CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E RECUPERO DEL GERMOPLASMA CASTANICOLO DELLE COLLINE METALLIFERE

Cantini C.[1], Autino A.[2], Rizzello R.[2], Nitti D.[3]
[1] Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, CNR, Sesto Fiorentino
[2] Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena, Siena
[3] Comunità Montana Colline Metallifere, Massa Marittima (GR)
email: cantini@ivalsa.cnr.it

Riassunto: La Comunità Montana delle Colline Metallifere e l'ARSIA hanno finanziato un progetto rivolto a caratterizzare e recuperare i genotipi di castagno coltivati nel territorio delle Colline Metallifere. L'indagine ha consentito la caratterizzazione molecolare di 53 piante, raggruppabili sotto 14 diverse denominazioni, 25 delle quali appartenenti alla tipologia "Marrone". La caratterizzazione è stata effettuata con 8 marcatori microsatelliti nucleari che hanno evidenziato una elevata polimorfia producendo una numero medio di 9,3 alleli per locus con una probabilità di identità (P_{ID}) pari a $1{,}957 \times 10^{-7}$. Lo studio ha fatto scoprire sinonimie ed omonimie caratterizzando con certezza 41 genotipi diversi. I genotipi individuati saranno propagati, messi a confronto diretto in un campo collezione localizzato nella zona originale di individuazione e caratterizzati sia a livello morfologico che tecnologico.

Parole chiave: microsatelliti, fingerprinting, cultivar

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND RECOVERING OF THE CHESTNUT GERMPLASM WITHIN THE TUSCAN METALLIFEROUS HILLS

Abstract: *Two Tuscan regional public Institutions, namely* Comunità Montana Colline Metallifere *and ARSIA, financed a project for the characterization and recovering of the chestnut accesions within the Metalliferous Hills, central coastal Tuscany. The study was initiated by the selection of 53 different cultivated chestnut plants, 25 of which belonging to the* "Marrone" *large fruit type, grouped under 14 different denominations. Molecular characterization of the genotypes was performed by 8 nuclear microsatellite markers. The research enabled to discover homonyms and synonyms. The final number of genotypes was set to 41 and they were statistically grouped according to their similarity. The 41 different genotypes will be propagated to constitute a germplasm collection located within the original area of cultivation to assure further morphological characterization and exploitation.*

Keywords: *microsatellite, fingerprinting, cultivar*

Introduzione

Il castagno, fino agli anni '50, ha rappresentato per le popolazioni delle Colline Metallifere il prodotto di base dell'economia e dell'alimentazione (Nitti e Manni, 2005). La castanicoltura possiede ancora oggi delle potenzialità di sviluppo per queste zone collinari ma deve essere supportata da opportune iniziative di tutela e valorizzazione. A questo scopo occorre caratterizzare e conoscere in modo profondo le varietà presenti sul territorio, provvedendo poi ad iscrivere quelle di maggiore interesse al Repertorio Regionale della Toscana (Turchi, 2005) oltre a costituire campi collezione per scongiurare il rischio di erosione genetica. Le varietà "tipiche" ed uniche del territorio possono essere successivamente valorizzate come prodotto fresco o trasformato in produzioni protette (DOP, IGP). Lo scopo di questa ricerca è quello di caratterizzare, mediante marcatori microsatelliti nucleari (Marinoni *et al.*, 2003), le varietà di castagno coltivate all'interno del territorio delle Colline metallifere individuando con sicurezza le più idonee per avviare un processo mirato di valorizzazione economica.

Materiali e metodi

Le piante da utilizzare per il lavoro di caratterizzazione sono state indicate dai tecnici della Comunità Montana delle Colline Metallifere. Esse rappresentavano le varietà più conosciute del territorio, esemplari storici, piante con attribuzione incerta. Delle varietà più diffuse sono state incluse più esemplari al fine di evidenziare eventuali identicità o differenze. Tutte le piante sono state localizzate mediante strumentazione GPS e contrassegnate con codice d'identificazione univoco.

Il DNA è stato estratto dalle foglie, utilizzando il metodo Doyle & Doyle (1990) modificato; successivamente amplificato con 8 coppie di primers, già utilizzati in precedenza, (Fattorini *et al*., 2005) marcati con fluorofori utilizzando le sonde FAM (blu), HEX (verde) e NED (nero).

Tab. 1. Nome, sequenza e temperatura di appaiamento (Ta) delle 8 coppie di primers utilizzati nella ricerca

Primer Fluoroforo		Sequenza del primer (5' - 3')	Ta
CsCAT1-NED	F	GAGAATGCCCACTTTTGCA	50°C
	R	GCTCCCTTATGGTCTCG	
CsCAT3-FAM	F	CACTATTTTATCATGGACGG	50°C
	R	CGAATTGAGAGTTCATACTC	
CSCAT6-HEX	F	AGTGCTCGTGGTCAGTGAG	50°C
	R	CAACTCTGCATGATAAC	
CsCAT16-HEX	F	CTCCTTGACTTTGAAGTTGC	50°C
	R	CTGATCGAGAGTAATAAAG	
CSCAT17-FAM	F	TTGGCTATACTTGTTCTGCAAG	50°C
	R	GCCCCATGTTTTCTTCCATGG	
BH1-FAM	F	GTGCCTCTGTATGCATGGTAAGC	60°C
	R	CCAGGTTTAAGAAAGCAAGCAAGCATAAC	
BH2-HEX	F	ATGGGAAAATGGGTAAAGCAGTAA	50°C
	R	AACCGGAGAAAGCAAGCATAAC	
BH4-NED	F	TTTCCCTATTTCTAGTTTGTGATG	56°C
	R	ATGGCGTTTGGATGAAC	

L'amplificazione è stata eseguita con volume di reazione 20µl di mix e 5µl di DNA (10ηg/µl) e programma di amplificazione: denaturazione iniziale a 94°C per 3 min, 35 cicli di 94°C per 30 s, Ta per 30 s, 72°C per 30 s ed infine 72°C per 8 min. La dimensione dei frammenti espressa in numero di paia di basi, è stata determinata con sequenziatore ad elettroforesi capillare MegaBACE 500 Amersham Pharmacia mediante il programma Fragment Profiler di Amersham Pharmacia.
Per ogni accessione è stata prodotta una stringa numerica inserite nel programma NTSYS PC quindi calcolato l'indice di similarità tra individui mediante la procedura Band. La matrice di similarità è stata utilizzata per la procedura di clusterizzazione seguita da una sintesi grafica del risultato. Dall'osservazione del grafico prodotto è stato possibile individuare accessioni con profili molecolari esattamente identici facendo emergere la presenza di omonimie (uso di uno stesso nominativo per due o più genotipi) o sinonimie (usi di due o più nomi per lo stesso genotipo).

Risultati e discussione
I marcatori utilizzati hanno evidenziato una elevata polimorfia producendo una numero medio di 9,3 (±3,7) alleli per locus. La probabilità che due accessioni avessero lo stesso genotipo per il solo effetto del caso e fossero scambiati per lo stesso individuo, definita probabilità di identità o P_{ID} (Paetkau et al., 1994) è stata calcolata pari a $1{,}957 \times 10^{-7}$ assicurando una notevole discriminazione dei profili molecolari.
I marcatori hanno permesso di individuare piante con identico profilo molecolare scoprendo sia omonimie (uso di uno stesso nominativo per due o più genotipi) che sinonimie (usi di due o più nomi per lo stesso genotipo). In particolare sono stati individuati: un gruppo di 9 ed uno di 2 marroni identici, due piante di Rossolina identiche, una Bellona erroneamente chiamata Bionda. Queste piante con identico profilo indicano la probabile propagazione avvenuta per innesto di materiale vegetale all'interno della ristretta zona di coltivazione. Dal dendrogramma (Fig. 1) è possibile evidenziare come tra le accessioni in Tab 2. non siano rimaste alcune con identico profilo anche se in alcuni casi sono presenti differenze minime: ad esempio tra le accessioni di Pastinese (35 e 36) e tra alcuni Marroni (21 e 23 così come 24 e 28). Sempre nel gruppo dei marroni il Della Madonna A e della Madonnina B hanno mostrato similarità oltre il 95%. Il Montegusciani D ha genotipo molto simile a queste ultime e si trova in un cluster che include anche del Lago A. Il Marrone di Montegusciani B invece presenta fingerprinting meno simile a questo gruppo di Marroni.

Conclusioni
I marcatori molecolari nucleari utilizzati hanno permesso di caratterizzare a livello genotipico tutte le accessioni coltivate segnalate garantendo per la prima volta una loro sicura identificazione. Questo permette adesso l'avvio di un processo di valorizzazione delle accessioni in grado di assicurare l'origine genetica delle piante e degli eventuali sottoprodotti. Tutte le accessioni identificate, di cui è stata eseguita anche una prima analisi dei dati morfologici sugli individui di origine, verranno adesso propagate per innesto e collocate in un unico campo collezione all'interno del quale completare la caratterizzazione morfologica nonché quella tecnologica di frutti e farine, mai effettuata fino ad adesso.

Tab. 2. Elenco delle accessioni di castagno autoctono delle Colline Metallifere in seguito ad eliminazione di genotipi risultati identici

N° DNA	Nominativo	Identificazione Accessione
1	Bellona	A Pelaghe Monterotondo M.mo
2		C Prata Massa M.ma
3	Bionda	A Canalecchia Massa M.ma
4		B Botrella Massa M.ma
5		C Botrella Massa M.ma
6	Carpinese	A Campo troncone Massa M.ma
7		B Monte Gusciani Massa M.ma
8		C Casa Vigna Bruna Massa M.ma
9		D Il Sodo Boccheggianio
10	Domestica	A Santa maria Sassetta
11		B Bulci Montieri
12		C casa Moschini Montieri
13	Incognito	Incognito
14	Lombarda	A casa Vigna Bruna tatti
15		B casa Vigna Bruna Tatti
16	Luccichente	A Botrella Massa M.ma
17		B Fattoria Cagna Monterotondo M.mo
18	Marrone	del lago A il Sodo Boccheggiano
19		del lago B Lago Montieri
20		del lago C lago Montieri
21		della Madonna A Madonna dei Castagni
22		della Madonnina A Sassetta
23		della Madonnina B Corbaia Sassetta
24		del pagiano A Roccastrada
25		di Cagna A Pelaghe Monterotondo M.mo
26		di Torniella A Sterrati Roccastrada
27		Montegusciani B Tatti Bonacchi
28		Montegusciani C Tatti Petri
29		Montegusciani D Casa Vigna Bruna Tatti
30	Marronessa	A Fattoria di Cagna Monterotondo
31		B Casa Moschini Montieri
32	Monumentale San Martino	San Martino
33	Morella	A Botrella
34		B Botrella
35	Pastinese	A Santa Caterina Sassetta
36		B Prato del Ghiro Montieri
37	Rossolina	A Campo Troncone Prata
38		B Casa Vigna Bruna e D Santa Caterina
39		C Pagiano Roccastrada
40	Tardiva	A Prata Massa M.ma
41	21	Pianta Nitti

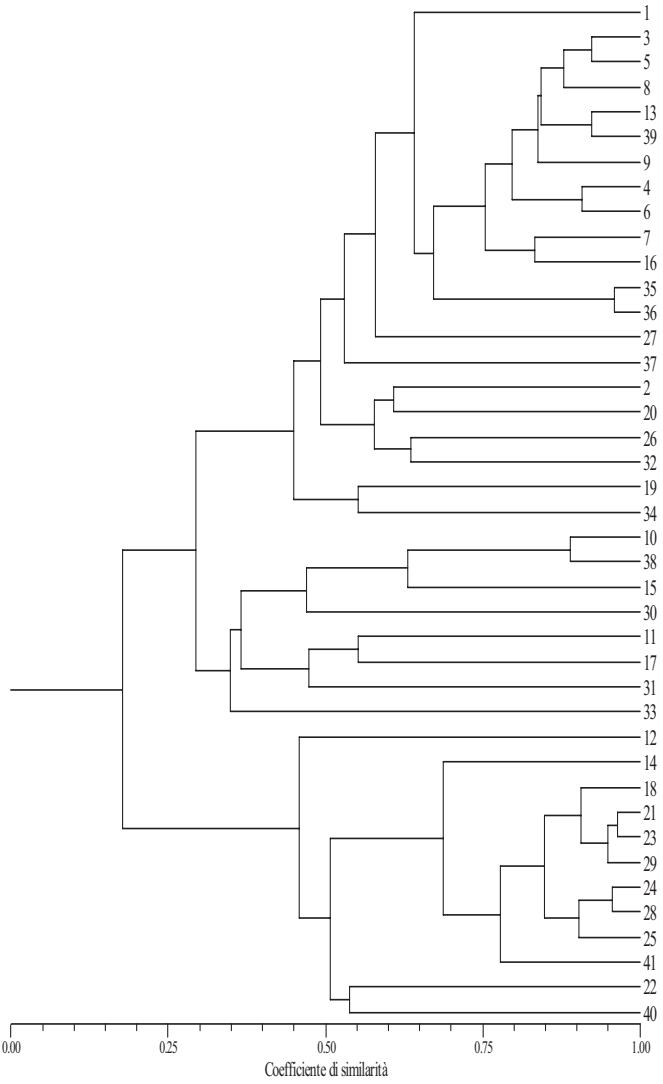


Fig. 1. Dendrogramma prodotto dalla procedura di raggruppamento delle accessioni di castagno delle Colline Metallifere in base alla similarità del profilo molecolare determinato mediante dimensionamento delle bande di DNA amplificate con 8 coppie di primers microsatelliti

Bibliografia

Doyle J.J., Doyle J.L. (1990). *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus,12:13-15.

Fattorini M., Paradisi G., Cantini C., Redi A., Cresti M., Turchi R., Autino A. (2005). *Caratterizzazione genetica di genotipi di castagno dell'Amiata*. Atti del IV Convegno Nazionale sul Castagno, pp. 171-173. Montella, AV, 20-22 ottobre.

Marinoni D., Akkak A., Bounous G., Edwards K.J., Botta R. (2003). *Development and characterization of micro satellite markers in C. sativa (Mill.).* Molecular Breeding, 11:127-136.

Paetkau D., Strobeck C. (1994). *Micro satellite analysis of genetic variation in black bear population*. Mol. Ecol., 3:489-495.

Nitti D., Mann C. (2005). *La coltivazione del castagno da frutto nel territorio della Comunità Montana Colline Metallifere*, pp. 26-33. Comunità Montana Colline Metallifere, Associazione Valorizzazione Castagna alta Maremma.

Turchi R. (2005). *La tutela delle risorse genetiche autoctone della Toscana L.R. 50/97 e L.R. 64/04. Il castagno da legno e da frutto*. Atti del IV Convegno Nazionale sul Castagno, pp.143-146. Montella, AV, 20-22 ottobre.