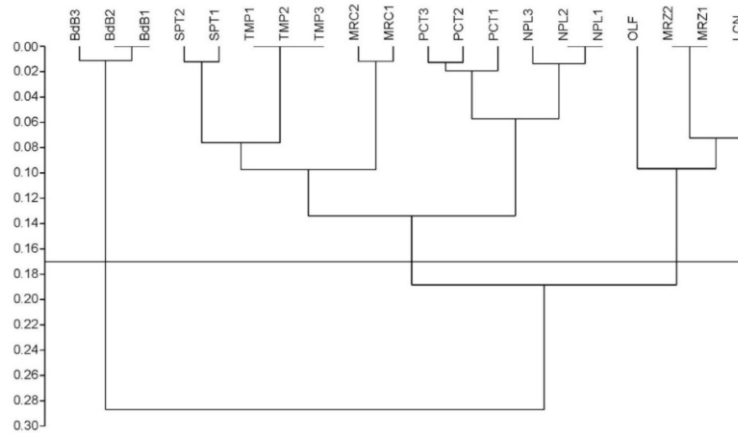


Figura 3. Discriminazione varietale e clonale in castagno basata su polimorfismi del DNA rilevati mediante marcatori molecolari RAPD [fonte: Nunziata et al. 2020].

La selezione assistita da marcatori (*Marker Assisted Selection, MAS*) è da tempo uno strumento ben consolidato per i *breeder* attraverso cui è possibile identificare e selezionare individui con caratteri di interesse sulla base di marcatori genetico-molecolari correlati geneticamente. La MAS è particolarmente utile per selezionare tratti di interesse che sono difficili o dispendiosi da misurare (in termini di tempo e costi) e/o sono espressi tardivamente nello sviluppo della pianta. Oggi, grazie al sequenziamento del DNA (genomica) e del corrispondente RNA (trascrittomica) è possibile conoscere nei dettagli una specie vegetale come mai prima d’ora. Un’approfondita comprensione della diversità genetica che è alla base della variabilità osservata nel castagno, dal livello molecolare della scala della singola base nucleotidica nel DNA al livello superiore della scala delle funzioni biologiche, è essenziale per rendere disponibile la ricchezza delle risorse genetiche per il miglioramento genetico e per i nuovi impianti necessari per rinnovare i castagneti in declino. Le informazioni derivanti dagli studi di genomica, come le banche dati di sequenze di basi associate con set di marcatori genetico-molecolari, consentono infatti di fare correlazioni genotipo–fenotipo. Per di più, studi di genomica comparativa con le differenti specie di castagno possono essere utilizzati per scovare nuove variazioni nel

DNA con cui sviluppare marcatori molecolari specie- e cultivar-specifici. Nell'attuale contesto, in vista di un rilancio della coltivazione del castagno, l'autenticità e la tracciabilità nella filiera castanicola sono fattori chiave rispettivamente per garantire gli impianti e proteggere i produttori e i consumatori dal commercio fraudolento. Cosa ancora più importante, i risultati di questi studi potranno essere resi da subito disponibili a tutti gli stakeholder per la corretta discriminazione varietale. Pur tuttavia, ulteriori ricerche sulle risorse genetiche locali di *C. sativa* sono ancora necessarie e desiderabili per incrementare la qualità dei prodotti, la produttività e la sostenibilità dei castagneti, consentendo al contempo la salvaguardia degli hotspot di biodiversità, importanti riserve di risorse genetiche in pericolo. Per affrontare queste nuove sfide, è fondamentale trarre vantaggio da approcci multidisciplinari e innovativi con l'obiettivo di caratterizzare e sfruttare l'enorme potenziale della diversità castanicola, sia all'interno delle specie sia tra le diverse specie, come fonte di nuove caratteristiche genetiche utili.

L'analisi molecolare basata sul DNA è stata diffusamente utilizzata per lo studio del castagno al fine di caratterizzare geneticamente il germoplasma disponibile [Silvanini et al. 2011]. Tra i primi studi effettuati in Italia, con l'obiettivo di valorizzare le cultivar campane e di contribuire a risolvere casi di frode a carico dei marroni, ricordiamo che Galderisi e colleghi (1998) hanno impiegato i marcatori RAPD per identificare le principali cultivar commerciali di castagno e di marroni della Campania. I risultati di queste ricerche hanno mostrato che la maggioranza dei cloni tipo-marrone hanno una variabilità genetica estremamente ristretta, ad eccezione di alcune varianti clonali localizzate ai confini degli areali di coltivazione delle cultivar principali. D'altra parte alcune note cultivar di marroni possono essere considerate varianti clonali fatte risalire a cultivar principali. In ogni caso, l'elevata omogeneità genetica osservata tra i marroni studiati induce a ritenere che esse abbiano avuto una origine comune determinata dall'elevata qualità dei frutti che ne ha favorito la diffusione e lo scambio come materiale di propagazione tra i castanicoltori. La stessa analisi condotta su cultivar di castagni tipo-non marrone ha evidenziato una variabilità genetica sufficiente tale da consentirne la discriminazione varietale. I risultati di questi studi sono stati di importanza per contribuire all'attribuzione del marchio IGP a cultivar campane. Solo più recentemente, grazie all'avanzamento delle metodiche di indagine biomolecolare e all'abbattimento dei loro costi, sono stati sviluppati strumenti molecolari innovativi per l'identificazione varietale del castagno europeo in Campania [Nunziata et al. 2020]. Questi studi rispondono a una duplice necessità: la biodiversità castanicola ha raggiunto livelli di rischio di erosione

genetica mai raggiunti prima e i castanicoltori non hanno sufficienti strumenti per proteggere e valorizzare i genotipi tradizionali. Nell'ambito del progetto Castarray, finanziato dalla M16.1.1 Az. 1 del PSR Campania 2014-2020, è stato inizialmente caratterizzato un gruppo di cultivar di castagno rappresentativo per un intervallo di variabilità genetica sufficientemente ampio (**Figura 3**). Un set di SNP è stato ottenuto per omologia da sequenze di castagno giapponese (*Castanea crenata*) disponibili nella letteratura scientifica e successivamente è stato validato sul gruppo varietale selezionato. Infine, alcuni degli SNP che si sono dimostrati necessari e sufficienti per la discriminazione varietale sono stati rilevati operativamente mediante una particolare applicazione della PCR, denominata KASP (*Kompetitive Allele-Specific PCR*), per generare marcatori genetico-molecolari utili allo scopo.

L'identificazione fenotipica di cultivar e varianti clonali è fondamentale nella produzione vivaistica e nella selezione del germoplasma. Collezioni di germoplasma sono state costituite in tutto il mondo con l'intento di preservare le varianti genetiche meno diffuse; di conseguenza, è molto importante stabilire che tali collezioni siano rappresentative e non ridondanti, oltre a confermare l'origine genetica del materiale vegetale mediante controlli a posteriori. Inoltre, coloro che selezionano nuove varietà (breeder) fanno affidamento sul germoplasma disponibile nelle collezioni per ottenere piante con nuove caratteristiche. L'analisi genetico-molecolare rappresenta un'operazione che non permette di migliorare le piante direttamente. Tuttavia, tale analisi produce delle informazioni che possono ridurre drasticamente il tempo necessario per raggiungere l'obiettivo dei programmi di incrocio. È noto che il tempo rappresenta la maggiore limitazione nello sviluppo di tali programmi, soprattutto per specie vegetali come il castagno che richiedono un lungo periodo (dell'ordine di anni) per raggiungere la maturità sessuale. L'ausilio dei marcatori molecolari può ridurre estremamente il tempo richiesto affinché un programma di miglioramento giunga in porto, dato che rende possibile la selezione di piante attraverso uno screening molto precoce, rapido ed efficiente. Quindi è sicuramente vantaggiosa la possibilità di poter integrare i dati fenotipici disponibili con le informazioni sulle relazioni genetiche al fine di massimizzare la diversità genetica tra i progenitori da selezionare per il miglioramento genetico tradizionale. Uno screening della diversità genetica all'interno di popolazioni usate per incroci può aiutare nel programmare gli stessi con maggiore efficienza, così da minimizzare la dimensione della popolazione di partenza utilizzata e allo stesso tempo mantenendo il più possibile elevata la diversità.

E' questo il caso delle *core collection*, collezioni che sono un sottoinsieme di una più grande raccolta di germoplasma e che contengono accessioni scelte per rappresentare la variabilità genetica di tutta la collezione di germoplasma. L'obiettivo principale di usare una *core collection* è quello di migliorare la gestione e l'utilizzo delle collezioni di risorse genetiche. In questo modo, il pool genico messo a disposizione dalla natura può essere utilizzato più efficacemente dai selezionatori per creare ulteriori varietà geneticamente diverse tra loro che rispondano allo scopo.

Conclusioni e prospettive

I risultati ottenuti mediante le tecnologie di biologia molecolare rappresentano un notevole avanzamento delle nostre conoscenze sulla diversità genetica nell'ambito delle specie *Castanea sativa*. Ciò permette inoltre di autenticare e monitorare l'identità del materiale vegetale utilizzato. I polimorfismi osservati consentono di classificare i campioni analizzati, così fornendo un metodo fine per identificare gli alberi, soprattutto quelli notevolmente simili da un punto di vista fenotipico. I marcatori genetico-molecolari forniscono un'evidenza certa ed inconfutabile dell'eventuale polimorfismo presente perché determinato direttamente a livello del DNA. I marcatori genetico-molecolari, quando resi disponibili agli utilizzatori finali per il tramite delle Istituzioni scientifiche, hanno dimostrato di essere dei validi strumenti per la corretta gestione dei castagneti, dei vivai e dei parchi naturali. Inoltre, la natura molecolare della diversità genetica suggerisce che può essere informativa anche in contesti molto diversi, perché stabilmente associata a ciascuna cultivar, e può essere anche utilizzata dai breeder per la MAS in progetti di miglioramento genetico. Infine, l'auspicio è che ulteriori studi riguardino molte altre cultivar di castagno per consentire la creazione di banche dati di riferimento, oltre all'implementazione e alla disponibilità dei metodi molecolari come strumenti di routine ad integrazione delle metodiche tradizionali, a vantaggio di tutti gli stakeholder della filiera castanicola. Per perseguire l'obiettivo comune di mantenere vitale questo settore, senza alcun dubbio chiave per il nostro Paese, saranno necessari importanti investimenti da parte delle aziende coinvolte in aggiunta agli aiuti governativi.

Riferimenti bibliografici

- Calandrelli M.M., Nunziata A., De Masi L. Studio preliminare sulla mappatura geografica della diversità genetica castanicola mediante strumenti GIS. Atti del “XIII Convegno Nazionale sulla Biodiversità (Biodiversità 2021): Agricoltura, Ambiente e Salute”, p. 245, online 7-9 settembre 2021, Foggia, pubblicato online: 7 settembre 2021, ISBN: 9788874271016, <https://drive.google.com/file/d/1-OjoWIYCRubnt6H8DkwAhe-Tg6jF-R2I/view>
- De Masi, L.; Minasi, P.; Boscaino, F.; Galano, G.; Castaldo, D.; Laratta, B. A preliminary study on DNA typing of Calabrian chestnut by RAPD analysis. *Essenze Derivati Agrumari* 2002, 7, 3–9.
- De Masi, L.; Castaldo, D.; Minasi, P.; Laratta, B. Caratterizzazione e Certificazione di Qualità di fico e Castagno Calabresi Attraverso Moderne Tecniche di Biologia Molecolare; Monografia.; *Stazione Sperimentale per l'Industria delle Essenze e dei Derivati dagli Agrumi*, Reggio Calabria, Italy, 2004.
- De Vasconcelos, M.C.B.M.; Bennett, R.N.; Rosa, E.A.S.; Ferreira-Cardoso, J.V. Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. *J Sci Food Agr.* 2010, 90(10), 1578-1589. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4016>
- Freitas, T.R.; Santos, J.A.; Silva, A.P.; Fraga, H. Influence of Climate Change on Chestnut Trees: A Review. *Plants* 2021, 10, 1463. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10071463>
- Galderisi U.; Cipollaro M.; Di Bernardo G.; De Masi L.; Galano G.; Cascino A. Molecular typing of Italian sweet chestnut cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 1998, 73(2): 259-263. DOI: <https://doi.org/1080/14620316.1998.11510973>
- Grassi, G. Germoplasma e biodiversità del castagno da frutto in Campania. In *Il Castagno in Campania—Problematiche e Prospettive Della Filiera*; Cristinzio, G., Testa, A., Eds.; Società Editrice Imago Media, Dragoni (CE), Italy, 2006; pp. 62–73.
- Karp, A.; Seberg, O.; Buiatti, M. Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. *Annals of Botany* 1996, 78, 2, 143–149, <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0106>
- Mellano, M.G.; Beccaro, G.L.; Donno, D.; Marinoni, D.T.; Boccacci, P.; Canterino, S.; Cerutti, A.K.; Bounous, G. *Castanea* spp. biodiversity conservation: Collection and characterization of the genetic diversity of an

- endangered species. *Genetic Resources and Crop Evolution* **2012**, 59, 1727–1741. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9794-x>
- Mullis, K.B.; Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology* **1987**, 155, 335-350. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Nicoletti, R.; Beccaro, G.L.; Sekara, A.; Cirillo, C.; Di Vaio, C. Endophytic Fungi and Ecological Fitness of Chestnuts. *Plants* **2021**, 10, 542. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10030542>
- Nunziata, A.; Ruggieri, V.; Petriccione, M.; De Masi, L. Single nucleotide polymorphisms as practical molecular tools to support European chestnut agrobiodiversity management. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21, 4805. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21134805>
- Roces-Díaz, J.V.; Jiménez-Alfaro, B.; Chytrý, M.; Díaz-Varela, E.R.; Álvarez-Álvarez, P. Glacial refugia and mid-Holocene expansion delineate the current distribution of *Castanea sativa* in Europe. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **2018**, 491, 152-160. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2017.12.004>.
- Sharifi-Rad, J.; Quispe, C.; Castillo, C.M.S.; Caroca, R.; Lazo-Vélez, M.A.; Antonyak, H.; Polishchuk, A.; Lysiuk, R.; Oliinyk, P.; De Masi, L.; Bontempo, P.; Martorell, M.; Daştan, S.D.; Rigano, D.; Wink, M.; Cho, W.C. Ellagic acid: A review on its natural sources, chemical stability, and therapeutic potential. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2022**, 2022, Article ID 3848084. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/3848084>
- Servillo, L.; Giovane, A.; Casale, R.; Balestrieri, M.L.; Cautela, D.; Paolucci, M.; Siano, F.; Volpe, M.G.; Castaldo, D. Betaines and related ammonium compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry* **2016**, 196, 1301-1309. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.070>.
- Silvanini, A.; Marinoni, D.T.; Beccaro, G.L.; Ganino, T. La caratterizzazione varietale del germoplasma di *Castanea sativa* Mill. *Italus Hortus* **2011**, 18(3), 47-61. URL: http://www.italushortus.it/phocadownload/review/review_15/05.silvanini.pdf
- Vella, F.M.; De Masi, L.; Calandrelli, R.; Morana, A.; Laratta, B. Valorization of the agro-forestry wastes from Italian chestnut cultivars for the recovery of bioactive compounds. *European Food Research and Technology* **2019**, 245, 2679–2686. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03379-w>
- Wilkins, G. DNA: Twin strands solved the structure. *Nature* **2013**, 496, 434. DOI: <https://doi.org/10.1038/496434b>

Fattibilità tecnica del trasferimento alla filiera castanicola di strumenti per il riconoscimento genetico varietale

Angelina Nunziata ^{1,*}, **Giulia Verrilli** ^{1,2}, **Elvira Ferrara** ^{1,3}

Affiliazioni

¹ CREA - Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura, Agrumicoltura (OFA), Via Torrino, 3 – 81100 Caserta

² Dipartimento di Medicina di Precisione, Università degli Studi della Campania “Luigi Vanvitelli”, Via de Crecchio, 7 80138 Napoli

³ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche, Università degli Studi della Campania “Luigi Vanvitelli”, Via Vivaldi, 43 - 81100 Caserta

* Email: angelina.nunziata@crea.gov.it

Biodiversità castanicola: una risorsa da valorizzare

La variabilità genetica esistente tra le cultivar di castagno presenti in Europa si riflette in diverse esigenze pedoclimatiche, diverso grado di resistenza e tolleranza a patogeni ed insetti, diversa vigoria e tempi di fioritura, allegagione e maturazione e, soprattutto, in diverse caratteristiche merceologiche dei frutti. Per questo, la corretta gestione agronomica del castagneto e l'opportuna allocazione e promozione dei prodotti sul mercato non può prescindere dalla conoscenza del materiale genetico oggetto di coltivazione.

In Italia la variabilità genetica del castagno è piuttosto ampia, sia grazie alle condizioni pedoclimatiche estremamente diversificate delle numerose regioni, sia perché negli anni gli agricoltori locali hanno selezionato e conservato diversi genotipi apportando un forte contributo alla diversificazione del patrimonio genetico in coltivazione [Grassi 2006; Bounous 2014]. Si stima che il germoplasma locale sia rappresentato da

oltre 300 cultivar [Piccioli 1992; Gobbin et al. 2007; Bounous 2002]. Per secoli il castagno ha ricoperto un ruolo economico importante per le popolazioni delle aree montane, rappresentando una delle principali fonti di reddito attraverso la produzione di frutti, ma anche di legname. Nelle aree destinate a produzione di legno, in particolare, quasi mai è stata operata una selezione genetica del materiale in propagazione per cui, ad oggi, il castagneto ceduo costituisce a tutti gli effetti un piccolo serbatoio di diversità genetica in conservazione spontanea. A partire dagli anni '50, con lo spopolamento delle aree rurali e l'insorgenza di nuove problematiche fitosanitarie, la superficie castanicola ha subito un graduale decremento, a cui si è accompagnata una consistente erosione genetica dovuta in taluni casi alla morte del germoplasma suscettibile alle diverse fitopatie che si sono succedute, ed in altri alla sostituzione di esemplari locali sofferenti con le poche cultivar dichiaratamente resistenti ai patogeni e parassiti emergenti disponibili presso i vivai. Tuttavia, nell'ultimo decennio, grazie ad un rinnovato interesse verso i prodotti della filiera castanicola, apprezzati soprattutto per il loro valore salutistico e nutrizionale, sono state ideate molte iniziative per sostenere e sviluppare la biodiversità di questa coltura [Borges et al. 2008]. È riemersa, di conseguenza, anche la necessità di catalogare, identificare e caratterizzare il maggior numero possibile di cultivar anche in funzione delle nuove potenzialità commerciali della produzione, allo scopo di preservare e valorizzare il germoplasma ancora esistente.

In generale, una osservazione continua degli esemplari di castagno in coltivazione che siano correttamente individuati quali appartenenti ad una specifica cultivar, può consentire una catalogazione delle risorse che divenga reale strumento per un loro efficace utilizzo da parte di agricoltori, trasformatori e consumatori nonché strumento per una mirata tutela di risorse che si rivelino a rischio in particolari contingenze ambientali, sociali ed economiche. La caratterizzazione delle risorse che ne può conseguire, oltre ad essere più attenta e specifica, può avere una maggiore penetranza presso gli addetti ai lavori, aprendo la strada ad un marketing più appropriato e, di conseguenza, ad un maggiore reddito. Ove poi tale caratterizzazione venga tradotta anche in una valutazione del tipo e del grado di diversità delle risorse da parte dei breeder, sono poste le basi per un utilizzo efficace del materiale genetico in osservazione come punto di partenza per l'ottenimento di nuove risorse genetiche competitive.

I limiti del riconoscimento morfologico invitano al ricorso alle impronte genetiche

Normalmente i coltivatori più esperti conoscono la denominazione varietale di ciascuno dei propri alberi, soprattutto grazie alla trasmissione delle informazioni che seguono il materiale di propagazione ma, ove tale trasmissione fallisca o sia inaffidabile, è necessario che essi siano in grado di effettuare correttamente il riconoscimento varietale. La maggior parte delle cultivar presenta caratteri fortemente distintivi legati alla morfologia e fisiologia dei frutti quali forma, colore, dimensioni, sapore ed epoca di maturazione. Meno evidenti e noti sono invece i particolari distintivi di rami, foglie e gemme, la cui conoscenza è generalmente appannaggio dei castanicoltori più esperti e di tecnici specializzati. La trasmissione di tali competenze è fortemente ostacolata sia dalla necessità di una continua osservazione in campo, che possibilmente includa molte cultivar allevate contemporaneamente e nello stesso areale pedoclimatico, sia dalla scarsissima fluidità nel ricambio generazionale tra gli esperti coinvolti. Per di più le competenze necessarie sono spesso costruite in ambito locale e la maggior parte dei tecnici, pur riuscendo a riconoscere agilmente ciò che rientra nel proprio bagaglio di esperienze, può incontrare molte difficoltà nel riconoscimento di cultivar provenienti da zone diverse d'Italia e d'Europa e non abitualmente diffuse nel proprio areale di riferimento. Questo ha comportato un'aumentata e diffusa confusione varietale in quanto diverse cultivar sono talora conosciute con lo stesso nome o, all'opposto, diversi nomi sono attribuiti alla stessa cultivar.

La soluzione a molte delle problematiche poste in evidenza potrebbe venire da un ampio ricorso alla lettura delle impronte genetiche varietali come strumento per il riconoscimento rapido del materiale di propagazione, degli esemplari in coltivazione in qualsiasi stagione dell'anno, e perfino dei prodotti finali in commercio. Analogamente all'impronta digitale, che consente di riconoscere una persona senza errori e senza vederne la figura intera e indipendentemente da fattori ambientali (invecchiamento, mascheramenti, dimagrimenti, etc.), l'impronta genetica consente di riconoscere un esemplare quale appartenente ad una cultivar a propagazione clonale senza errori e senza necessità di disporre di un albero completamente formato, indipendentemente da fattori ambientali (malattie, stadio di crescita, stadio fenologico). Essa può essere definita tramite esami noti genericamente come test del DNA. Tuttavia, dato che esistono da tempo strumenti per il rilevamento delle impronte genetiche delle cultivar di castagno e che essi non sono mai stati realmente trasferiti al mondo

produttivo, è opportuno chiedersi se ed in quali termini sia possibile trasferire le competenze e le tecnologie per il riconoscimento genetico delle varietà di castagno agli attori della filiera.

In generale, le condizioni essenziali perché sia possibile e si diffonda l'uso di un sistema per il rilevamento di impronte, sono:

- ✓ Che le impronte abbiano polimorfismi (che esistano cioè dei punti di diversità)
- ✓ Che i polimorfismi siano indicativi e distintivi entro il gruppo di individui osservati
- ✓ Che esista una banca dati (che esista cioè un repository accessibile di tutte le impronte degli individui già noti e descritti)
- ✓ Che il sistema di rilevamento sia economico ed accessibile (se il rilevamento di una impronta dovesse risultare più costoso o più complicato del riconoscimento dell'individuo, nessuno vi farebbe ricorso)
- ✓ Che gli interessati sappiano come rilevare e leggere le impronte

Aspetti metodologici dei più diffusi test a DNA per la determinazione dell'impronta genetica

Esistono molteplici test a DNA in grado di fornire informazioni riguardo alle diversità genetiche tra individui appartenenti alle varie specie di Castagno. Tuttavia, non tutti i test sono stati proposti ed utilizzati per ricavare l'impronta genetica varietale in castagno. Finora i test a DNA utilizzati per questo specifico scopo sono basati su frammenti di DNA contenenti brevi sequenze ripetute molte volte, dette "microsatelliti" [Lorenzo et al. 2017]. Essi, pur soddisfacendo le prime tre condizioni sopra elencate e pur essendosi rilevati ripetibili ed affidabili, sono generalmente utilizzati solo nell'ambito di progetti specifici, nei quali si instaurano rapporti di collaborazione tra Enti di ricerca pubblici o privati con o senza altri attori, e non sono mai stati utilizzati direttamente dal mondo produttivo a causa di costi elevati e necessità di attrezzature e competenze complesse per l'ottenimento, l'interpretazione e la gestione dei risultati. Infatti, oltre alle competenze base di biologia molecolare, l'esecuzione dei test a microsatelliti richiede l'uso di termociclatori e di sistemi per elettroforesi capillare di frammenti fluorescenti (noti come sequenziatori). In alternativa, si può ricorrere a vecchi sistemi di elettroforesi su gel di acrilamide con successiva immersione in argento che richiedono

notevoli abilità di manipolazione e tempi di esecuzione molto lunghi, oltre a rendere ancor più lunga e laboriosa la lettura dei risultati. Inoltre, sussistono problemi di trasferibilità dei risultati da laboratorio a laboratorio. Infatti, per ogni locus analizzato, i microsatelliti restituiscono un risultato che si esprime con un numero correlato con la lunghezza in basi del frammento ottenuto o con due numeri corrispondenti alle lunghezze dei due frammenti, in caso di eterozigosi. Tali numeri, però, non riflettono precisamente l'effettiva lunghezza del frammento in quanto vengono stimati per confronto della velocità di migrazione in elettroforesi capillare del frammento in esame con la velocità di una serie di frammenti standard. A seconda del sistema di elettroforesi, della matrice di riempimento del capillare, della lunghezza dello stesso, del protocollo di elettroforesi, del fluoroforo usato per marcare il frammento in esame e di quello usato per i frammenti standard che costituiscono il righello di confronto, la lunghezza stimata del frammento, però, può mostrare una variazione fino al 5% in due esperimenti diversi. Non sono disponibili, in commercio, frammenti sintetici standard per la specifica taratura di ciascun locus né accurate banche dati facilmente utilizzabili per la sintesi degli stessi per cui si fa generalmente ricorso all'inserimento di cultivar standard di confronto per un allineamento dei risultati con esperimenti precedenti. Non è facile, tuttavia, convergere verso una ristretta cerchia di cultivar che fungano da standard noti e disponibili in tutta Europa.

A differenza dei microsatelliti, i test del DNA basati sul monitoraggio di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) potrebbero essere molto più semplici e trasferibili.

Gli SNP, infatti, possono essere identificati univocamente attraverso la loro localizzazione sul genoma e, individuato e condotto un saggio per uno specifico locus, la risposta potrà essere costituita da una delle quattro basi azotate esistenti (adenina, timina, citosina o guanina) o da combinazioni di due di esse in caso di eterozigosi.

Come è facile intuire, sia la localizzazione dello SNP sia la risposta sono agilmente codificabili, consentendo di creare, per ciascuna cultivar esaminata, un vero e proprio codice a barre, stabile e perfettamente trasferibile indipendentemente dal metodo usato per leggere ciascuno degli SNP considerati (**Figura 1**).

sca02470_29720 Gruppo di linkage A **SNP A7075K** Lunghezza 153bp

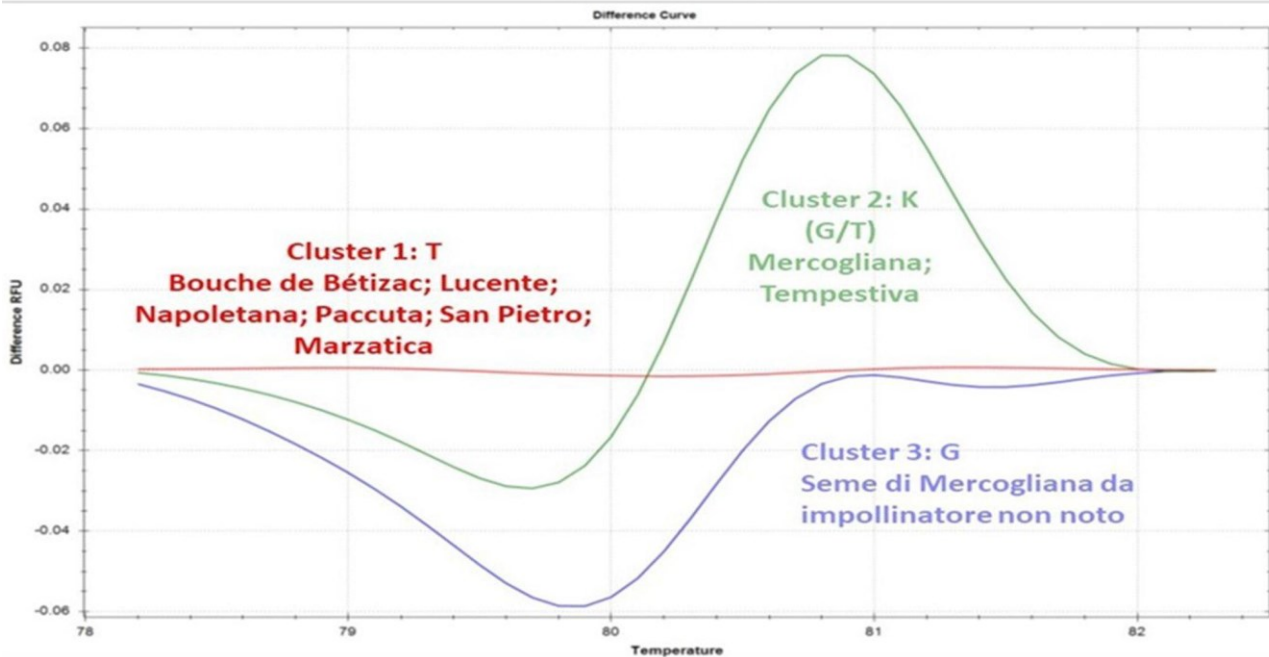


Figura 1 - Esempio di denaturazione differenziale di ampliconi di DNA di castagno in presenza di uno SNP.

Per rilevare tali SNP, le conoscenze di genomica vegetale oggi disponibili consentono, tra l'altro, la produzione di "DNA array" commerciali, cioè di insiemi di sequenze di DNA, fissate ad una matrice solida come un vetrino, che possono essere usati per differenziare il DNA di un individuo da quello di un altro in maniera rapida, affidabile e relativamente economica. Tuttavia, la costruzione di un vetrino idoneo alla distinzione varietale nell'ambito del castagno europeo (*Castanea sativa*) non è stata ancora affrontata. Inoltre,

un vetrino include generalmente circa un migliaio di gruppi di sonde diverse, per il monitoraggio di altrettanti siti di polimorfismo, che generano una mole di dati eccessiva rispetto alle esigenze specifiche. Per il genere *Castanea* esistono due DNA array, uno per 768 SNP in *C. crenata* [Nishio et al. 2018], l'altro per 1536 SNP in *C. mollissima* [Kubisiak et al. 2013]. Tuttavia, questi vetrini non sono stati costruiti a seguito di un confronto di molti genotipi e non necessariamente discriminano in maniera adeguata in pool genetici diversi. Essi, inoltre, non sembrano essere trasferibili alla specie *C. sativa*. Infatti, in base ad alcune stime basate sul confronto delle sequenze, meno del 3% dei polimorfismi individuati nel vetrino costruito su *C. crenata* (circa 23), potrebbe rivelarsi realmente utile a distinguere tra loro le cultivar di castagno europeo [Nunziata et al. 2020]. Un sistema più semplice disponibile per il monitoraggio degli SNP prevede l'uso di sonde fluorescenti di tipo FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer; trasferimento di energia per risonanza) in grado di colorare il campione a seconda dell'informazione contenuta in un singolo nucleotide del suo DNA. Siccome si basano sull'amplificazione specifica di piccolissimi frammenti di DNA, anche quando il DNA estratto non è particolarmente puro ed integro, questi test danno risultati chiari rivelandosi, anche per questo motivo, molto economici. I test con sonde fluorescenti sono anche scalabili, ciò significa che possono essere condotti in maniera più o meno approfondita e con costi più o meno contenuti a seconda della situazione e sono commissionabili in toto o in parte anche a laboratori internazionali. Le sonde FRET per l'amplificazione e distinzione di frammenti di DNA esistono già dal 1991 [Holland et al. 1991], ma il loro uso è stato sempre fortemente limitato dai costi di ottimizzazione del saggio che, richiedendo la sintesi, la sperimentazione e l'eventuale ri-sintesi di sonde specificamente marcate per ciascuno dei polimorfismi da monitorare, si rilevava piuttosto proibitiva. In seguito, da un lato la fornitura di un servizio di sintesi ed ottimizzazione da parte delle case produttrici, dall'altro la creazione di un sistema di codine (tail) a DNA che consentono di inserire i fluorofori nella mix di reazione e di evitare di marcare specificamente ciascuna sonda, hanno abbattuto notevolmente i costi di sintesi delle sonde. Da qualche anno, ad esempio è stato brevettato il sistema di sonde KASP (Kompetitive Allele-Specific PCR; PCR competitiva allele-specifica), basato proprio su questo principio, che ha definitivamente reso economicamente accessibile l'uso di questa tecnologia molto semplice [Semagn et al. 2014].

Basandosi sulle scarse risorse genomiche disponibili per il castagno europeo, sono già stati costruiti circa 40 saggi KASP, in grado di monitorare altrettanti polimorfismi puntiformi distribuiti in 33 loci su 11 dei 12 cromosomi del castagno europeo. Tali saggi sono stati finora utilizzati per caratterizzare individui appartenenti a cultivar diverse individuati nell'areale castanicolo dell'area di Roccamonfina, per la caratterizzazione di germoplasma autoctono di origini irpine e cilentane e per la caratterizzazione di esemplari storici prelevati in Liguria, Trentino e Sicilia. I risultati ottenuti suggeriscono che i saggi KASP a disposizione sono sufficienti a distinguere tra loro tutte le cultivar di castagno europeo ma, se non dovessero bastare, sarebbe piuttosto facile aggiungerne degli altri, anche perché, nel frattempo, le risorse genomiche disponibili per castagno continuano a crescere. Affinché l'innovazione sia effettivamente e definitivamente trasferibile al mondo produttivo, è necessaria la costruzione di una vasta banca dati di riferimento che includa le impronte genetiche del maggior numero possibile di cultivar note correttamente denominate e identificate. Per tale costruzione, sarebbe auspicabile il finanziamento di un adeguato progetto di trasferimento tecnologico, che concentri gli sforzi della ricerca verso questa specifica direzione in poco tempo. Tuttavia, la semplice diffusione dell'uso di questa tecnologia presso i laboratori di tutta Europa potrebbe comunque portare, anche se in maniera meno celere, alla raccolta ed alla condivisione dei dati necessari, così come avvenuto in passato per i dati di analisi dei microsatelliti (**Figura 2**).

Uno studio in corso su un vero e proprio patriarca vegetale, il Castagno dei Cento Cavalli di Sant'Alfio (CT), rileva che questa specifica tecnica non intercetta l'eventuale variabilità genetica di tipo silente, che potrebbe rilevarsi presente e confondente nell'ambito di una stessa cultivar in propagazione clonale da molti secoli. Rimanendo indifferente a tale tipo di micro-variabilità, il sistema di sonde KASP si rivela dunque una tecnica affidabile per il rilevamento dell'impronta genetica.

Il sistema KASP può trovare immediata applicazione anche nella tracciabilità di castagne intere, in quanto è possibile estrarre DNA della pianta madre dal loro guscio. Castagne mondate e loro derivati, invece, essendo costituiti da semi derivati da impollinazione incrociata e non condividendo interamente il loro patrimonio genetico con la pianta madre, non sono direttamente tracciabili attraverso il sistema proposto. Per questa particolare applicazione potrebbero essere utili ulteriori ricerche volte all'individuazione di un sufficiente numero di polimorfismi a carico del patrimonio genetico citoplasmatico, ad eredità esclusivamente femminile,

che resta identico alla pianta madre anche nei semi. Resta inoltre da verificare la effettiva diffusione di cultivar commerciali che siano derivate da porta-seme a diffusione commerciale e la distinguibilità dei frutti della cultivar derivata dai frutti della cultivar porta-seme.

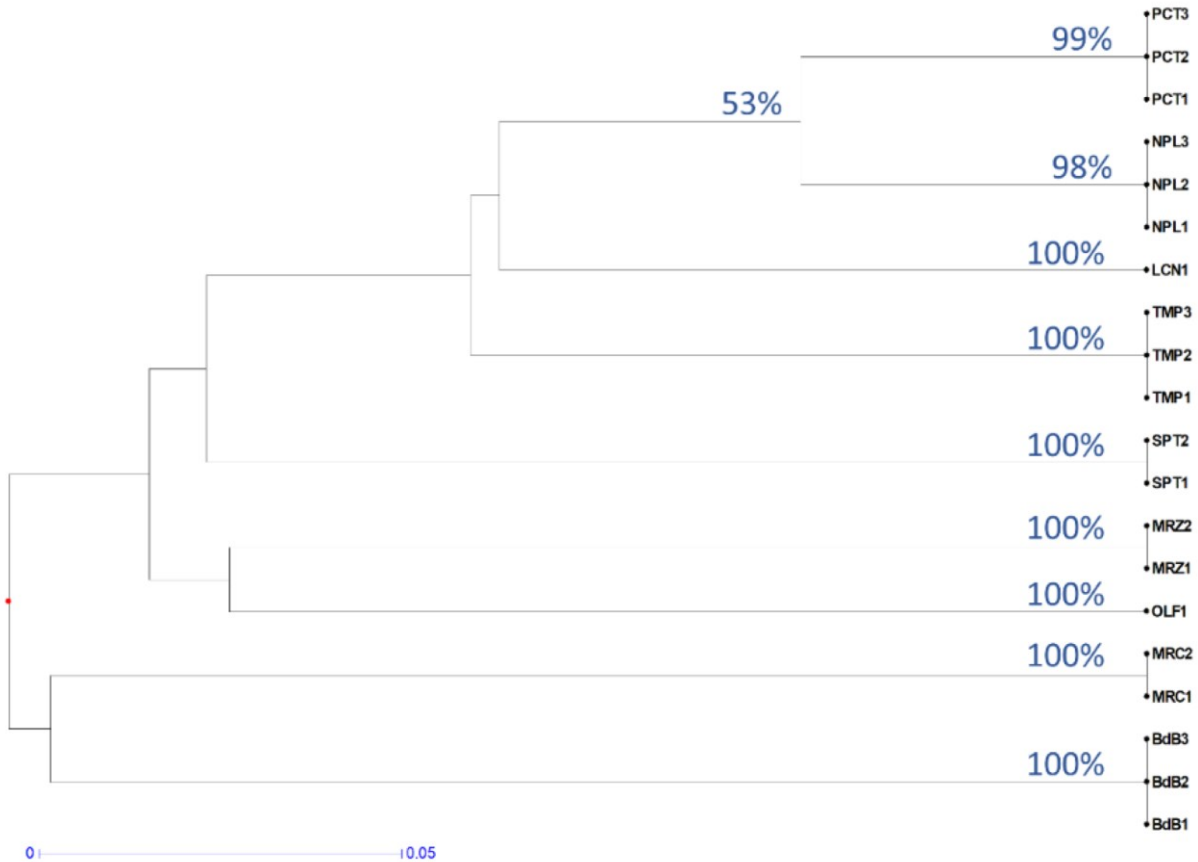


Figura 2 - Esempio di clustering di varietà di castagno basato sui polimorfismi KASP.

Trasferibilità di un sistema di saggi KASP per il riconoscimento varietale ed applicazioni

In conclusione, è possibile affermare che, grazie all'ottimizzazione di test a DNA di ultima generazione, è stata verificata la presenza di tutti gli elementi tecnici indispensabili per il loro trasferimento al mondo produttivo: sono stati individuati polimorfismi rilevabili, è stato verificato che essi siano realmente distintivi, il loro rilevamento si basa su test economici e semplici, i dati ottenuti sono univoci, facilmente leggibili ed immediatamente confrontabili con quanto rilevato altrove e depositato in banca dati. Il nucleo della banca dati di riferimento, che nella sua completezza rimane l'unico elemento tecnico mancante, è stato pubblicato [Nunziata et al. 2020] e consente di verificare che la costruzione di una banca completa è fattibile e può essere completata attraverso strategie più o meno collettive e più o meno rapide, senza necessità di grandissimi investimenti. Appare dunque evidente che l'identificazione e la caratterizzazione di genotipi di castagno attraverso l'utilizzo di metodi molecolari possono fattivamente rappresentare uno strumento valido per apportare valore aggiunto all'intera filiera castanicola. Il trasferimento di detta tecnologia al mondo produttivo porterà certezza e rapidità nel riconoscimento varietale, che consentiranno di tutelare gli investimenti nei nuovi impianti, e potrà favorire una scelta varietale più consapevole ed informata, rendendo tutto il patrimonio di conoscenze collegato a ciascuna varietà finalmente disponibile anche ai castanicoltori meno esperti. Questa innovazione potrà avere ricadute importanti anche nel miglioramento genetico. Infatti, la conoscenza genetica del materiale oggetto di coltivazione consente di fare chiarezza sui rapporti genetici esistenti tra le cultivar analizzate. L'uso di marcatori semplici ed uniformemente distribuiti sul genoma, inoltre, favorisce l'avvio di piani di miglioramento genetico orientati verso un incremento quantitativo e qualitativo della produzione [Santos et al. 2017; Nishio et al. 2018]. Inoltre, in uno scenario in cui i sistemi colturali sono sempre più esposti alla minaccia dei cambiamenti climatici, l'uso diffuso di marcatori SNP consente di porre le basi per caratterizzare i meccanismi di adattamento e resilienza produttiva delle piante agli stress abiotici (termici, salini, acqua e nutrienti) e biotici (patogeni e parassiti) consentendo di perseguire strategie diversificate per limitare le perdite di produttività. Nell'ambito della tutela dell'agro-biodiversità, infine, i marcatori molecolari tradizionali sono già utilizzati per indagare e valorizzare il grado di biodiversità, come anche in studi sull'introggressione di geni da esemplari introdotti dall'uomo [Jarman et al. 2019; Poljak et

al. 2017]. La disponibilità di marcatori più semplici ed economici ne consentirà l'uso anche ai gestori di aree e parchi naturali che potranno, in tal modo, condurre un maggior numero di studi volti a conoscere, gestire e valorizzare la biodiversità castanicola custodita.

Riferimenti bibliografici

- Borges, Olga, Berta Gonçalves, José L. Soeiro de Carvalho, Paula Correia, Ana Paula Silva. Nutritional Quality of Chestnut (*Castanea Sativa* Mill.) Cultivars from Portugal. *Food Chemistry*, **2008**, 106 (3): 976–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.011>.
- Bounous, G. Il Castagno. Coltura, Ambiente Ed Utilizzazioni in Italia e Nel Mondo. Bologna: Edagricole. **2002**, <https://iris.unito.it/handle/2318/15261#.YMHxj1XDyL0.mendeley>.
- Bounous, G. Il Castagno: Risorsa multifunzionale in Italia e nel mondo, **2014**, Edagricole - Edizioni Agricole di New Business Media srl»via Eritrea 21 – 20157, Milano.
- Gobbin, D.; Hohl, L.; Conza, L.; Jermini, M.; Gessler, C.; & Conedera, M. Microsatellite-based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland. *Genome*, **2007**, 50(12), 1089-1103.
- Grassi, G. "Germoplasma e Biodiversità Del Castagno Da Frutto in Campania." In *Il Castagno in Campania - Problematiche e Prospettive Della Filiera*, edited by Cristinzio G; Testa A., **2006**, 62–73. Dragoni (CE), Italy: Società Editrice Imago Media.
- Holland, PM.; Abramson, RD.; Watson, R.; & Gelfand, DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1991**, 88(16), 7276-7280.
- Jarman, R.; Mattioni, C.; Russell, K.; Chambers, FM.; Bartlett, D.; Martin, MA.; & Webb, J. DNA analysis of *Castanea sativa* (sweet chestnut) in Britain and Ireland: Elucidating European origins and genepool diversity. *PloS one*, **2019**, 14(9), e0222936.
- Kubisiak, TL.; Nelson, CD.; Staton, ME.; Zhebentyayeva, T.; Smith, C.; Olukolu, BA.; & Sederoff, RR. A transcriptome-based genetic map of Chinese chestnut (*Castanea mollissima*) and identification of regions of segmental homology with peach (*Prunus persica*). *Tree Genetics & Genomes*, **2013**, 9(2), 557-571.

- Nishio, S.; Terakami, S.; Matsumoto, T.; Yamamoto, T.; Takada, N.; Kato, H.; & Saito, T. Identification of QTLs for agronomic traits in the Japanese chestnut (*Castanea crenata* Sieb. Et Zucc.) breeding. *The Horticulture Journal*, **2018**, 87(1), 43-54.
- Nunziata, A.; Ruggieri, V.; Petriccione, M.; & De Masi, L. Single nucleotide polymorphisms as practical molecular tools to support European chestnut agrobiodiversity management. *International journal of molecular sciences*, **2020**, 21(13), 4805.
- Pereira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrera, AM.; Barreneche, T.; Mattioni, C.; Villani, F.; Díaz-Hernández, MB.; & Martín, Á. Database of European chestnut cultivars and definition of a core collection using simple sequence repeats. *Tree Genetics & Genomes*, **2017**, 13(5), 1-6.
- Piccioli, L. *Monografia Del Castagno*. II. **1992**, Firenze: Stabilimento Tipo Litografico G. Spinelli & C.
- Poljak, I.; Idžojtić, M.; Šatović, Z.; Ježić, M.; Ćurković-Perica, M.; Simovski, B.; & Liber, Z. Genetic diversity of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Central Europe and the western part of the Balkan Peninsula and evidence of marron genotype introgression into wild populations. *Tree Genetics & Genomes*, **2017**, 13(1), 1-13.
- Santos, C.; Nelson, CD.; Zhebentyayeva, T.; Machado, H.; Gomes-Laranjo, J.; & Costa, RL. First interspecific genetic linkage map for *Castanea sativa* x *Castanea crenata* revealed QTLs for resistance to *Phytophthora cinnamomi*. *PLoS One*, **2017**, 12(9), e0184381.
- Semagn, K.; Babu, R.; Hearne, S.; & Olsen, M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular breeding*, **2014**, 33(1), 1-14.

Risposta del castagno alle avversità, miceti endofiti e ruolo ecologico

Rosario Nicoletti ^{1,*}, Andrea Becchimanzi ², Luigi De Masi ^{3,*}

Affiliazioni

¹ CREA - Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura, la Frutticoltura e l'Agrumicoltura (OFA), Via Torrino, 3 - 81100 Caserta

² Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Via Università, 100 - 80055 Portici (NA)

³ CNR - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Bioscienze e Biorisorse (IBBR), Via Università, 133 - 80055 Portici

* Email: rosario.nicoletti@crea.gov.it; luigi.demasi@ibbr.cnr.it

Introduzione

Il castagno europeo (*Castanea sativa* Mill.) è un albero da frutto con enorme impatto socio-economico nel settore agro-forestale, fornendo molteplici servizi ecosistemici essenziali. Studi relativamente recenti, inoltre, hanno dimostrato come la composizione dei frutti e della biomassa non utilizzabile a scopo alimentare sia rilevante ai fini salutistici [De Vasconcelos et al., 2010; Vella et al. 2019]. Nonostante ciò, per molti anni la coltivazione del castagno in Europa è stata interessata da diversi problemi, che hanno portato ad un drammatico collasso dell'intero sistema produttivo, in particolare nelle aree dove le produzioni castanicole concorrevano in misura sostanziale al reddito delle popolazioni residenti. In aggiunta ad aspetti di carattere socio-economico, la progressiva introduzione di nuovi parassiti e malattie ha causato ingenti danni alle coltivazioni di *C. sativa*, soprattutto in relazione alle varie difficoltà che connotano la gestione fitosanitaria di questa specie. Infatti, a differenza della maggior parte delle colture agrarie, il castagneto è pienamente inserito in un ecosistema montano che lo rende particolarmente esposto ai fattori biotici ed abiotici che ne disturbano l'equilibrio, e che rende problematica l'adozione di misure di controllo delle avversità con i metodi in uso nelle

aziende agrarie tradizionali. Quindi, più che in altre colture, nel caso del castagno si è affermata via via la consapevolezza che la lotta contro patogeni e parassiti andasse condotta con l'uso di metodiche ecocompatibili e in grado di ripristinare le condizioni di equilibrio alterate a seguito dell'introduzione di nuovi agenti nocivi. La visione della pianta come olobionte (un "superorganismo" formato dalla pianta ospite insieme ai suoi microrganismi simbiotici, il microbiota), introdotta da Margulis nel 1991 e recentemente affermata, ha indotto altresì a considerare tra questi metodi non solo quelli intesi ad intervenire direttamente sulla pianta (es. introduzione di ibridi resistenti) o sull'agente nocivo (es. lotta biologica), ma anche quelli basati sull'intermediazione della componente microbiologica associata [Morrison et al. 2021]. Di questa è ormai acclarato un fondamentale ruolo di supporto che si estrinseca nel miglioramento delle condizioni nutrizionali e nel cosiddetto 'mutualismo difensivo' [Saikkonen et al. 2010], quest'ultimo considerato fortemente dipendente dalla costituzione genetica della pianta [Tucci et al. 2011].

In questo capitolo vengono esaminate principalmente le proprietà dei miceti endofiti associati al castagno alla luce delle recenti acquisizioni desumibili dalla letteratura.

Il genotipo del castagno nella difesa dalle avversità

L'estremamente ampia diversità genetica oggi presente in *C. sativa*, rappresentata dalle centinaia di varietà locali e dalle popolazioni naturali, è il risultato dell'evoluzione a partire dalla variabilità naturale originaria, che nel caso delle cultivar è stata oggetto di selezione e miglioramento ad opera dell'attività umana. A conferma di ciò, numerosi studi hanno evidenziato differenze molecolari (polimorfismi) nel patrimonio genetico (genoma) di varietà tradizionali di castagno europeo mediante marcatori molecolari tradizionali [Silvanini et al. 2011], che contribuiscono a definire con certezza il "profilo del DNA" caratteristico di ciascuna varietà. Il primo studio di caratterizzazione genetico-molecolare del germoplasma varietale di *C. sativa* è stato effettuato in Italia (Galderisi et al. 1998) con fine di identificare e, successivamente, valorizzare importanti cultivar di castagno da frutto della Campania, regione con un'antichissima tradizione in castanicoltura e particolarmente rinomata per la produzione di castagne di qualità. A poca distanza, uno studio simile è stato condotto anche sul germoplasma coltivato e naturale di *C. sativa* in Calabria (De Masi et al. 2004). Più di

recente, con metodiche basate sul sequenziamento di brevi tratti del genoma, sono stati osservati nuovi polimorfismi a livello di singole basi nucleotidiche del DNA (SNP, Polimorfismo a Singolo Nucleotide) di cultivar pregiate di castagno della Campania [Nunziata et al. 2020]. Questi risultati potranno favorire l'avvio di programmi di miglioramento genetico nel castagno [Santos et al. 2017; Freitas et al. 2021]. Infatti, i marcatori SNP rappresentano potenti strumenti molecolari non solo per l'identificazione varietale, ma utilizzabili anche per far fronte alle nuove avversità e alla minaccia dei cambiamenti climatici, in quanto possono contribuire alla caratterizzazione delle risposte della pianta a stressori abiotici (temperatura, salinità, siccità etc.) e biotici (patogeni e parassiti). Nel castagno, la variabilità genetica naturale, utilizzabile come fonte di nuovi geni e nuovi alleli (varianti di uno stesso gene) per la resistenza/tolleranza a fitopatie (malattie e parassiti), è una risorsa importante ed imprescindibile per la selezione clonale e il miglioramento varietale. Nell'epoca dei cambiamenti climatici e delle nuove avversità del castagno (connesse alla globalizzazione), il miglioramento genetico (tradizionale o mediante *genome editing*) è un valido strumento a nostra disposizione per affrontare le sfide attuali e future, in quanto consente di favorire la resilienza eco-sostenibile attraverso la riduzione degli input chimici in agricoltura (pesticidi, erbicidi etc.). A livello globale, il rapido cambiamento climatico tuttora in atto è ritenuto come uno dei principali responsabili della riduzione di biodiversità negli ecosistemi castanicoli [Freitas et al. 2021].

Nel tempo, l'ambiente naturale ha fortemente contribuito nel plasmare la diversità genetica castanicola attraverso le accentuate differenze edafoclimatiche a livello locale. Difatti, se posti nelle stesse condizioni di coltivazione, alberi di varietà differenti di castagno mostrano differenti comportamenti fenologici, che sono evidentemente influenzati dalle caratteristiche genetiche individuali. Tra le differenze più evidenti a livello produttivo, la varietà 'Tempestiva' originaria di Roccamonfina (CE) è caratterizzata da una produzione molto precoce, già nella prima metà di settembre, che ne determina un particolare apprezzamento e interesse commerciale. Allo stesso modo, particolari composti biochimici sono strettamente connessi con le condizioni edafoclimatiche [Freitas et al. 2021], tuttavia a parità di condizioni di coltivazione gli stessi caratterizzano le singole varietà di castagno [Vella et al. 2019]. Complessivamente, le differenze fisiologiche, fenologiche, morfologiche, anatomiche, e biochimico-composizionali dei genotipi di castagno possono essere associate su base genetica con le loro capacità adattative ai differenti fattori locali di stress abiotici e biotici [Freitas et al.

2021]. Recenti studi hanno dimostrato come specifiche condizioni climatiche hanno influenzato la distribuzione e la fissazione di numerosi alleli portando all'adattamento locale dei castagneti naturali nel loro habitat, evidenziando così la stretta interrelazione esistente tra clima e genotipo [Castellana et al. 2021]. In altre parole, in archi di tempo estremamente lunghi, la variazione adattativa tra le popolazioni naturali ha determinato la distribuzione geografica del castagno a partire dalle caratteristiche genetiche originarie.

In Europa sono stati effettuati i primi incroci interspecifici tra *C. sativa* e *C. crenata* presso l'Istituto Nazionale per la Ricerca Agronomica (INRA, Francia) con lo scopo di introdurre nel castagno europeo i geni della resistenza al cancro della corteccia, causato da *C. parasitica*, e al mal dell'inchiostro, causato dagli oomiceti patogeni *Phytophthora cambivora* o *P. cinnamomi*. A questo proposito, è stata recentemente sviluppata la prima mappa genetica inter-specifica, derivata da popolazioni ibride di castagno euro-giapponese (*C. sativa* x *C. crenata*), che ha rivelato due regioni genetiche associate con la resistenza a *P. cinnamomi* utili per la selezione di marcatori molecolari e geni candidati [Santos et al. 2017]. I risultati ottenuti sono consistenti con un precedente studio preliminare su popolazioni ibride di castagno, *C. dentata* (americano) x *C. mollissima* (cinese), indicando l'esistenza di un meccanismo di difesa a *P. cinnamomi* comune alle diverse specie di castagno. La conoscenza approfondita delle basi genetiche della resistenza al mal dell'inchiostro e al cancro della corteccia nel genere *Castanea* consentirà di sviluppare programmi di breeding per ottenere castagni europei tolleranti/resistenti a queste malattie.

La specie aliena invasiva *Dryocosmus kuriphilus* Y. (1951), più nota nel settore come cinipide galligeno del castagno, originaria della Cina e accidentalmente introdotta in Europa per la prima volta nel 2002, ha compromesso l'intera filiera castanicola e messo a rischio la biodiversità a livello locale del castagno europeo. Le larve del cinipide causano estesi danni ai castagneti attraverso la formazione di numerose galle su gemme e foglie, riducendone l'attività fotosintetica e, di conseguenza, la crescita e la produttività. In Europa, a partire dal 2005, il controllo dell'infestazione di *D. kuriphilus* è ottenuto principalmente ricorrendo alla lotta biologica utilizzando il parassitoide *Torymus sinensis* Kamijo (1982). Una pratica comune in castanicoltura per migliorare la produzione dei frutti e del legno o i portainnesti è l'introduzione di ibridi interspecifici. Il castagno "Bouche de Bétizac" è una cultivar euro-giapponese derivata da ibridazione interspecifica tramite l'incrocio di 'Bouche Rouge' (*C. sativa*) x selezione CA04 (*C. crenata*) nel 1962, ben adattata in Europa con resistenza a diverse

avversità biotiche ed abiotiche, fornendo nel contempo castagne di buona qualità e rese elevate. L'ibrido Bouche de Bétizac è noto principalmente proprio per essere resistente all'imenottero cinipide galligeno del castagno (*D. kuriphilus* Y.). In pratica, nonostante che il cinipide riesca a deporre le uova nelle gemme dormienti di questa cultivar, nell'anno successivo lo sviluppo delle larve non raggiunge il completamento e non si formano galle. Questo effetto è causato da una repentina risposta di difesa della pianta, dovuta ad una reazione di ipersensibilità (*Hypersensitive Reaction*, HR) evocata tipicamente nelle gemme della cultivar ibrida, ma assente nelle cultivar di *C. sativa* suscettibili al cinipide come 'Madonna' [Dini et al. 2012]. Nelle piante, la HR è innescata dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), come il perossido di idrogeno H₂O₂, che conduce alla morte cellulare programmata (apoptosi) delle cellule vicine al sito di infezione con lo scopo di bloccare lo sviluppo del patogeno attraverso la privazione di sostanze nutritive e la creazione di un ambiente altamente ossidante che ne danneggia le strutture cellulari. Nella cultivar 'Bouche de Bétizac', l'analisi dell'espressione genica di un marker legato alle vie biochimiche dello stress ossidativo ha confermato che la sintesi di H₂O₂ è legata alla HR e porta alla morte della larva in risposta all'infestazione del cinipide [Dini et al. 2012].

Da studi successivi di segregazione del tratto di resistenza al cinipide nella prima generazione filiale (F1) derivante da incroci tra l'ibrido 'Bouche de Bétizac' e la cultivar di *C. sativa* 'Madonna' suscettibile al cinipide, è stato identificato un carattere monogenico (R) ereditato in maniera mendeliana semplice che determina la resistenza al cinipide [Torello-Marinoni et al. 2020]. Entrando più nel dettaglio dello studio, è stato conseguito come importante risultato l'identificazione di due geni candidati putativamente coinvolti nella risposta di resistenza al cinipide. Inoltre, recentemente, è stato rinvenuto in Campania un ecotipo di *C. sativa*, noto con la denominazione di 'Salernitano Rosso', che si è dimostrato moderatamente resistente al *D. kuriphilus* [Nugnes et al. 2018]. Sono stati anche individuati, e sono tuttora in corso di caratterizzazione, diversi genotipi locali resistenti/tolleranti al cinipide galligeno nell'ambito del Progetto Speciale Castagno presso la sede di Caserta del CREA-OFA. Questi risultati hanno un potenziale strategico per i futuri programmi di miglioramento genetico di *C. sativa*, in quanto il tratto di resistenza al cinipide può essere trasferito in maniera relativamente semplice tra alberi della stessa specie.

Complessivamente, gli studi di ibridazione interspecifica sono stati condotti per migliorare i punti di debolezza di ciascuna specie di castagno; mentre le attività di ricerca sul germoplasma castanicolo hanno consentito di caratterizzare il materiale genetico in funzione delle esigenze produttive e di resilienza, col fine di dare dei contributi concreti per fronteggiare la crisi della castanicoltura. La diversità genetica disponibile rappresenta una importante opzione eco-sostenibile per migliorare le performance dei nuovi castagneti attraverso lo sviluppo di nuove cultivar. Inoltre, la protezione dall'erosione genetica del germoplasma castanicolo *in situ* e *ex situ* è essenziale per la resilienza ai futuri e imprevedibili scenari ambientali.

Importanza dei miceti nella gestione della coltura del castagno

I funghi rappresentano senza dubbio il principale gruppo di microrganismi associati alle piante di castagno, influenzandone variamente l'adattamento ecologico. Naturalmente, in questa sede, non saranno direttamente considerati quelli che hanno un impatto negativo, sia in quanto agenti di malattie della pianta che per gli effetti da essi occasionalmente prodotti sulla qualità e la serbevolezza dei frutti.

Tra i funghi in grado di concorrere positivamente allo sviluppo e alla produzione dei castagneti, un ruolo primario è svolto dalle specie associate alle radici, molte delle quali sono meglio note come promotrici di micorrize. I funghi ectomicorrizici (EMF) che si sviluppano abbondantemente sulle estreme propaggini dell'apparato radicale sono ben documentati come simbionti delle specie di *Castanea* [Aryal et al. 2020], e forniscono indiscutibili effetti benefici all'ecosistema del castagneto. Stimolano, infatti, il rilascio di nutrienti dal complesso di adsorbimento del suolo, rendendoli disponibili alla pianta ospite. Inoltre, il costante accesso alle risorse idriche e minerali rende gli alberi più resistenti agli stress biotici e abiotici.

La composizione del complesso dei funghi micorrizici cambia con l'età degli alberi. Gli alberi maturi possono ospitare fino a 46 specie di EMF [Baptista et al. 2010], mentre 39 generi di EMF sono stati individuati sulle radici di castagni centenari [Reis et al. 2016]. I giovani castagni sono ospiti di specie 'precoci', come *Scleroderma* spp., *Laccaria* spp. e *Cenococcum geophilum*. La capacità di rapida colonizzazione di questi funghi su giovani apparati radicali, anche in condizioni di stress, può essere sfruttata per l'inoculazione in vivaio [Twieg et al. 2007; Ito e Reshi 2014]. Le specie di *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Cortinarius*, *Lactarius*, *Russula* e *Tricholoma*,

che generalmente dominano nei castagneti maturi, rivestono particolare interesse in quanto possibile fonte di ulteriori profitti per le comunità locali [Peintner et al. 2007; Martins et al. 2011]. Inoltre, sono state effettuate con successo prove che hanno dimostrato la capacità delle specie di tartufo (*Tuber aestivum*, *T. uncinatum* e *T. brumale*) di colonizzare le radici di *C. sativa*. Il recente sviluppo di protocolli per l'inoculazione con queste specie assume quindi grande rilevanza economica [Álvarez-Lafuente et al. 2018].

In termini più specificamente protettivi, degni di nota sono i casi di specie dei generi *Hebeloma*, *Laccaria* e *Paxillus*, la cui inoculazione è risultata in grado di diminuire i sintomi in piante di *C. sativa* infette dal mal dell'inchiostro causato da *P. cambivora* e *P. cinnamomi* [Branzanti et al. 1999; Blom et al. 2009].

Occorrenza di funghi endofiti del castagno

Sebbene si sviluppino anche all'interno dei tessuti vegetali, i funghi micorrizogeni non sono annoverati nella categoria degli endofiti in senso stretto. In effetti la definizione di endofiti, riferita ai funghi che più specificamente sono considerati in questo capitolo, non riflette una funzione nutrizionale specializzata e viene convenzionalmente applicata a microrganismi che colonizzano i tessuti viventi interni delle piante senza causare alcun effetto negativo immediato e manifesto [Hyde e Soyong 2008].

A parte una quantità limitata relativa ad Australia e Nuova Zelanda dove il castagno europeo è stato introdotto [Washington et al. 1999; Wadia et al. 2000], i dati relativi alla presenza di funghi endofiti in *C. sativa* sono disponibili solo da un numero limitato di paesi dell'Europa meridionale, a testimonianza del fatto che la considerazione di questa componente della biodiversità relativamente alle implicazioni ecologiche e all'impatto economico è ancora piuttosto limitata. Complessivamente sono stati finora segnalati 76 taxa, due terzi dei quali identificati a livello di specie [Nicoletti et al. 2021]. Come notazione generale, le segnalazioni riguardanti il fusto (germogli, rami, ecc.) si riferiscono alla presenza nei tessuti sottocorticali, mentre non sono stati riportati isolamenti dallo xilema forse è necessario riportare referenze recenti? [Bissegger e Sieber 1994; Wadia et al. 2000].

In alcune circostanze, le condizioni di rilevazione non consentono di risalire con certezza all'associazione endofitica. È il caso di un recente studio mirante a stabilire se le comunità fungine all'interno delle galle di

cinipidi siano, o meno, diverse da quelle degli endofiti associate a tessuti sani. I risultati ottenuti tramite sequenziamento di ITS (Spaziatori Trascritti Interni) sono stati presentati sostanzialmente con riferimento alle identificazioni a livello di specie per le unità tassonomiche principali, senza distinguerne l'origine da galla o da foglia [Fernandez-Conradi et al. 2019]. Pertanto, i dati relativi a questo studio devono essere considerati con cautela miravano a distinguere da galla o foglie ma poi non ci sono riusciti??. Alcune segnalazioni relative a funghi endofiti isolati da cancri prodotti da *Cryphonectria parasitica* sono pure connotate da incertezza [Akilli et al. 2009; Aghayeva et al. 2017; Murolo et al. 2019; Gonzalez ed Estefania 2020]. Anche se in questi casi il materiale vegetale utilizzato per gli isolamenti era sintomatico per effetto dell'infezione procurata da un patogeno noto, la procedura di sterilizzazione ha almeno assicurato che i funghi isolati avessero colonizzato i tessuti vegetali prima del prelievo, non trattandosi pertanto di contaminanti epifiti.

Funghi endofiti del castagno noti anche come agenti patogeni

Il castagno è affetto da molti patogeni fungini e oomiceti, che talvolta hanno provocato epidemie in contesti geografici più o meno estesi. In particolare, il cancro della corteccia e il mal dell'inchiostro, causati rispettivamente da *C. parasitica* e *P. cinnamomi* o *P. cambivora*, hanno richiesto misure di controllo su larga scala con l'impiego concomitante di metodi genetici, agronomici e biologici (Milgroom e Cortesi 2004; Turchetti e Maresi 2008; EFSA Panel on Plant Health 2014; Rigling e Prospero 2018). Come noto per molti altri fitopatogeni, questi funghi possono presentare uno stadio latente durante il ciclo della malattia che può dar conto del loro eventuale isolamento da tessuti asintomatici. Infatti, recenti indagini sui microrganismi simbiotici di diverse specie vegetali hanno rivelato casi in cui i patogeni fungini persistono nella condizione endofitica per periodi prolungati [Nicoletti 2019; Nicoletti et al. 2020; Salvatore et al. 2020], a sostegno dell'ipotesi che almeno alcuni ceppi potrebbero comportarsi come veri endofiti in assenza di fattori che ne stimolino la patogenicità. Nel caso di *C. sativa*, questo aspetto è stato proposto come possibile spiegazione per l'isolamento di *C. parasitica* da germogli asintomatici [Bisseger e Sieber 1994], cui ha fatto seguito una segnalazione dalla Francia riportante il re-isolamento del fungo da tessuti asintomatici avvenuto fino a sette mesi dopo l'inoculazione artificiale [Guérin e Robin 2003]. Sebbene siano stati sviluppati metodi di biologia

molecolare per la rilevazione di *C. parasitica* nei tessuti vegetali mediante *real time* PCR [Rubio et al. 2017; Chandelier et al. 2019], per quanto a nostra conoscenza finora non sono state effettuate indagini sistematiche relativamente alla diffusione endofitica di questo fungo.

L'occasionale reperimento endofitico dell'agente del cancro della corteccia del castagno non deve essere confuso con il caso ben documentato di ceppi ipovirulenti. Infatti, pur in assenza di gravi danni alle piante, il concetto di ipovirulenza riflette sostanzialmente l'instaurarsi di un'interazione di carattere patologico [Rigling e Prospero 2018]. D'altra parte, è anche da considerare che i ceppi ipovirulenti possono essere re-isolati da cancri guariti in piante dove erano stati inoculati sperimentalmente, anche a una certa distanza dai tessuti sintomatici [Coelho et al. 2021]. Considerando che la famiglia *Cryphonectriaceae* comprende principalmente specie con habitus endofitico [Mausse-Sitoe et al. 2016; Granados et al. 2020], la diffusione di ceppi ipovirulenti all'interno del castagno, sia dopo inoculazione sia in conseguenza della dispersione naturale, rappresenta un caso studio meritevole di essere analizzato a fondo in vista di una valutazione formale su come considerare queste interazioni ecologiche *border line*. In effetti, osservazioni recenti sembrano supportare la congettura che i micovirus possano interagire direttamente con il genoma dei funghi e convertire i patogeni necrotrofi in endofiti non dannosi, o addirittura benefici [Zhang et al. 2020; Zhou et al. 2021]. Inoltre, vi è da considerare l'evidenza che la transizione patogena in *C. parasitica* possa essere stata guidata dalla perdita di geni implicati nel metabolismo dei carboidrati [Stauber et al. 2020].

Altre specie fungine note per la patogenicità su castagno sono state anche segnalate come endofite. Tra queste sono state individuate occasionalmente specie causanti cancri e deperimento, come *Coryneum modonium* (= *Melanconia modonia*) [Adamčíková et al. 2013], *Diplodina castaneae* (= *Sirococcus castaneae*), meglio conosciuta come agente della malattia di Javart del castagno [Meyer et al. 2017], e *Dendrostoma castaneum* [Bissegger e Sieber 1994; Sieber et al. 2007]. Quest'ultimo rappresenta un nuovo nome per *Amphiporthe castanea* (*Diaporthales*, *Erythrogloeaceae*) [Jaklitsch e Voglmayr 2019], già nota per essere diffusa in Europa su *C. sativa*; probabilmente questa specie è trasmessa in modo verticale, essendo stata verificata la sua capacità di infettare i frutti prima della raccolta [Sieber et al. 2007]. La recente descrizione di altre specie castanicole di *Dendrostoma* [Jaklitsch e Voglmayr 2019] richiede ulteriori accertamenti in merito alla reale natura delle relazioni simbiotiche. *Botryosphaeria dothidea*, ben nota per la sua attitudine endofitica [Slippers e Wingfield 2007;

Marsberg et al. 2017], è stata segnalata come causa di cancri nella regione turca del Mar Nero [Akilli et al. 2009], e di marciume dei frutti in Croazia, unitamente a *Diaporthe eres* [Ivić e Novak 2018]. Altri funghi che danneggiano i frutti sono gli agenti del marciume bruno e del marciume rosa, rispettivamente *Sclerotinia pseudotuberosa* (= *Ciboria batschiana*) [Maresi et al. 2013] e *Colletotrichum acutatum* [Gaffuri et al. 2017]; e inoltre *Trichothecium roseum*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, specie di *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor*, e il già citato *D. castaneum*, la cui incidenza nel determinare l'ammuffimento delle castagne è sostanzialmente secondaria alle erosioni provocate dalle larve di tignola e punteruolo [Sieber et al. 2007]. Viceversa, finora non vi sono segnalazioni riguardanti la presenza endofitica dell'agente della maculatura fogliare, *Mycosphaerella maculiformis* [Vannini et al. 2018], e di *Fistulina hepatica*, che causa lo scolorimento e l'arrossamento del legno di castagno [Yurkewich et al. 2017].

Da ultima, ma non per questo meno importante, *Gnomoniopsis castaneae* (= *G. smithogilvyi*) [Shuttleworth et al. 2012] è recentemente diventata la specie fungina di maggior rilievo associata alle castagne risultando in grado di stabilire vari tipi di interazione, probabilmente anche in relazione alla capacità di particolari ceppi di produrre fitotossine, o altri composti eventualmente coinvolti nella patogenesi [Vinale et al. 2014]. Caratterizzata circa 10 anni fa [Visentin et al. 2012], dopo essere stata in un primo tempo rinvenuta in castagneti nei pressi di Cuneo e descritta come *Gnomonia pascoe* (= *Discula pascoe*) [Gentile et al. 2009], essa è stata riscontrata come endofita in diverse parti della pianta, ma è altresì capace di indurre sintomi di malattia sui frutti maturi. Gli accertamenti condotti hanno messo in luce come in realtà questa specie fosse già nota in tassonomia fin dal 1879 con il nome *Phoma endogena* [Spegazzini 1879]. In seguito, in diverse segnalazioni indipendenti furono utilizzati i nomi *Phomopsis endogena*, *Phomopsis castanea* e *Phomopsis viterbensis*, che ora sono considerati sinonimi sulla base di immagini e descrizioni, non essendo più possibile un confronto diretto [Maresi et al. 2013]. Come accennato in precedenza per *D. castaneum*, anche di questa specie è stata riportata la possibilità di trasmissione verticale [Washington et al. 1999]. Sebbene a volte il fungo sia associato a cancri, la maggior parte dei rinvenimenti riguarda i frutti. Inoltre, è stato descritto come agente di danni alle foglie e ai germogli, e più recentemente riportato come causa di cancro dei rametti in India e in Europa [Dar e Rai 2015; Pasche et al. 2016a]. La recente messa a punto di saggi molecolari rapidi per l'identificazione

direttamente nei tessuti vegetali [Turco et al. 2021; Vettrai et al. 2021] consentirà di ottenere un quadro più definito della sua capacità di colonizzare le piante in maniera asintomatica.

Mutualismo dei miceti endofiti del castagno

Oltre ad avere un effetto diretto sul patogeno, i ceppi ipovirulenti di *C. parasitica* possono influenzare il decorso del cancro della corteccia interferendo con lo sviluppo degli endofiti. A questo proposito, un'indagine condotta in Portogallo ha mostrato che, con l'unica eccezione di *Penicillium glabrum*, i funghi endofiti risultano meno abbondanti dentro e intorno ai cancri guariti dopo il trattamento con ceppi ipovirulenti [Coelho et al. 2021]. Le interazioni tra *C. parasitica* e funghi endofiti hanno certamente un impatto sull'evoluzione della malattia, e meritano di essere approfondite. In linea generale, l'attitudine antagonista nei confronti dei ceppi ipovirulenti è maggiore rispetto ai ceppi virulenti, il che implica che alcuni endofiti potrebbero compromettere l'efficacia del controllo biologico interferendo negativamente con la naturale diffusione dei primi [Coelho et al. 2021].

Oltre al potenziale ruolo antagonista nei confronti di *C. parasitica* riconosciuto a *G. castaneae* e *C. acutatum* [Meyer et al. 2015], diverse specie fungine sono state segnalate per un possibile coinvolgimento nella difesa del castagno contro parassiti e agenti patogeni, rappresentando così esempi della relazione simbiotica ecologica descritta come mutualismo difensivo [Saikkonen et al. 2010]. Questo elenco comprende *Epicoccum nigrum*, *Fusarium lateritium*, *Paraconiothyrium brasiliense*, ma anche specie di *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Penicillium* e *Pestalotiopsis* sono frequentemente citate in indagini condotte al riguardo, con particolare riferimento alla produzione di composti bioattivi [Nicoletti et al. 2014; Fatima et al. 2016; Deshmukh et al. 2017; El-hawary et al. 2020]. Tuttavia, in questo senso, il ruolo più efficace è probabilmente svolto dalle specie di *Trichoderma*, che indubbiamente rappresentano gli antagonisti dei funghi fitopatogeni più considerati in termini di impiego pratico in lotta biologica [Tucci et al. 2011]. Diverse specie di questo genere sono state isolate da piante di castagno, con indicazioni di un probabile coinvolgimento diretto nella difesa contro *C. parasitica*. In particolare, *T. atroviride* è stato individuato come endofita in foglie sane [Muñoz-Adalia et al. 2019]. Inoltre, sono stati documentati effetti antagonisti di questa specie contro *G. castaneae* su talee innestate [Pasche et al. 2016b],

mentre altri studi hanno dimostrato l'efficacia dei ceppi di *Trichoderma* nel ridurre i sintomi del cancro corticale [Tattar et al. 1996; Akilli et al. 2011; Murolo et al. 2019]. Infine, in altri studi la valutazione delle proprietà antagoniste nei confronti di *C. parasitica* è stata limitata a saggi *in vitro*, dove una certa efficacia è stata osservata per ceppi di *Pezizula cinnamomea* [Bissegger e Sieber 1994], *Penicillium spp.* [Murolo et al. 2019] e *Neopestalotopsis zimbabwana* [González e Estefanía 2020].

Relazioni tra miceti endofiti e cinipidi galligeni

Come precedentemente anticipato, i funghi segnalati nelle galle causate dal cinipide *D. kuriphilus* Y. [Cooper e Rieske 2010] non sono da considerarsi endofiti in senso stretto, dato che si sviluppano in tessuti vegetali alterati. Tuttavia, molte indagini condotte su questa avversità biologica hanno considerato il possibile ruolo di funghi associati alle galle in relazione alla loro derivazione endofitica.

La vera natura delle interazioni tra cinipidi e funghi non è ancora stata delucidata. Associazioni sistematiche sono state accertate per altri insetti galligeni, come i Ditteri Asfondiliini, che indipendentemente dalla pianta ospite risultano costantemente associati al già citato micete cosmopolita *B. dothidea*, sulla base di una relazione di carattere trofico [Zimowska et al. 2020]. Viceversa, nel caso di *D. kuriphilus* le indicazioni non sono univoche. Un'indagine condotta in Svizzera ha mostrato l'esistenza di un possibile legame tra cinipidi e l'aumento della diffusione dell'agente del cancro della corteccia. Infatti, le galle abbandonate sono risultate frequentemente colonizzate da ceppi virulenti di *C. parasitica*, e ritenute possibili punti di partenza di nuove infezioni; allo stesso tempo, tale associazione è sembrata essere più rilevante nelle stazioni in cui l'insetto risultava residente da più tempo [Meyer et al. 2015]. Nonostante ciò, in uno studio dedicato, il fungo non è stato rinvenuto sul corpo degli adulti emergenti dalle galle, il che sembra escludere il loro possibile ruolo come vettori. Tuttavia, il ritrovamento di alcuni endofiti, come *C. acutatum*, *G. castaneae* e *E. nigrum*, rappresenta un'indicazione della capacità dei cinipidi di agire in tal senso, il che riveste possibile rilievo epidemiologico [Gaffuri et al. 2015; Morales-Rodriguez et al. 2019]. È interessante notare come le stesse specie fungine siano state isolate da galle di cinipidi in uno studio condotto in Spagna [Muñoz-Adalia et al. 2019], e ancora nel corso della già citata indagine svizzera mirante all'approfondimento del loro ruolo nelle relazioni tripartite con piante e insetti

[Meyer et al. 2015]. Oltre alle tre specie di cui sopra, quest'ultimo studio riporta una lunga serie di funghi associati alle galle, molti dei quali noti anche come endofiti del castagno, tra cui *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Biscogniauxia mediterranea*, *B. dothidea*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *Hyphodermella rosae*, *Neocucurbitaria cava*, *Nigrospora oryzae*, *P. brasiliense*, *P. glabrum*, *T. citrinoviride* e *T. harzianum*.

Un altro patogeno/endofita del castagno già citato, *D. castaneae*, è stato isolato diffusamente da galle di cinipidi necrotiche in diverse località dell'Azerbaijan e della Svizzera [Meyer et al. 2017]. In effetti, si pensa che la degenerazione necrotica della galla influisca gravemente sulla vitalità di *D. kuriphilus*. Indagini specifiche su *G. castaneae* hanno mostrato un aumento esponenziale della necrosi delle galle durante la stagione estiva??, raggiungendo il 75,4% a metà luglio. Questo processo, che può essere innescato da endofiti residenti, potrebbe condurre ad un efficace controllo del cinipide nei castagneti, ma l'elevata attitudine patogena a carico dei frutti preclude l'uso di questo fungo nelle strategie di lotta biologica [Vannini et al. 2017; Morales-Rodriguez et al. 2021].

Ad ogni modo, la questione delle relazioni tra il cinipide galligeno e *G. castaneae* rimane piuttosto controversa. Infatti, in un altro studio il fungo non è mai stato isolato dagli insetti, suggerendo l'improbabilità che *D. kuriphilus* possa agire come vettore di inoculo vitale. In effetti il fungo risultava essere presente nel 33,8% delle gemme già prima dell'ovideposizione, e nessuna associazione tra colonizzazione fungina e ovodeposizione è stata rilevata. Inoltre, il numero di adulti emergenti è risultato significativamente più alto da galle colonizzate da *G. castaneae* rispetto a quelle non colonizzate, indicando una possibile sinergia tra fungo e insetto. Questi risultati suggeriscono che l'associazione simbiotica viene a stabilirsi dopo l'ovideposizione ed è asimmetricamente favorevole all'insetto [Lione et al. 2016, 2019].

Conclusioni

Come per altre specie coltivate, le nostre conoscenze sull'effettivo impatto dei funghi endofiti sullo sviluppo vegetativo e sulle rese economiche del castagno sono ancora in una fase preliminare. La misura in cui la ricerca in questo specifico campo potrà tradursi in evidenze più chiare e in applicazioni pratiche dipende fondamentalmente dalla capacità di caratterizzare in maniera più accurata gli assortimenti di specie che si

determinano nelle diverse condizioni climatiche e fitosanitarie, con particolare riferimento al possibile mutamento nel ruolo ecologico documentato per molte specie fungine. In effetti, il ruolo fondamentale dell'interazione tra specie diverse è ormai diffusamente riconosciuto, in particolare per le piante forestali. Nel caso del castagno appaiono inoltre necessarie indagini più approfondite finalizzate a una migliore comprensione della natura dei processi che portano alla conversione endofita/patogeno, anche con riferimento alla diversità genetica in *C. sativa* e agli effetti indotti dal cambiamento climatico.

Riferimenti bibliografici

- Adamčíková, K.; Juhásová, G.; Kobza, M.; Ondrušková, E. Diversity of microfungi on branches of *Castanea sativa* in Slovakia. *Pol. Bot. J.* **2013**, *58*, 741–746.
- Aghayeva, D.N.; Rigling, D.; Meyer, J.B.; Mustafabeyli, E. Diversity of fungi occurring in the bark of *Castanea sativa* in Azerbaijan. *Acta Hort.* **2017**, *1220*, 79–86.
- Akilli S.; Katircioğlu, Y.Z.; Maden, S. Chestnut blight cankers in black sea region of Turkey. *Acta Hort.* **2009**, *815*, 247–252.
- Akilli, S.; Katircioğlu, Y.Z.; Maden, S. Biological control of chestnut canker, caused by *Cryphonectria parasitica*, by antagonistic organisms and hypovirulent isolates. *Turkish J. Agric. For.* **2011**, *35*, 515–523.
- Álvarez-Lafuente, A.; Benito-Matías, L.F.; Peñuelas-Rubira, J.L.; Suz, L.M. Multi-cropping edible truffles and sweet chestnuts: production of high-quality *Castanea sativa* seedlings inoculated with *Tuber aestivum*, its ecotype *T. uncinatum*, *T. brumale*, and *T. macrosporum*. *Mycorrhiza* **2018**, *28*, 29–38.
- Aryal, P.; Meiners, S.J.; Carlsward, B.S. Ectomycorrhizae determine chestnut seedling growth and drought response. *Agrofor. Sys.* **2020**, doi.org/10.1007/s10457-020-00488-4.
- Baptista, P.; Martins, A.; Tavares, R.M.; Lino-Neto, T. Diversity and fruiting pattern of macrofungi associated with chestnut (*Castanea sativa*) in the Trás-os-Montes region (Northeast Portugal). *Fungal Ecol.* **2010**, *3*, 9–19.
- Bissegger, M.; Sieber, T.N. Assemblages of endophytic fungi in coppice shoots of *Castanea sativa*. *Mycologia* **1994**, *86*, 648–655.

- Blom, J.M.; Vannini, A.; Vettraiño, A.M.; Hale, M.D.; Godbold, D.L. Ectomycorrhizal community structure in a healthy and a *Phytophthora*-infected chestnut (*Castanea sativa* Mill.) stand in central Italy. *Mycorrhiza* **2009**, *20*, 25–38.
- Branzanti, M.B.; Rocca, E.; Pisi, A. Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza* **1999**, *9*, 103–109.
- Castellana, S.; Martín, M.Á.; Solla, A.; Alcaide, F.; Villani, F.; Cherubini, M.; Neale, D.; Mattioni, C. Signatures of local adaptation to climate in natural populations of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) from southern Europe. *Ann. For. Sci.* **2021**, *78*. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01027-6>
- Chandelier, A.; Massot, M.; Fabreguettes, O.; Gischer, F.; Teng, F.; Robin, C. Early detection of *Cryphonectria parasitica* by real-time PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* **2019**, *153*, 29–46.
- Coelho, V.; Nunes, L.; Gouveia, E. Short and long term efficacy and prevalence of *Cryphonectria parasitica* hypovirulent strains released as biocontrol agents of chestnut blight. *Eur. J. Plant Pathol.* **2021**, doi.org/10.1007/s10658-021-02200-3.
- Cooper, W.R.; Rieske, L.K. Gall structure affects ecological associations of *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae). *Environ. Entomol.* **2010**, *39*, 787–797.
- Dar, M.A.; Rai, M.K. *Gnomoniopsis smithogilvyi* a canker causing pathogen on *Castanea sativa*: first report. *Mycosphere* **2015**, *6*, 327–336.
- De Masi, L.; Castaldo, D.; Minasi, P.; Laratta, B. Caratterizzazione e certificazione di qualità di fico e castagno calabresi attraverso moderne tecniche di biologia molecolare. *Monografia della Stazione Sperimentale per l'Industria delle Essenze e dei Derivati dagli Agrumi*, **2004**, Reggio Calabria.
- Deshmukh, S.K.; Prakash, V.; Ranjan, N. Recent advances in the discovery of bioactive metabolites from *Pestalotiopsis*. *Phytochem. Rev.* **2017**, *16*, 883–920.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH). Scientific opinion on the pest categorisation of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. *EFSA J.* **2014**, *12*, 3859.
- El-hawary, S.S.; Moawad, A.S.; Bahr, H.S.; Abdelmohsen, U.R., Mohammed, R. Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. *RSC Advan.* **2020**, *10*, 22058–22079.

- Fatima, N.; Muhammad, S.A.; Khan, I.; Qazi, M.A.; Shahzadi, I.; Mumtaz, A.; Hashmi, M.A., Khan, A.K., Ismail, T. *Chaetomium* endophytes: a repository of pharmacologically active metabolites. *Acta Physiol. Plant.* **2016**, *38*, 136.
- Fernandez-Conradi, P.; Fort, T.; Castagneyrol, B.; Jactel, H.; Robin, C. Fungal endophyte communities differ between chestnut galls and surrounding foliar tissues. *Fungal Ecol.* **2019**, *42*, 100876.
- Freitas, T.R.; Santos, J.A.; Silva, A.P.; Fraga, H. Influence of climate change on chestnut trees: A review. *Plants* **2021**, *10*, 1463. <https://doi.org/10.3390/plants10071463>
- Gaffuri, F.; Longa, C.M.O.; Turchetti, T.; Danti, R.; Maresi, G. 'Pink rot': infection of *Castanea sativa* fruits by *Colletotrichum acutatum*. *Forest Pathol.* **2017**, *47*, e12307.
- Gaffuri, F.; Maresi, G.; Pedrazzoli, F.; Longa, C.M.O.; Boriani, M.; Molinari, M.; Tantardini, A.; Sieber, T. *Colletotrichum acutatum* associated with *Dryocosmus kuriphilus* galls on *Castanea sativa*. *For. Pathol.* **2015**, *45*, 169–171.
- Galderisi, U.; Cipollaro, M.; Di Bernardo, G.; De Masi, L.; Galano, G.; Cascino, A. Molecular typing of Italian sweet chestnut cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Hort. Sci. Biotech.* **1998**, *73*(2), 259–263. <https://doi.org/10.1080/14620316.1998.11510973>
- Gentile, S.; Valentino, D.; Visentin, I.; Tamietti, G. An epidemic of *Gnomonia pascoe* on nuts of *Castanea sativa* in the Cuneo area. *Acta Hort.* **2009**, *866*, 363–368.
- González, A.J.; Estefanía, T. Strains of *Neopestalotiopsis* sp. are in vitro antagonists of *Cryphonectria parasitica*. *Biol. Contr.* **2020**, *143*, 104187.
- Granados, G.M.; McTaggart, A.R.; Rodas, C.A.; Roux, J.; Wingfield, M.J. Species of Cryphonectriaceae occupy an endophytic niche in the Melastomataceae and are putative latent pathogens of *Eucalyptus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2020**, *156*, 273–283.
- Grünig, C.R.; Quelo, V.; Duò, A., Sieber, T.N. Phylogeny of *Phaeomollisia piceae* gen. sp. nov.: a dark, septate, conifer-needle endophyte and its relationships to *Phialocephala* and *Acephala*. *Mycol. Res.* **2009**, *113*, 207–221.
- Guérin, L.; Robin, C. Seasonal effect on infection and development of lesions caused by *Cryphonectria parasitica* in *Castanea sativa*. *Forest Pathol.* **2003**, *33*, 223–235.

- Hyde, K.D.; Soyong, K. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Div.* **2008**, *33*, 163–173.
- Ito, Z.; Reshi, Z. Influence of ectomycorrhizal inoculation on *Pinus wallichiana* and *Cedrus deodara* seedlings under nursery conditions. *Front. Biol.* **2014**, *9*, 82–88.
- Ivić, D.; Novak, A. Glijive povezane s truleži plodova pitomog kestena, s prvim nalazom *Gnomoniopsis smithogilvyi* u Hrvatskoj. *Pomologia Croatica: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva* **2018**, *22*, 13–22.
- Jaklitsch, W.M.; Voglmayr, H. European species of *Dendrostoma* (Diaporthales). *MycKeys* **2019**, *59*, 1.
- Lione, G.; Giordano, L.; Ferracini, C.; Alma, A.; Gonthier, P. Testing ecological interactions between *Gnomoniopsis castaneae* and *Dryocosmus kuriphilus*. *Acta Oecol.* **2016**, *77*, 10–17.
- Lione, G.; Danti, R.; Fernandez-Conradi, P.; Ferreira-Cardoso, J.V.; Lefort, F.; Marques, G.; Meyer, J.B.; Prospero, S.; Radocz, L.; Robin, C.; Turchetti, T.; Vettraino, A.M.; Gonthier, P. The emerging pathogen of chestnut *Gnomoniopsis castaneae*: the challenge posed by a versatile fungus. *Eur. J. Plant Pathol.* **2019**, *153*, 671–685.
- Maresi, G.; Oliveira Longa, C.M.; Turchetti, T. Brown rot on nuts of *Castanea sativa* Mill: an emerging disease and its causal agent. *iForest – Biogeosci. For.* **2013**, *6*, 294–301.
- Marsberg, A.; Kemler, M.; Jami, F.; Nagel, J.H.; Postma-Smidt, A.; Naidoo, S.; Wingfield, M.J.; Crous, P.W.; Spatafora, J.W.; Hesse, C.N.; et al. Botryosphaeria dothidea: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Mol. Plant Pathol.* **2017**, *18*, 477–488.
- Martins, A.; Marques, G.; Borges, O.; Portela, E.; Lousada, J.; Raimundo, F.; Madeira, M. Management of chestnut plantations for a multifunctional land use under Mediterranean conditions: effects on productivity and sustainability. *Agrofor. Syst.* **2011**, *81*, 175–189.
- Mausse-Sitoe, S.N.; Rodas, C.A.; Wingfield, M.J.; Chen, S.; Roux, J. Endophytic Cryphonectriaceae on native Myrtales: Possible origin of *Chrysosporthe* canker on plantation-grown *Eucalyptus*. *Fungal Biol.* **2016**, *120*, 827–835.
- Meyer, J.B.; Gallien, L.; Prospero, S. Interaction between two invasive organisms on the European chestnut: does the chestnut blight fungus benefit from the presence of the gall wasp? *FEMS Microbiol. Ecol.* **2015**, *91*, fiv122.

- Meyer, J.B.; Trapiello, E.; Senn-Irlet, B.; Sieber, T.N.; Cornejo, C.; Aghayeva, D.; González A.J.; Prospero, S. Phylogenetic and phenotypic characterisation of *Sirococcus castaneae* comb. nov. (synonym *Diplodina castaneae*), a fungal endophyte of European chestnut. *Fungal Biol.* **2017**, *121*, 625–637.
- Milgroom, M.G.; Cortesi, P. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **2004**, *42*, 311–338.
- Morales-Rodriguez, C.; Sferrazza, I.; Aleandri, M.; Dalla Valle, M.; Mazzetto, T.; Speranza, S.; Contarini, M.; Vannini, A. Fungal community associated with adults of the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* after emergence from galls: Taxonomy and functional ecology. *Fungal Biol.* **2019**, *123*, 905–912.
- Morales-Rodriguez, C.; Bastianelli, G.; Caccia, R.; Bedini, G.; Massantini, R.; Moscetti, R.; Vannini, A. Impact of ‘brown rot’ caused by *Gnomoniopsis castanea* on chestnut fruits during the post-harvest process: critical phases and proposed solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2021**, <https://doi.org/10.1002/jsfa.11397>.
- Morrison, E.W.; Kasson, M.; Heath, J.; Garnas, J. Pathogen and endophyte assemblages co-vary with beech bark disease progression, tree decline, and regional climate. *Front. For. Glob. Change* **2021**, [10.3389/ffgc.2021.673099](https://doi.org/10.3389/ffgc.2021.673099).
- Muñoz-Adalia, E.J.; Rodríguez, D.; Casado, M.; Diez, J.; Fernández, M. Fungal community of necrotic and healthy galls in chestnut trees colonized by *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera, Cynipidae). *I-Forest* **2019**, *12*, 411–417.
- Murolo, S.; Concas, J.; Romanazzi, G. Use of biocontrol agents as potential tools in the management of chestnut blight. *Biol. Contr.* **2019**, *132*, 102–109.
- Nicoletti, R. Endophytic fungi of citrus plants. *Agriculture* **2019**, *9*, 247.
- Nicoletti, R.; Beccaro, G.L.; Sekara, A.; Cirillo, C.; Di Vaio, C. Endophytic fungi and ecological fitness of chestnuts. *Plants* **2021**, *10*, 542. <https://doi.org/10.3390/plants10030542>
- Nicoletti, R.; Di Vaio, C.; Cirillo, C. Endophytic fungi of olive tree. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1321.
- Nicoletti, R.; Fiorentino, A.; Scognamiglio, M. Endophytism of *Penicillium* species in woody plants. *Open Mycol. J.* **2014**, *8*, 1–26.

- Nunziata, A.; Ruggieri, V.; Petriccione, M.; De Masi, L. Single nucleotide polymorphisms as practical molecular tools to support European chestnut agrobiodiversity management. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4805. <https://doi.org/10.3390/ijms21134805>
- Pasche, S.; Calmin, G.; Auderset, G.; Crovadore, J.; Pelleteret, P.; Mauch-Mani, B.; Barja, F.; Paul, B.; Jermini, M.; Lefort, F. *Gnomoniopsis smithogilyvi* causes chestnut canker symptoms in *Castanea sativa* shoots in Switzerland. *Fungal Genet. Biol.* **2016a**, *87*, 9–21.
- Pasche, S.; Crovadore, J.; Pelleteret, P.; Jermini, M.; Mauch-Mani, B.; Oszako, T.; Lefort, F. Biological control of the latent pathogen *Gnomoniopsis smithogilyvi* in European chestnut grafting scions using *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma atroviride*. *Dendrobiology* **2016b**, *75*, 113–122.
- Peintner, U.; Iotti, M.; Klotz, P.; Bonuso, E.; Zambonelli, A. Soil fungal communities in a *Castanea sativa* (chestnut) forest producing large quantities of *Boletus edulis sensu lato* (porcini): where is the mycelium of porcini? *Environ. Microbiol.* **2007**, *9*, 880–889.
- Reis, F.; Pereira, E.; Tavares, M.; Baptista, P.; Lino-Neto, T. Fungal community in chestnut orchards with different *Hypholoma fasciculare* above-ground abundance: potential implications for sustainable production. *Rev. Ciências Agr.* **2016**, *40*, 124–132.
- Rigling, D.; Prospero, S. *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Mol. Plant Pathol.* **2018**, *19*, 7–20.
- Rubio, S.; Barnes, A.; Webb, K.; Hodgetts, J. A real-time PCR assay for improved rapid, specific detection of *Cryphonectria parasitica*. *Ann. Appl. Biol.* **2017**, *171*, 52–61.
- Saikkonen, K.; Saari, S.; Helander, M. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Divers.* **2010**, *41*, 101–113.
- Salvatore, M.M.; Andolfi, A.; Nicoletti, R. The thin line between pathogenicity and endophytism: The case of *Lasiodiplodia theobromae*. *Agriculture* **2020**, *10*, 488.
- Santos, C.; Nelson, C.D.; Zhebentyayeva, T.; Machado, H.; Gomes-Laranjo, J.; Costa, R.L. First interspecific genetic linkage map for *Castanea sativa* x *Castanea crenata* revealed QTLs for resistance to *Phytophthora cinnamomi*. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184381>

- Shuttleworth, L.A.; Guest, D.I.; Liew, E.C.Y. Fungal planet description sheet 108 – *Gnomoniopsis smithogilvyi*, *sp. nov. Persoonia* **2012**, 28, 142–143.
- Sieber, T.N.; Jermini, M.; Conedera, M. Effects of the harvest method on the infestation of chestnuts (*Castanea sativa*) by insects and moulds. *J. Phytopathol.* **2007**, 155, 497–504.
- Silvanini, A.; Marinoni, D. T.; Beccaro, G. L.; Ganino, T. La caratterizzazione varietale del germoplasma di *Castanea sativa* Mill. *Italus Hortus* 2011, 18(3), 47-61.
- Slippers, B.; Wingfield, M.J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biol. Rev.* **2007**, 21, 90–106.
- Spegazzini, C. Nova addenda ad Mycologiam Venetam. *Michelia* **1879**, 1, 453–487.
- Stauber, L.; Prospero, S.; Croll, D. Comparative genomics analyses of lifestyle transitions at the origin of an invasive fungal pathogen in the genus *Cryphonectria*. *Mosphere* **2020**, 5, e00737–20.
- Tattar, T.A.; Berman, P.M.; González, E.Y.; Mount, M.S.; Dolloff, A.L. Biocontrol of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Arboricult. J.* **1996**, 20, 449–469.
- Torello Marinoni, D.; Nishio, S.; Valentini, N.; Shirasawa, K.; Acquadro, A.; Portis, E.; Alma, A.; Akkak, A.; Pavese, V.; Cavalet-Giorsa, E.; Botta, R. Development of high-density genetic linkage maps and identification of loci for chestnut gall wasp resistance in *Castanea* spp. *Plants* 2020, 9, 1048. <https://doi.org/10.3390/plants9081048>
- Tucci, M.; Ruocco, M.; De Masi, L.; De Palma, M.; Lorito, M. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol. Plant Pathol.* **2011**, 12(4): 341-354. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x>
- Turchetti, T.; Maresi, G. Biological control and management of chestnut diseases. In *Integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria* Springer, Dordrecht, 2008, 85–118.
- Turco, S., Bastianelli, G., Morales-Rodríguez, C., Vannini, A., & Mazzaglia, A. (2021). Development of a TaqMan qPCR assay for the detection and quantification of *Gnomoniopsis castaneae* in chestnut tissues. *Forest Pathology*, e12701.
- Twieg, B.D.; Durall, D.M.; Simard, S.W. Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytol.* **2007**, 176, 437–447.

- Vannini, A.; Vettraiño, A.; Martignoni, D.; Morales-Rodriguez, C.; Contarini, M.; Caccia, R.; Papparatti, B.; Speranza, S. Does *Gnomoniopsis castanea* contribute to the natural biological control of chestnut gall wasp? *Fungal Biol.* **2017**, *121*, 44–52.
- Vannini, A.; Morales-Rodriguez, C.; Aleandri, M.; Bruni, N.; Dalla Valle, M.; Mazzetto, T.; Martignoni, D.; Vettraiño, A. Emerging new crown symptoms on *Castanea sativa* (Mill.): attempting to model interactions among pests and fungal pathogens. *Fungal Biol.* **2018**, *122*, 911–917.
- Vella, F.M.; De Masi, L.; Morana, A.; Calandrelli, R.; Laratta, B. Valorization of the agro-forestry wastes from Italian chestnut cultivars for the recovery of bioactive compounds. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245*(12): 2679–2686. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03379-w>
- Vettraiño, A.M.; Luchi, N.; Rizzo, D.; Pepori, A.L.; Pecori, F.; Santini, A. Rapid diagnostics for *Gnomoniopsis smithogilvyi* (syn. *Gnomoniopsis castaneae*) in chestnut nuts: new challenges by using LAMP and real-time PCR methods. *AMB Express* **2021**, *11*, 1-11.
- Vinale, F.; Ruocco, M.; Manganiello, G.; Guerrieri, E.; Bernardo, U.; Mazzei, P.; Piccolo, A.; Sannino, F.; Caira, S.; Woo, S.L.; Lorito, M. Metabolites produced by *Gnomoniopsis castanea* [sic] associated with necrosis of chestnut galls. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2014**, *6*, 294–301.
- Visentin, I.; Gentile, S.; Valentino, D.; Gonthier, P.; Cardinale, F. *Gnomoniopsis castanea* sp. nov. (Gnomoniaceae, Diaporthales) as the causal agent of nut rot in sweet chestnut. *J. Plant Pathol.* **2012**, 411–419.
- Wadia, K.D.R.; Klinac, D.; McNeil, D.L.; Osmonaliev, A.; Stewart, A.; Knowles, R.D. Occurrence of *Phomopsis castanea* as an endophyte in chestnut trees. *New Zealand Plant Prot.* **2000**, *53*, 133–137.
- Washington, W.S.; Hood, V.; Stewart-Wade, S. *Phomopsis castanea*, a seed-borne endophyte in chestnut trees. *Austr. J. Bot.* **1999**, *47*, 77–84.
- Yurkewich, J.I.; Castaño, C.; Colinas, C. Chestnut red stain: Identification of the fungi associated with the costly discolouration of *Castanea sativa*. *Forest Pathol.* **2017**, *47*, e12335.
- Zhang, H.; Xie, J.; Fu, Y.; Cheng, J.; Qu, Z.; Zhao, Z.; Cheng, S.; Chen, T.; Li, B.; Wang, Q.; Liu, X.; Tian, B.; Collinge, D.B.; Jiang, D. A 2-kb mycovirus converts a pathogenic fungus into a beneficial endophyte for *Brassica* protection and yield enhancement. *Mol. Plant* **2020**, *13*, 1420–1433.

- Zhou, L.; Li, X.; Kotta-Loizou, I.; Dong, K.; Li, S.; Ni, D.; Wang, G.; Xu, W. A mycovirus modulates the endophytic and pathogenic traits of a plant associated fungus. *ISME J.* **2021**. doi.org/10.1038/s41396-021-00892-3.
- Zimowska, B.; Okoń, S.; Becchimanzi, A.; Krol, E.D.; Nicoletti, R. Phylogenetic characterization of *Botryosphaeria* strains associated with *Asphondylia* galls on species of Lamiaceae. *Diversity* **2020**, *12*, 41.

Attività agronomiche e studi di fattibilità di un'azienda castanicola pilota

Mario Conti^{1*}, **Franco Di Pippo**^{2*}

Affiliazioni

¹ Consulente Perito Agrario, Piazza Nicola Amore, 11 - 81035 Roccamonfina (CE)

² Azienda Agricola "Franco Di Pippo", Via Napoli, 50 - 81035 Roccamonfina

* Email: mario_conti@hotmail.it; dipippo franco52@gmail.com

Il progetto "Castarray", il cui nome fonde quello del noto albero da frutto e del vetrino microarray utilizzato per esaminare simultaneamente la presenza di moltissime sequenze all'interno di un campione di DNA, è stato finanziato dall'Azione 1 nell'ambito della Misura 16.1.1 "Sostegno per la costituzione e funzionamento dei Gruppi Operativi (GO) del Partenariato Europeo per l'Innovazione (PEI) in materia di produttività e sostenibilità dell'agricoltura" del Programma di Sviluppo Rurale (PSR) della Regione Campania nel periodo 2014-2020. I possibili sviluppi di questo progetto risiedono nella possibilità di certificare le cultivar di castagno attualmente esistenti sul territorio e attuare strategie di miglioramento varietale per selezionare fenotipi migliorativi, ad es. resistenti alle avversità biotiche e abiotiche.

Gli studi di fattibilità tecnica ed economica sono stati realizzati utilizzando i dati raccolti presso l'azienda agricola "Franco Di Pippo" situata nel territorio del comune di Roccamonfina, nell'alto casertano, facente parte del Parco Regionale "Area Vulcanica di Roccamonfina e Foce Garigliano" (www.parcodiroccamonfina.it). In sintesi, le principali attività svolte all'interno dell'azienda agricola, per il raggiungimento degli obiettivi previsti nell'ambito del progetto CASTARRAY, sono state le seguenti:

1. Attività agronomiche
2. Monitoraggio
3. Campionamenti
4. Caratterizzazione morfologica
5. Indagini sul territorio
6. Elaborazione dei dati

Attività agronomiche

Nel periodo tra novembre 2018 e aprile 2019 sono state svolte una serie di attività agronomiche finalizzate ad ottimizzare le condizioni vegetative dei castagneti interessati allo studio. Gli operatori agricoli coinvolti nelle operazioni sono stati guidati da un tecnico perito agrario specializzato nello svolgimento e nella giusta applicazione delle cure colturali necessarie per la corretta gestione dei castagneti da frutto, anche in funzione delle attitudini e delle caratteristiche biologiche e morfologiche delle singole varietà presenti. Il lavoro di assistenza agronomica ha avuto la finalità progettuale di garantire la sopravvivenza del germoplasma locale e di rendere fruibile le piante al campionamento per tutto il periodo di svolgimento dello stesso.

Le attività agronomiche indispensabili sono state essenzialmente la potatura e la raccolta dei residui. La potatura è stata realizzata affinché la chioma rimanesse arieggiata, favorendo la penetrazione della luce e allo stesso tempo ponendo attenzione a non eliminare i rami con cancro cicatrizzato per favorire la diffusione delle spore ipovirulente nel castagneto. Alla fine dell'inverno sono stati effettuati trattamenti a base di rame utili sia per disinfettare i tagli che per combattere la fersa del castagno (seccume delle foglie – "morbo"). Inoltre, grande cura è stata dedicata alla rimozione di tutti i nuovi germogli del portinnesto, al fine di scongiurare ogni possibile confusione di materiale genetico sia nei campionamenti per il prelievo di tessuti da analizzare, sia nei campionamenti per la caratterizzazione morfologica.

Al termine della potatura, sono stati rimossi tutti i residui vegetali in post-raccolta. Il castagneto da frutto è stato ripulito con particolare cura successivamente alla raccolta dei frutti, non solo per limitare lo svernamento

delle cidie nel terreno, ma anche e soprattutto per favorire le operazioni di campionamento. Il frascame ricco di galle secche, con probabile presenza di *Torymus sinensis* Kamijo, che non deve essere eliminato prima della fine di maggio, è stato raggruppato in cumuli in luoghi dove non creassero intralcio allo svolgimento delle operazioni colturali e di campionamento.



Monitoraggio

Periodicamente si è provveduto a monitorare lo stato vegetativo delle piante coltivate nell'azienda durante le loro fasi fenologiche. Le diverse varietà si sono distinte in base alla loro precocità, alla conformazione dei diversi organi vegetativi ed anche alla resistenza ai principali parassiti, come il cinipide galligeno (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu). La cultivar Tempestiva di Roccamonfina, per esempio, è risultata meno suscettibile all'imenottero, rispetto agli altri ecotipi locali, come le cultivar Napoletana, Lucente ecc. E' stata tuttavia confermata l'immunità della cultivar ibrida Bouche de Bétizac allo stesso parassita.



Campionamenti

All'inizio dell'autunno del 2018 sono stati effettuati i campionamenti varietali per le foglie da sottoporre alle analisi del DNA. Successivamente, nel mese di novembre del 2018 sono stati eseguiti i campionamenti dei frutti di ciascuna varietà in studio attraverso la raccolta e la loro catalogazione. Le varietà in esame hanno presentato caratteristiche morfologiche differenti per colorazione, forma, dimensione. In alcune delle varietà campionate è stata rilevata una maggiore resistenza ai carpofagi, mentre in altre si è riscontrata maggiore presenza di *Gnomoniopsis castanea* Tamietti, un fungo ascomicete che causa il marciume bruno delle castagne.



Caratterizzazione morfologica

Il riconoscimento delle diverse varietà presenti nel territorio può avvenire anche attraverso l'individuazione di caratteri univoci presenti in ciascuna delle cultivar citate. Tuttavia questo metodo risulta molto complicato da attuare e limitato solo all'occhio esperto dell'operatore che da anni lavora nel settore locale. Rappresentano elementi distintivi delle varietà, diverse caratteristiche individuabili nelle differenti fasi fenologiche della pianta, come ad esempio la precocità o la distinzione dei frutti se ci troviamo nel periodo di produzione, la conformazione delle foglie e dell'infiorescenza, ma anche la diversa struttura dei rami può rappresentare un carattere distintivo utile nel periodo invernale. Nonostante la presenza sul territorio di personale esperto in materia, sono molto frequenti gli errori di riconoscimento varietale, che vengono commessi soprattutto in fase di reinnesto delle piante adulte, ma anche in caso di nuovo impianto di castagneto da frutto. La mancanza della certezza dell'origine varietale del materiale di propagazione, genera come facilmente intuibile, ingenti danni che saranno meglio rappresentati nei paragrafi successivi. Nelle

immagini di seguito riportate sono rappresentate le varietà presenti nel territorio del vulcano spento di Roccamonfina trattate ed identificate nel presente progetto.



Indagini sul territorio

Il territorio del vulcano spento di Roccamonfina è stato l'area di studio per le indagini svolte per l'acquisizione dei dati e del materiale campionato necessario per l'attuazione del progetto. L'acquisizione delle notizie storico-culturali legate al patrimonio genetico locale è stata svolta in un ampio raggio del comprensorio

insieme al CNR e al CREA, entrambi partner del progetto, anche attraverso questionari volti a comprendere il livello di informazione della popolazione interessata sul tema della genetica nel settore vegetale.

Sin dall'inizio del progetto, infatti, ci si è posti il problema della conoscenza da parte degli agricoltori, ma anche dei consumatori, del test del DNA. Le domande del questionario, sottoposto in forma di intervista alla popolazione durante eventi di aggregazione, come le sagre, sono state: la conoscenza del test genetico e di come potesse essere usato; possibile applicabilità del test in castanicoltura; quali strutture fossero in grado di eseguire tali test; possibile costo; se potesse servire a chi lavora con le castagne; chi nella filiera potesse essere interessato ad un test del DNA sul castagno; quali utilità potessero avere in castanicoltura; quanto dovrebbe costare un test DNA. Tra le varie e fantasiose risposte alle domande poste, emerge l'inconsapevolezza di come applicare il test genetico alla castanicoltura e dell'utilizzo concreto che se ne possa fare.

Elaborazione dei dati

In quest'ultimo decennio, per via del cinipide e di altri gravi problemi che hanno colpito i castagneti, l'agricoltore si è molte volte trovato di fronte a delle scelte importanti:

- a) continuare a coltivare le varietà presenti nella propria azienda;
- b) riconvertire o impiantare nuovi castagneti con utilizzo di cultivar di sicuro pregio e resistenti alle malattie (es. cinipide).

I tempi per verificarne le ragioni o i torti in castanicoltura sono molto lunghi, per cui sarebbe un enorme vantaggio per l'agricoltore poter essere certo, sin dal momento dell'impianto o della riconversione, della natura del materiale di propagazione, anche perché se si dovesse sbagliare cultivar, i danni sarebbero anche maggiori, fino a portare al fallimento dell'azienda.

Nell'ipotesi di una concreta applicazione del test del DNA nella castanicoltura campana, esempi di un suo utilizzo ed i relativi interessi economici legati a questa tecnica, potrebbero essere i seguenti:

1. reimpianto di un castagneto da frutto con utilizzo di una cultivar specifica (**Tabella 1**);
2. riconversione di un castagneto da frutto esistente attraverso il reinnesto di piante adulte con utilizzo di cultivar di sicuro pregio (**Tabella 2**);

3. possibilità di smascherare eventuali frodi commerciali individuando con certezza la cultivar venduta come prodotto fresco.

Nell'effettuare i lavori necessari per un impianto ex novo o per una riconversione varietale di un castagneto da frutto di 1 ha di superficie, l'imprenditore affronterà le spese descritte rispettivamente nelle Tabelle 1 e 2 per portare a produzione l'impianto. Le cultivar di castagno hanno diversi tempi per l'entrata in produzione dal momento dell'impianto: Bouche de Bétizac anni 3 - Napoletana anni 5 - Tempestiva di Roccamonfina anni 8 ecc. Per cui in media un castagneto da frutto impiegherà circa 5 anni per entrare in produzione dal momento dell'impianto o del reinnesto. Si ipotizza, quindi, il caso di un reimpianto con entrata in produzione al quinto anno in cui si affrontino i costi aggiuntivi per un'analisi genetica a campione di 10 piante per ha. I costi calcolati sono riepilogati in Tabella 1. Si può notare che l'incidenza dei costi delle analisi del DNA è pari al 6,78%. Il ricavo marginale è calcolabile in termini di certezza della cv impiantata e dipende dall'andamento del mercato e dalla costituzione di marchi di tutela. Nella riconversione di un castagneto da frutto di 1 ha di superficie, l'imprenditore per portare a produzione l'impianto, affronta le spese descritte nella Tabella 2. Si ipotizza il caso di una conversione con entrata in produzione al quinto anno, in cui si affrontano i costi aggiuntivi per l'analisi a campione di 10 piante per ha. I costi calcolati sono riepilogati in Tabella 2. Come si vede, l'incidenza dei costi delle analisi del DNA è pari al 9,63 %. Il ricavo dall'uso della tecnica è calcolabile, anche in questo caso, in termini di certezza della cv impiantata e dipende dall'andamento del mercato e dalla costituzione di marchi di tutela.

L'applicazione del test del DNA ed il suo confronto con altre varietà permetteranno di individuare eventuali frodi commerciali. Non è raro trovare nei supermercati castagne fresche munite di precise denominazioni di origine, ma che in realtà provengono da paesi comunitari o addirittura extracomunitari. In questi casi il rischio diviene anche di natura salutare, dato che in alcune nazioni è consentito l'utilizzo di alcuni prodotti fitosanitari da tempo banditi in Italia. Attraverso l'applicazione delle tecniche descritte per l'individuazione dell'origine del frutto fresco, sarà possibile evitare che quanto descritto possa avvenire con tanta facilità. La stima del beneficio marginale derivante dall'applicazione della tecnica a questo particolare scopo è molto incerta e dipende dai parametri inclusi nella valutazione. Tuttavia si rileva che l'opportunità d'uso dell'innovazione in questo settore dipende in gran parte dalla differenza di prezzo al consumo della cv da tutelare rispetto alle

castagne senza denominazione e dalla sicurezza nell'allocazione delle produzioni di pregio che si può ottenere in un mercato libero da frodi. Anche i costi di applicazione della stessa sono difficili da valutare poiché è difficile prevedere quanti test è necessario condurre ed attraverso quali canali di spesa, affinché sia conseguito l'auspicato effetto deterrente sulle frodi. Dalle indagini sul territorio emerge comunque che la sola consapevolezza diffusa dell'esistenza applicativa del test genetico possa orientare il mercato verso pratiche più virtuose, fornendo elementi per una positiva valutazione dell'introduzione del test in questo particolare scenario.

Conclusioni

In definitiva, si evidenzia il forte interesse agronomico ed economico che esiste nell'applicazione di questa tecnica scientifica al mondo agricolo e con particolare riferimento alla castanicoltura da frutto. Purtroppo si è riscontrata una scarsa informazione sull'argomento, sia tra gli agricoltori che tra i consumatori, che nella maggior parte dei casi ignorano le diciture sulle etichette ed i certificati di origine che dovrebbero essere per loro la garanzia di un prodotto di qualità. In tutto questo, le tecniche di analisi del DNA si sono dimostrate di facile applicazione ed economicamente sostenibili, ed inoltre si possono considerare di immediata trasferibilità al mondo agricolo. Tuttavia si ritiene necessario intervenire con forti attività di divulgazione ed informazione sia sull'importanza sia sul ruolo del test del DNA e sulle prospettive future di questa applicazione scientifica, che di sicuro potrà rappresentare un'innovazione tecnologica per i prodotti della filiera castanicola.

TABELLA 1				
COSTO DI REIMPIANTO DI UN CASTAGNETO DA FRUTTO DI HA 1				
DESCRIZIONE LAVORI	Quantità	Costo unitario	Costo totale	Incidenza %
compreso ripasso, amminutamento e spianamento per Ha				
SOMMA	1,00	754,11	754,11	19,93%
metecriche ivi compresi modesti movimenti di terra ad ha				
SOMMA	1,00	529,09	529,09	13,99%
x 10 di 3 anni di innesto.				
SOMMA	100	16,00	1.600,00	42,29%
Concimazione di base				
SOMMA	100	5,00	500,00	13,22%
TOTALE COSTO IMPIANTO SENZA INDAGINE GENETICA €			3.383,20	
campione del 10% delle piante messe a dimora.				
SOMMA	10	40,00	400,00	10,57%
TOTALE COSTO IMPIANTO CON INDAGINE GENETICA €			3.783,20	
INCIDENZA COSTO INDAGINI GENETICHE SU COSTO REIMPINATO			10,57%	
COSTI CURE CULTURALI SU 1 HA DI CASTAGNETO DA FRUTTO				
DESCRIZIONE LAVORI I° E II° ANNO	Quantità	Costo unitario	Costo totale	Incidenza %
Lavorazione del terreno mediante fresatura o erpicatura:	1,00	194,94	194,94	52,55%
Potatura di formazione Cad	100,00	0,89	89,00	23,99%
Concimazioni localizzate	100,00	0,26	26,00	7,01%
Trattamento antiparassitari	100,00	0,28	28,00	7,55%
Irrigazione di soccorso	100,00	0,33	33,00	8,90%
TOTALE COSTO CURE CULTURALI I° E II° ANNO €			741,88	
DESCRIZIONE LAVORI III°, IV° E V° ANNO	Quantità	Costo unitario	Costo totale	Incidenza %
Lavorazione del terreno mediante fresatura o erpicatura:	1,00	194,94	194,94	42,57%
Potatura di allevamento Cad	100,00	1,50	150,00	32,76%
Concimazioni localizzate	100,00	0,39	39,00	8,52%
Trattamento antiparassitari	100,00	0,41	41,00	8,95%
Irrigazione di soccorso	100,00	0,33	33,00	7,21%
TOTALE COSTO CURE CULTURALI III°, IV° E V° ANNO €			1.373,82	
TOTALE COSTO CURE CULTURALI PER 5 ANNI			2.115,70	
TOTALE IMPIANTO SENZA DNA + CURE CULTURALI PER 5 ANNI			5.498,90	
TOTALE IMPIANTO CON DNA + CURE CULTURALI PER 5 ANNI			5.898,90	6,78%

TABELLA 2				
COSTO CONVERSIONE VARIETALE DI UN CASTAGNETO DA FRUTTO DI HA 1				
DESCRIZIONE LAVORI	Quantità	Costo unitario	Costo totale	Incidenza %
reinnesto delle piante adulte di castagno con cultivar di sicuro pregio minimo tre innesti su piante mediamente sviluppate.				
SOMMA	100,00	23,00	2.300,00	85,19%
TOTALE COSTO CONVERSIONE SENZA INDAGINE GENETICA €			2.300,00	
campione del 10% del materiale di propagazione utilizzato.				
SOMMA	10	40,00	400,00	14,81%
TOTALE COSTO CONVERSIONE CON INDAGINE GENETICA €			2.700,00	
INCIDENZA COSTO INDAGINI GENETICHE SU COSTO CONVERSIONE			14,81%	
COSTI CURE COLTURALI SU 1 HA DI CASTAGNETO DA FRUTTO CONVERTITO				
DESCRIZIONE LAVORI I° E II° ANNO	Quantità	Costo unitario	Costo totale	Incidenza %
Potatura di formazione Cad	100,00	0,89	89,00	36,18%
Concimazioni localizzate	100,00	0,96	96,00	39,02%
Trattamento antiparassitari	100,00	0,28	28,00	11,38%
Irrigazione di soccorso	100,00	0,33	33,00	13,41%
TOTALE COSTO CURE COLTURALI I° E II° ANNO €			492,00	
DESCRIZIONE LAVORI III°, IV° E V° ANNO	Quantità	Costo unitario	Costo totale	Incidenza %
Potatura di allevamento Cad	100,00	1,50	150,00	46,88%
Concimazioni localizzate	100,00	0,96	96,00	30,00%
Trattamento antiparassitari	100,00	0,41	41,00	12,81%
Irrigazione di soccorso	100,00	0,33	33,00	10,31%
TOTALE COSTO CURE COLTURALI III°, IV° E V° ANNO €			960,00	
TOTALE COSTO CURE COLTURALI PER 5 ANNI			1.452,00	
TOTALE CONVERSIONE SENZA DNA + CURE COLTURALI PER 5 ANNI			3.752,00	
TOTALE CONVERSIONE CON DNA + CURE COLTURALI PER 5 ANNI			4.152,00	9,63%

 edizioni
Consiglio Nazionale delle Ricerche

ISBN 978-88-8080-366-9