

ORIGINE GENETICA DEL PESCO E CREAZIONE DI UNA RETE MEDITERRANEA DI CONSERVAZIONE DELLA BIODIVERSITÀ VARIETALE

*Bassi Daniele*¹, *Cirilli Marco*¹, *Cos Terrer José*², *Drogoudi Pavlina*³, *Eduardo MuñozIban*⁴,
*Foschi Stefano*⁵, *Micali Sabrina*⁶, *Rossini Laura*¹, *Verde Ignazio*⁶

¹ DiSAA, Università degli Studi di Milano (Italia)

² IMIDA, Murcia (Spagna)

³ DDFT, IPB&GR(Grecia)

⁴ IRTA, Catalogna Spagna

⁵ CRPV, Cesena (Italia)

⁶ CREA, Roma (Italia)

Premessa: la misteriosa storia evolutiva del pesco

Il pesco è la pianta da frutto (estiva) più coltivata nel nostro paese, oltre che, per la fascia temperata, in tutto il Bacino del Mediterraneo senza voler far riferimento ad altre zone geografiche (America, Estremo oriente, Cina *in primis*). Occorre infatti ricordare che essa è stata anche la prima specie legnosa sulla quale sono state compiute le prime esperienze di impianti intensivi: siamo a Massa Lombarda (RA), alla fine del 1800 (Bellucci, 1908).

Da queste prime, fortunate esperienze, i frutteti specializzati sono diventati il lustro della frutticoltura italiana, poi copiata in tutto il mondo, in particolare a partire dalla fine degli anni '50 del secolo scorso. Intere schiere di frutticoltori e tecnici prima, ricercatori e studiosi poi, hanno nel tempo esteso a tutte le specie da frutto le soluzioni che, in prima istanza, erano state sperimentate e poi applicate sul pesco, anche grazie alla 'plasticità' del suo albero, che si presta a diverse modalità di allevamento.

Oltre che per l'importanza economica e storica, il pesco è tra le specie arboree più studiate dal punto di vista genetico, a motivo delle dimensioni ridotte del suo genoma che costituisce un eccellente modello per la famiglia delle Rosaceae (Verde et al., 2013). L'inbreeding ha giocato un ruolo fondamentale nel corso della sua plurimillennaria storia evolutiva, grazie alla piena autocompatibilità fiorale, che assicura (favorito anche dalla morfologia fiorale) una elevatissima percentuale di autofecondazione. Ed è questo un piccolo mistero per gli scienziati, in considerazione del fatto che in molti altri alberi da frutto la fecondazione incrociata è assicurata da meccanismi di autoincompatibilità (es. melo, ciliegio).

Occorre poi aggiungere un altro fatto, che approfondisce il mistero, almeno dal punto di vista della filogenesi, di questa specie, e che riguarda le sue forme selvatiche. Mentre di numerose altre specie, alcune affini (mandorlo) o filogeneticamente vicine (albicocco) al pesco, sono stati individuati con ragionevoli evidenze i centri di origine (nei quali sono presenti ancor oggi popolazioni spontanee (Decroocq et al., 2016), nel caso del pesco l'esistenza di forme selvatiche direttamente riferibili alla

specie *Prunus persica* L. (Batsch) è tutt'ora ignota (Velasco et al. 2016). Secondo alcuni studiosi cinesi, il pesco non esisterebbe sotto forma di popolazioni 'selvatiche' (Shen Z., Jiangsu Academy of Agricultural Sciences: comunicazione personale), ma solo come piante isolate nei boschi di possibile origine ferale. Alcuni recenti lavori sembrerebbero collocare la sua origine nel Sud-Ovest della Cina ed esisterebbero elementi che farebbero pensare addirittura ad un influsso della evoluzione di alcune specie di scimmie, notoriamente frugivore, nella "domesticazione" del pesco, a partire da alcune specie ancestrali, come il *P. mira*, *P. kansuensis*, oltre che *P. persica* (Su et al., 2015; Yu et al 2018).

Il moderno assetto varietale del pesco

E' noto che il pesco in Europa è arrivato al tempo delle campagne militari dei Romani in Medio Oriente, avendo 'incontrato' il pesco sulla cosiddetta 'via della seta', quando già aveva raggiunto l'allora Persia. Successivamente, diverse fonti, sia agronomiche (trattati di agricoltura), sia artistiche (dipinti), attestano l'esistenza del pesco nei pomari europei (retaggio dell'*hortus* romano) prima dei viaggi di Colombo (pesche bianche in Italia e Francia, percoche gialle nel nostro meridione ed in Spagna). Non a caso, i primi pescheti sono stati realizzati utilizzando la pesca locale a polpa bianca 'Buco Incavato' (Bellucci, 1908; Buscaroli et al, 2016). Non può quindi che destare ulteriore stupore sapere che l'incredibile numero di varietà commerciali oggi note derivi, geneticamente parlando, da un'unica accessione (Chinese Cling) introdotta negli USA nella seconda metà del 1800 (Okie et al., 2009). Certamente a questa accessione se ne sono poi aggiunte altre con origine genetica indipendente da Chinese Cling, come ad esempio il pesco che ha raggiunto il continente americano grazie ai contatti con l'Europa dopo l'impresa di Cristoforo Colombo: tale è infatti la provenienza di buona parte delle accessioni 'locali' diffuse in centro e sud America. Tuttavia, è altrettanto vero che le accessioni europee di pesco non hanno contribuito in maniera significativa all'affermarsi della coltura in tempi moderni, vale a dire dopo l'arrivo delle prime pesche gialle 'americane' ('J.H.Hale' ed 'Elberta' fra tutte), che hanno rivoluzionato l'assetto varietale della coltura, in Italia prima e nel resto dell'Europa poi, confinando le pesche bianche locali dal '90 al 3-5 % dei frutteti.

Senza parlare delle nettarine, altra 'invenzione' *made in USA*, nonostante il carattere 'buccia glabra' sia presente in antiche accessioni locali come le 'Sbergie' e probabilmente introdotto nei programmi US mediante l'accessione pakistana 'Quetta'. Dalla loro introduzione a metà degli anni '70 del secolo scorso le nettarine hanno conquistato nel breve lasso di pochi lustri il 50% della produzione peschicola nazionale (Dondini et al., 2014).

La diffusione delle varietà americane ha stimolato la nascita di numerosi programmi di breeding europei, tuttavia fortemente basati sul loro impiego: se indaghiamo l'albero genealogico di tutte le

cultivar diffuse dalla Seconda Guerra mondiale ad oggi, troviamo sempre un avo che proviene dalla ormai antica ‘Chinese Cling’ (Okie et al., 2008).

Non è quindi un caso che molti degli studiosi (in particolare i genetisti molecolari) che si sono occupati del pesco sino ad oggi, sottolineino la ridotta diversità genetica rispetto ad altre specie arboree da frutto come il melo, la manioca e la palma da dattero (Duan et al., 2017) e in alcune varietà un elevato grado di omozigosi legato al sistema riproduttivo, che in natura è per il 70-80% caratterizzato da autofecondazione.

Le sfide attuali

Numerose sono oggi le sfide che il pesco in Europa, come coltura da frutto, sta affrontando: la concorrenza di colture alternative, sia prodotte in loco, sia di importazione; l’aumento dei costi di produzione, con conseguente assottigliamento dei redditi dei produttori (e conseguente abbandono della coltura: da inizio secolo in Italia è venuto a mancare oltre il 25% di pescheti, che nel 2000 ricoprivano oltre 100.000 ha: da oltre 1,7 Milt, si è passati a poco più di 1,2 Milt.); la sostenibilità dei metodi di coltivazione, che nel caso delle colture da frutto significa utilizzo di molecole sempre meno dannose per l’ambiente e la salute degli operatori e dei consumatori.

Tutti obiettivi molto impegnativi, che richiedono sforzi condivisi da parte di tutti gli operatori della filiera: in questo contesto, e’ fondamentale definire il contributo che possono fornire gli studiosi che si interessano di miglioramento varietale e legato ovviamente allo sfruttamento del patrimonio genetico e alla ricerca di quei caratteri che potrebbero portare alla soluzione di almeno alcuni dei problemi suddetti, in primis l’adattabilità a multiformi ambienti di coltivazione e la resistenza alle avversità biotiche, in particolare. Nel pesco, approcci innovativi di breeding assistito sono oggi possibili grazie alle dimensioni contenute del genoma (circa 227Midi coppie di basi di DNA) e alla disponibilità di nuovi strumenti e risorse genomiche per la ricerca e l’applicazione di marcatori molecolari, come ad esempio il database *PeachVar-DB* (Cirilli et al., 2018) (e gli SNP array (Verde et al., 2013). Negli ultimi lustri non sono mancati progetti, anche di una certa entità, che hanno affrontato queste sfide, sia nei principali paesi produttori, sia a livello della UE, come ad esempio il progetto *FruitBreedomics* (*Integrated approach for increasing breeding efficiency in fruit tree crops*). I principali risultati di questo progetto quinquennale (conclusosi a metà del 2015) sono consultabili sul sito della UE: <https://cordis.europa.eu/project/rcn/98644/reporting/en>.

Le collezioni di riferimento per l’evoluzione varietale

Nell’ambito di *FruitBreedomics* (progetto incentrato su approcci integrati al miglioramento varietale, per melo e pesco) era stata creata una collezione ‘virtuale’, condividendo i dati disponibili delle collezioni fisicamente presenti nei campi dei partner del progetto

(<http://bioinformatics.tecnoparco.org/fruitbreedomics/>): nel caso del pesco si trattava di circa 1500 accessioni (Micheletti et al., 2015) e altrettante progenie da incroci (Hernández Mora et al., 2017).

Uno dei problemi che sorge quando si ha a che fare con numeri così elevati, dopo aver accertato l'esistenza di omonimie e sinonimie (passaggio reso oggi molto semplice grazie all'utilizzo dei marcatori molecolari, attraverso le specifiche 'impronte' genetiche di ogni accessione), è la 'ridondanza genetica' di tale materiale, problema particolarmente rilevante per il pesco. E' nota infatti l'estrema facilità con cui si possono ottenere 'nuove' varietà nel pesco, a motivo della breve durata del periodo giovanile degli alberi ottenuti da seme (frutto degli incroci), ma soprattutto grazie alla presenza di molti caratteri mendeliani (oltre una trentina), che possono essere 'assemblati' in tantissime combinazioni (forma del frutto, colore della buccia/polpa, presenza/assenza di tomento, tessitura della polpa, carattere bassa acidità, ecc), associandoli alla variabilità di caratteri quantitativi, come la dimensione del frutto, l'estensione del sovraccolore della buccia, il fabbisogno in freddo, l'epoca di maturazione, ecc (Aranzana et al., 2019; Peace et al., 2017). Purtroppo, l'uso di un limitato numero di donatori per questi caratteri ha portato a una notevolissima proliferazione di 'nuove' cultivar strettamente imparentate dal punto di vista genetico (Verde et al., 2013; Micheletti et al., 2015). Tale situazione rappresenta un vero e proprio danno sotto vari punti di vista: i) per il comparto vivaistico con conseguenze relative anche alla contraffazione a causa dell'eccessiva proliferazione di cultivar simili, ma non uguali; ii) per la commercializzazione dei frutti, che porta a mescolanze di frutti solo apparentemente simili, con riscontri negativi da parte del consumatore; iii) per il breeding, in cui la scarsa variabilità genetica rappresenta un forte limite al reperimento di alleli utili per lo sviluppo di nuove cultivar adatte alle future condizioni ambientali e pratiche colturali.

Risorse fondamentali per superare questi ostacoli e preservare un patrimonio di variabilità genetica sono le collezioni di 'riferimento' (*core collection*, in inglese). Tra i lasciti di FruitBreedomics si annovera appunto la creazione di due collezioni di riferimento, una per il melo ed una per il pesco (Laurens et al., 2018).

E' nata una rete europea della collezione di riferimento del pesco

La collezione di riferimento di pesco, costituita da 400 fra accessioni e progenie da diversi incroci, è stata propagata, con la supervisione del Servizio fitosanitario dell'Emilia Romagna (per il rispetto della normativa europea circa la circolazione del materiale vegetale) e del CRPV di Cesena per gli aspetti organizzativi, presso un vivaio italiano: il portinnesto utilizzato è il GF677 e le piante sono state innestate e messe a dimora a gemma dormiente.

Come si evince dalla tabella 1, sono state messe a dimora quattro ‘copie’ complete di tale collezione, oltre a una copia parziale presso il CREA-FRU di Roma.

Tabell -. Localizzazione delle ‘copie’ della PeachRefPop

Paese	Località	Accessioni	Latitudine	Longitudine	Ente
Grecia	Naoussa	400 ⁽¹⁾	40.620272	22.121489	DDFT, IPB&GR: Grecia
Italia	Imola	400 ⁽¹⁾	44,334402	11,751956	CRPV e UNIMI, Italia
Italia	Roma	180 ⁽²⁾	41,47480	12,33581	CREA-FRU, Italia
Spagna	Gimenells	400 ⁽¹⁾	41,660484	0,390787	IRTA, Catalogna, Spagna
Spagna	Murcia	400 ⁽¹⁾	38.065443,	-1,428592	IMIDA, Murcia Spagna

(1): sono presenti due parcelle (per facilitare lo studio dell’effetto di pratiche colturali, come concimazione ed irrigazione): M1, comprendente tutte le 400 accessioni, ed M2, con un numero ridotto di genotipi.

(2): presenti solo accessioni, mancano le popolazioni da incrocio

In ogni località, tranne che a Roma, è presente un disegno di piantagione predisposto per il confronto statistico di diversi trattamenti sperimentali (irrigazione, concimazione, trattamenti antiparassitari). In totale, in ogni campo sono presenti oltre 1200 alberi, tranne che a Roma (circa 360). Tale piano si presta a diversi tipi di studi sulle interazioni fra genotipi, ambienti e pratiche agronomiche, per esempio attraverso l’applicazione di innovativi metodi di analisi statistica basati sull’integrazione di dati genomici, fenotipici e pedo-climatici. Se si tien conto dei diversi ambienti, è infatti possibile applicare protocolli statistici che tengano conto dell’influenza del genotipo, dell’ambiente (andamento climatico in diversi anni) e di condizioni agronomiche imposte, sulla espressione di caratteri di interesse, al fine dell’individuazione di marcatori utili alla selezione assistita.

Oltre ai caratteri esposti sopra, sarà possibile indagare quelli, molto complessi, legati alla resilienza delle piante, aspetto da tempo presente nelle agende dei decisori politici nazionali ai vari livelli

Nei prossimi anni, ricerche sulla PeachRefPop saranno forse in grado di dare alcune risposte ai tanti ‘misteri’ che ancora avvolgono questa pianta. Siamo di fronte ad un *unicum* nel panorama della frutticoltura del nostro pianeta, che va al di là dei risvolti economici: quali sono i ‘percorsi’ genetici

che hanno consentito a questa specie di evolversi fino alle forme coltivate attuali? Come mai non conosciamo le sue forme selvatiche, come per le altre specie da frutto? Come mai, a fronte di una variabilità genetica relativamente limitata, siamo riusciti ad ottenere varianti varietali che consentono di coltivarla in una estensione geografica che va dai subtropici al Canada, con un calendario di maturazione che copre quasi sei mesi?

Da ultimo, oltre ai motivi di interesse che tale collezione rappresenta ai fini del miglioramento varietale del prossimo futuro e degli studi di genetica e tecnica colturale, val la pena sottolineare l'aspetto culturale che essa rappresenta. La natura transnazionale di questa collezione consente e, infatti, di superare il concetto di collezione individuale del singolo Stato europeo al fine di costituire una eredità condivisa che racchiude in 400 accessioni il patrimonio di variabilità di questa specie di interesse strategica per l'economia di molti paesi Europei.

Materiale genetico di partenza

Come materiale genetico di partenza per ottenere la popolazione di riferimento, sono state utilizzate 1069 accessioni di pesco provenienti da diverse istituzioni in Europa e un set di dati genotipici (4271 SNP) provenienti dall'ibridazione con l'array IPSC 9K (Verde et al., 2012). Sono stati utilizzati anche dati fenotipici raccolti nell'ambito del progetto Fruitbreedomics: sette caratteri qualitativi (Micheletti et al., 2015) e dieci quantitativi.

Oltre alle 1069 accessioni, alcuni partner del progetto FruitBreedomics hanno messo a disposizione sub-campioni di popolazioni (da incrocio), molto varie dal punto di vista dell'origine genetica e dei caratteri segreganti.

Procedura statistica utilizzata per la scelta delle accessioni

Sono stati considerati diversi criteri per arrivare al set di riferimento finale: 1) ridondanza presente nel germoplasma analizzato durante il progetto FruitBreedomics (verificata attraverso il software 'MStrat (Gouesnard et al. 2001); 2) identificazione del minor numero di accessioni necessarie per preservare la maggior parte della variabilità genetica; 3) stratificazione delle accessioni, già dimostrata da Micheletti et al. (2015), che avevano identificato, in base all'analisi genetica, la presenza di tre sottopopolazioni: a. orientale, b. occidentale 'moderna' (da miglioramento varietale) e c. occidentale 'tradizionale'; 4) dimensioni adeguate a fornire una potenza statistica sufficiente per effettuare studi di genetica di associazione, quali la Genome Wide Association Analysis (GWAS) per l'identificazione di regioni genomiche coinvolte nel controllo di caratteri agronomici, garantendo al contempo il contenimento dei costi di mantenimento della collezione così costituita.

Per assicurare che il numero totale di alleli (responsabili della espressione di caratteri di interesse) fosse presente nella collezione di riferimento, è stata applicata la strategia di massimizzazione (Schoen and Brown, 1993) tramite il pacchetto statistico ‘PowerCore’ (Kim et al., 2007);

L’esito finale di questo lavoro di assemblaggio è stata l’individuazione di 400 genotipi, per poco più del 50% rappresentati da accessioni selezionate a partire dalle 1069 di partenza, e la restante parte dai sub-campioni delle popolazioni da incrocio.

Ringraziamenti

Si ringraziano Martina Lama di ‘Astra-Innovazione e Sviluppo’ (Faenza) per l’assistenza in campo, Claudio Buscaroli (CRPV di Cesena, FC) e Annarosa Babini (Servizio Fitosanitario della Regione Emilia-Romagna) per la gestione degli adempimenti fito-sanitari necessari alla movimentazione del materiale di propagazione ed ai controlli di vivaio.

Bibliografia

- Aranzana M. J., Decroocq V., Dirlewanger E., Eduardo I., Gao Z. S., Gasic K., Tao R. 2019. Prunus genetics and applications after de novo genome sequencing: achievements and prospects. *Horticulture research*, 6.
- Bellucci A. 1908. La coltivazione del pesco a Massalombarda. Cattedra Ambulante di Agricoltura di Ravenna, Tip. Soc. Mazzini, Ravenna.
- Buscaroli C., Tellarini S., Missere D., Liverani A., Sirri S.,Giovannini D. 2016. Reperimento e valorizzazione di alcune varietà antiche di pesche romagnole attraverso i progetti Comprensoriali integrati delle Province di Ravenna e Forlì-Cesena. *ItalusHortus* 17: 53-58.
- Cirilli M., Flati T., Gioiosa S., Tagliaferri I., Ciacciulli A., Gao Z.,Gattolin S., Geuna F., Maggi F., Bottoni P., Rossini R., Bassi D., Castrignanò T.,Chillemi G. 2018. PeachVar-DB: a curated collection of genetic variations for the interactive analysis of peach genome data. *Plant and Cell Physiology*, 59:1,e2.
- Decroocq S., Cornille A., Tricon D., Babayeva S., Chague A., Eyquard J.P., Karychev R., Dolgikh S., Kostitsyna T., Liu S., Liu W., Geng W., Liao K., Asma B.M., Akparov Z., Giraud T., Decroocq V. 2016. New insights into the history of domesticated and wild apricots and its contribution to Plum pox virus resistance. *MolEcol.*, 25:4712–29.
- Dondini L., Vendramin E., Pea G., Pacheco I., Dettori M.T., Gazza L., Scalabrin S., Strozzi F., Tartarini S., Bassi D., Ignazio V.,Rossini L. 2014. L’origine delle nettarine nella mutazione di un singolo gene MYB. *Rivista di Frutticoltura*,7/8: 48-51
- Duan N., Bai Y., Sun H., Wang N., Ma Y., Li M., Wang X., Jiao C., Legall N., Mao L., Wan S., Wang K., He T., Feng S., Zhang Z., Mao Z., Shen X., Chen X., Jiang Y., Wu S., Yin C., Ge S., Yang L., Jiang S., Xu H., Liu J., Wang D., Qu C., Wang Y., Zuo W., Xiang L., Liu C., Zhang D., Gao Y., Xu Y., Xu K., Chao T., Fazio G., Shu H., Zhong G. Y., Cheng L., Fei Z., Chen X. 2017. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nat Commun.*, 8:249.
- Gouesnard B., Bataillon T. M., Decoux G., Rozale C., Schoen D. J. e David, J. L. 2001. MSTRAT: An algorithm for building germplasm core collections by maximizing allelic or phenotypic richness. *Journal of heredity*, 92(1): 93-94.
- Hernández Mora J.R, Micheletti D., Bink M., Van de Weg E., Bassi D., Nazzicari N. et al. 2017. Integrated QTL detection for key breeding traits in multiple peach progenies. *BMC Genomics* 18(1): 404.
- Kim K., Chung H., Cho G., Ma K.,Chandraban D.,Gwag J., Kim T., Cho E., Park Y. 2007. PowerCore: a program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing core sets. *Bioinformatics*, 23 (16): 2155–2162.
- Laurens F., Aranzana M-J., Arus P., Bassi D., Bink M., Bonany J., Caprera A., Corelli-Grappadelli L., Costes E., Durel C-E., Mauroux J.B., Muranty H., Nazzicari N., Pascal T., Patocchi A., Peil A., QuilotTurion B., Rossini L., Stella A., Troggio M., Velasco R., van de Weg E. 2018. An integrated approach for increasing breeding efficiency in apple and peach in Europe. *Hortic Res* 5:11.
- Micheletti D., Dettori M.T., Micali S., Aramini V., Pacheco I., Da Silva Linge C., Foschi S., Banchi E, Barreneche T., Quilot-Turion B, Lambert P., Pascal T., Iglesias I., Carbò J., Wang L., Ma R., Li X., Gao Z., Nazzicari N., Troggio M., Bassi D., Rossini L, Verde I., Laurens F., Arùs P., Aranzana M.J. 2015. Whole-genome analysis of diversity and SNP-major gene association in Peach Germplasm. *PLOS ONE*, 10(9): e0136803.
- Okie W.R., Bacon T. e Bassi D. 2008. Fresh Market Cultivar Development. In: (curatori) D. R. Layne e D. Bassi: *The Peach. Botany, Production and Uses*. CAB International, Wallingford (UK): 139-174.
- Peace C. P. 2017. DNA-informed breeding of rosaceous crops: promises, progress and prospects. *Horticulture research*, 4: 17006.
- Schoen D. e Brown A. 1993. Conservation of allelic richness in wild crop relatives is aided by assessment of genetic markers. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA*, 90: 10623-10627.
- Su T., Wilf P., Huang Y., Zhang S.,Zhou Z. 2015. Peachesprecededhumans: fossil evidence from SW China. *Sci. Rep.*, 5: 16794.
- Velasco D., Hough J, Aradhya M.,Ross-Ibarra J. 2016. Evolutionary genomics of peach and almond domestication. *G3-Genes Genomes Genet* 6:3985–3993.

Verde I., Bassil N., Scalabrin S., Gilmore B., Lawley C., Gasic K., Micheletti D., Rosyara U., Cattonaro F., Vendramin E., Main D., Aramini V., Blas A., Mockler T., Bryant D., Wilhelm L., Troggio M., Sosinski B., Aranzana M., Arús P., Iezzoni A., Morgante M., Peace C. 2012. Development and evaluation of a 9K SNP array for peach by internationally coordinated SNP detection and validation in breeding germplasm. *PLoS One*, 7 (4): e35668.

Verde I. et al. 2013. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nature Genetics* 45.5: 487.

Yu Y., Fu J., Xu Y., Zhang J., Ren F., Zhao H., Jiang D. 2018. Genome re-sequencing reveals the evolutionary history of peach fruit edibility. *Nature Communications*, 9 (1): 5404-5404.