Review n. 15 – *Italus Hortus* 18 (3), 2011: 47-61

La caratterizzazione varietale del germoplasma di *Castanea sativa* Mill.

Annalisa Silvanini[1*], Daniela Torello Marinoni[2], Gabriele Loris Beccaro[2] e Tommaso Ganino[1]**
[1] *Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Sezione Biologia Vegetale, Università di Parma*
[2] *Dipartimento di Colture Arboree, Università di Torino*

Ricezione: 13 ottobre 2011; Accettazione 9 dicembre 2011

The varietal characterization of *Castanea sativa* Mill. germplasm

Abstract. The *Castanea* which belong to the *Fagaceae* or *Copuliferae* family which also contains *Lithocarpus*, *Northofagus* and *Quercus* was nominated in 1753 by Carl Nilsson Linneaus as *Fagus Castanea*, this emphasizing the beech relationship. In 1768 Philip Miller interpreted the tree as an independent genus reclassifying it with the current binomial. The genus with its species has spread over three main areas, represented by Europe and the Mediterranean countries, Asia and North America. Present chestnut biodiversity displays a high genetic variability, due to its adaptation capacity to quite different pedoclimatic conditions. In Europe, *Castanea sativa* Mill. diffusion is attributable to both its adaptation capacity and man's intervention and especially to the work of Roman and Greek civilizations and to monastic orders during the Middle Ages. The overlapping of these elements has made reconstruction of genus origin and diffusion quite difficult and has originated a large number of forms difficult to characterize. The intuitive process according to which the selected plants were characterised according to their most conspicuous features, by utilizing the so called "vernacular" names, further contributed to increase synonyms and therefore varietal confusion. For the characterization of the cultivated varieties of *Castanea sativa* Mill. two main methods have been utilized; the morphological method was started as back as the XVII century, while the molecular techniques have been adopted of the beginning of the XXI century. Recent genetic developments and use of molecular markers has further helped to clarify and develop models of species diffusion and to understand the effects of man's intervention. In this review is presented the state of the art of traditional and molecular chestnut varietal classification, with emphasis on its limits and peculiarities by comparing research methodologies and results obtained. A classification history and different approaches to varietal characterisation during centuries emerged from this analysis. The earliest classification were mostly based on mainly botanical characters; later agronomical characters were included, with the aim of distinguishing an individual from another in the same species as agricultural varieties. By the beginning of 2000 it was possible to introduce the molecular characterisation which has dramatically increased the potential in both varietal classification and in the studies on the genus origin. Scientists today agree on the assumption that the combination of morphological and molecular techniques is essential for a proper and complete characterisation of chestnut germplasm.

Key words: European chestnut, chestnut descriptors, morphological characterization, molecular markers, SSR markers.

Introduzione

Il genere *Castanea* è naturalmente diffuso in tre grandi areali: in Europa e in tutti i Paesi che si affacciano sul Mediterraneo con la specie *Castanea sativa* Mill., in Asia con *Castanea crenata* Sieb. e Zucc. e *Castanea mollissima* Bl. ed infine in America Settentrionale con la specie *Castanea dentata* Borkh (Bounous, 2002).

Jaynes nel 1975 (Bounous, 2002) ipotizzò che il genere si fosse originato in Cina, paese descritto come il sito di maggiore diversità del genere; dal comune antenato si sarebbero poi originate due principali vie di migrazione, una verso l'Europa che diede origine a *Castanea sativa* Mill., che risulterebbe essere la specie più vicina al progenitore ed una verso l'America dando origine a *Castanea dentata* Borkh. Questa teoria è stata tuttavia messa in discussione già da molti studi, che indicano invece il nord-est della Turchia e la regione del Caucaso come centro di probabile origine del castagno. Villani *et al.* nel 1999 (Bounous, 2002) confermarono una maggiore diversità genetica ed un alto livello di differenziazione genetica all'interno delle popolazioni turche. Tuttavia, fino ad ora, non sono disponibili dati molecolari che confermino le relazioni genetiche tra castagno turco ed il resto delle popolazioni europee. Fineschi *et al.* (2000), studiando diversi aplotipi cpDNA non riuscirono a definire a un modello possibile per la migrazione di questa specie in Europa. Questi autori, basan-

*annalisa.silvanini@nemo.unipr.it **daniela.marinoni@unito.it

dosi sull'assenza di aplotipi spagnoli in Turchia e la loro presenza nella parte restante dell'area di distribuzione, ipotizzano la penisola iberica come un possibile *refugium* di castagno in Europa.

Questi autori, basandosi sull'assenza di aplotipi spagnoli in Turchia e la loro presenza nella parte restante dell'area di distribuzione, ipotizzano la penisola iberica come un possibile *refugium* di castagno in Europa.

I dati palinologici indicano un indigenato del genere *Castanea*, se non proprio della specie *C. sativa*, dei suoi progenitori, in Europa centro meridionale durante l'età terziaria (Fenaroli, 1945). La specie subì diverse fasi di regressione durante le epoche glaciali, ma sopravvisse come dimostrato dai reperti fossili di foglie di *C. sativa* o di specie ancestrali nel deposito interglaciale di Pianico - Sellere (Sordelli, 1886; Fischer, 1896; Amsler, 1900). Inoltre, recenti studi palinologici indicano per la specie una ricchezza di potenziali rifugi glaciali del Pleistocene in Europa (Krebs *et al.*, 2004).

L'attuale enorme biodiversità del genere *Castanea* evidenzia inoltre un'elevata variabilità genetica dovuta all'adattamento alle più diverse condizioni pedoclimatiche. Le varie specie presentano infatti tratti morfologici ed ecologici ben differenziati per quanto riguarda l'habitus vegetativo, le dimensioni, le caratteristiche del frutto e del legno, l'adattabilità e la resistenza a fattori biotici ed abiotici che hanno influenzato grandemente la diffusione o la regressione delle differenti specie nel tempo.

Lo studio sull'origine e la diffusione di specie quali il castagno non può però esimersi dal considerare l'influenza data dall'attività antropica, considerando quindi la probabile sovrapposizione dell'area colturale a quella di naturale distribuzione. Risulta così difficoltoso stabilire quale sia la sua storia attraverso i soli dati palinologici e paleontologici disponibili.

Attraverso un approccio multidisciplinare che considera il ritrovamento di granuli pollinici e le testimonianze di letteratura antica, secondo Conedera (2004) si otterrebbe un'idea più precisa del ruolo che l'attività umana ed in particolare le civiltà Greca e Romana ebbero nella diffusione di questa coltura in Europa, ma, a causa della carenza di dati palinologici e della difficile interpretazione dal punto di vista botanico dei testi classici, l'esatta ricostruzione della storia del castagno risulta difficoltosa. Ciò nonostante i recenti sviluppi in campo genetico e l'utilizzo di marcatori molecolari stanno portando ad ulteriori progressi anche nella ricostruzione di modelli di diffusione delle specie e dell'impatto dell'azione antropica su queste.

Il castagno appartenente alla famiglia delle *Fagaceae* o *Copuliferae* di cui fanno parte anche *Lithocarpus*, *Northofagus* e *Quercus*, venne designato nel 1753 da Carl Nilsson Linnaeus con il binomio *Fagus castanea*, che a questo modo ne sottolineò la parentela con il faggio. Successivamente nel 1768 Philip Miller interpretò la pianta come rappresentativa di un genere autonomo riclassificandola con l'attuale binomio.

Cronologia dei sistemi di caratterizzazione morfologica proposti

Nonostante le incertezze riguardo al suo indigenato, non vi sono dubbi a proposito della coltivazione del castagno quale pratica assai remota. Di essa troviamo menzione già in Isaia, in Omero, in Eustazio che nel suo commento dell'Odissea citò diversi nomi tra cui quello di "maraon" dal quale deriverebbe il nome volgare di marrone già in uso in Italia durante il medioevo. Plinio nell'*Historiae Mundi* lo ritenne originario di Sardi nella Lidia ed elencò addirittura le principali varietà di castagne allora coltivate nel mezzogiorno d'Italia. Essendo questa pianta conosciuta e coltivata fin dalla più remota antichità ne consegue che da questa si siano originate un gran numero di forme spesso difficili a caratterizzarsi scientificamente (Piccioli, 1902).

Gli studiosi occupatisi della sistematica del castagno hanno adottato differenti criteri nel raggruppare le cultivar. Il celebre botanico Pier Antonio Micheli nel 1723 fu il primo a distinguere le cultivar di castagno in base ad un esame comparativo morfologico dei ricci, dei frutti, delle foglie e dei fiori (Breviglieri, 1955).

Ottaviano Targioni Tozzetti nel 1813 prese in considerazione la forma delle castagne e delle foglie. (Vigiani, 1943). Vigiani nel 1900 scrisse che le parti più adatte e costanti a stabilire i criteri per una classificazione delle varietà sono: le foglie (forma, colore e consistenza), le infiorescenze (sviluppo, colore, abbondanza degli amenti maschili) e i frutti (forma, pezzatura, colore, rigidezza delle spine dell'involucro capsulare o riccio, dimensioni dell'ilo negli acheni ecc.). Comelli (1905) studiò 30 cultivar del dipartimento forestale di Bologna annotandone la forma del riccio (cardo), la fenditura, le spine, e la presenza o meno di guscioni (frutti vani). Nella castagna esaminò la forma, il colore dell'epicarpo, le dimensioni del residuo stilare, quelle della cicatrice ilare e la sottigliezza e tenacità dell'episperma (che Piccioli definiva con il termine toscano sansa, o chiamato nell'agro fiorentino con il termine camicia). Mentre per ciò che concerne le caratteristiche della pianta considerò la ricchezza di vegetazione, la rustichezza, la precocità,

la resistenza alle malattie, la grossezza e la forma dei semi nonché lo spessore del tegumento e la bontà ed abbondanza della polpa.

Baglioni (1907) fece una particolare ed accurata descrizione delle varietà coltivate nei territori del Mugello e del Valdarno prendendo in esame principalmente le foglie. Passerini (1908) basò la classificazione sui cotiledoni, sull'ilo e sulla membrana interna.

Intanto in Francia il castagno veniva descritto da Tricaud, Lamy de Lachapelle ed in particolare nel 1911 Lavialle, in occasione della prima esposizione internazionale della castagna di Limoges, utilizzò i campioni esposti per pubblicare l'anno successivo il saggio di classificazione del genere *Castanea* secondo uno schema che fu poi ripreso, modificato e presentato per l'Italia all'Accademia dei Georgofili nel 1919 dal Vigiani. Tale classificazione si basa sulla forma del frutto. I frutti vengono divisi in tre gruppi a seconda del rapporto tra lunghezza ed altezza. Nel primo gruppo le castagne sono caratterizzate dalla lunghezza maggiore dell'altezza, sono cioè di forma ovale, e si dividono poi in ulteriori due sezioni che vedono le castagne ad apice schiacciato e quelle ad apice conico. Il secondo gruppo comprende le castagne rotondeggianti, quelle le cui tre dimensioni si presentano uguali ed anche queste si dividono successivamente in apice schiacciato ed apice conico. Il terzo ed ultimo gruppo vede le castagne nelle quali l'altezza supera la larghezza generando una forma bislunga e queste possono possedere apice acuto o ricurvo.

Nel 1925 Ricci, durante uno studio sulle castagne di Mondovì (CN), utilizzò quali caratteri per la classificazione l'angolo che il dente forma con la lamina fogliare, la lunghezza del dente stesso e della sua appendice filiforme mentre, per ciò che riguarda il frutto, la forma e il rapporto tra l'altezza e la lunghezza; propose poi di dividere le varietà in due gruppi: castagne a forma triangolare e rotonda e ciascun gruppo, a sua volta, in tipiche e allungate.

Nel 1945 Fenaroli scrisse che le variazioni del castagno sono di due ordini, biologiche e morfologiche; sono del primo tipo quelle che si riferiscono alla rusticità o all'esigenza dell'ambiente, alla variabile sapidità dei frutti, alla precocità (agostane, primaticce) o tardività (invernenghe, tardive) di maturazione; sono del secondo tipo quelle riferite al portamento della pianta, alla forma delle foglie e delle infiorescenze ed alla forma, dimensioni e notature dei frutti. Secondo quest'autore mentre le variazioni definite dai caratteri del fusto e dalle foglie rivestono un ruolo marginale dal punto di vista economico, le variazioni che riguardano i caratteri del frutto, assai più numerose, posseggono in pratica grande importanza in rapporto al peso che viene loro attribuito in qualità di prodotto commerciale. Fenaroli inoltre puntualizzava che elaborare una classificazione di varietà colturali in funzione dei frutti, considerando che queste ammontano a diverse centinaia e che i caratteri differenziali (dimensioni e forma del frutto, colore del pericarpo, forma della cicatrice ilare, sapidità) sono generalmente di scarso rilievo e poco stabili e che vengono designate con differenti nomi le varietà coltivate in diverse regioni, diviene compito assai arduo. Fenaroli concluse quindi che non esistono distinzioni nette tra le numerosissime cultivar del castagno ma che, al momento in cui l'autore scriveva, fosse possibile far distinzione con una certa sicurezza, solo tra due grandi gruppi, le castagne propriamente dette e i marroni. Infine l'autore aggiunse che è accertata l'esistenza di due tipi di polline del castagno, differenti per forma e dimensioni, che sembrano riferirsi distintamente a diverse cultivar. Sarebbe quindi negli organi fiorali che le differenze di entità si manifesterebbero nel modo più sicuro e vistoso.

Nel 1955 Breviglieri elaborò una nuova scheda castanografica includendovi le caratteristiche morfologiche, ma anche quelle biologico - genetiche ed agronomiche per giungere alla conoscenza dei caratteri biologico produttivi delle varietà in rapporto alla disponibilità dell'ambiente fisico e colturale oltre che alle caratteristiche merceologiche. La scheda fu redatta traendo spunto dalle schede ampelografiche, elaiografiche e pomologiche al fine di valutare comparativamente i caratteri morfo – biologici, di produttività, resistenza ai parassiti, comportamento nei riguardi dell'ambiente oltre che nei riguardi del valore merceologico del frutto.

La scheda di Breviglieri, ripresa da Baldini nel 1958, fu utilizzata poi nel 1985 per descrivere cultivar di castagno nelle valli del Natisone (Fabbri *et al.* 1985) e nelle valli di Trento (Ponchia *et al.* 1985). Nel 2001 la medesima scheda servì per lo studio di piante di castagno nelle aree della Comunità montana di Feltrina (Ponchia *et al.* 2001a) e nel parco regionale dei colli Euganei (Ponchia *et al.* 2001b).

Nel 1989 l'UPOV (*International Union for the Protection of New Varieties of Plants*) pubblicò una scheda castanografica che, oltre ai caratteri descrittivi, includeva indicazioni riguardo alle caratteristiche richieste per il materiale in esame (es. la pianta deve essere sana, vigorosa ed indenne da tutti i parassiti o principali patologie) ed alle metodologie da seguire per una corretta caratterizzazione morfologica.

Nella regione della Galizia, nel nord ovest della Spagna, nel 1996 Pereira e collaboratori identificarono 82 cultivar, basandosi sugli studi di Breviglieri e

sui descrittori pubblicati dall'UPOV: tali descrittori vennero poi utilizzati nel 2001 per l'identificazione delle cultivar di *C. sativa* censite nel 1949 da Elorrieta nell'arcipelago delle Canarie e nel 2005 nelle regione di Verin - Monterrei (Queijero, *et al.* 2005) e nelle Asturie (Pereira-Lorenzo *et al.* 2005).

Un interessante studio condotto da Bolvansky nella Repubblica di Slovenia nel 2001 individuò le caratteristiche maggiormente discriminanti in ibridi di *C. sativa* x *C. crenata*. Furono analizzati 36 caratteri, molti dei quali conformi ai descrittori ufficiali dell'UPOV oltre ad altri proposti da Kotobuki (1996). L'Autore riuscì, dall'elaborazione dei dati, a individuare tre "classi" di importanza dei diversi descrittori utilizzati (a seconda della capacità di discriminare la popolazione in esame). Tra i caratteri che l'autore considera a "priorità I", quindi maggiormente discriminanti, troviamo quelli relativi all'albero (epoca di germogliamento, epoca di emissione delle infiorescenze maschili, inizio della maturazione dei frutti, percentuale di semi multipli nel frutto, percentuale della penetrazione dell'episperma nel frutto), agli amenti (lunghezza dei filamenti) e ai frutti (estensione della penetrazione dell'episperma e peso medio).

Al fine di studiare le differenze genotipiche e fenotipiche di *C. sativa* Mill. in Slovenia, Solar e colleghi nel 2005, impiegando il metodo indicato dall'UPOV, caratterizzarono i frutti di 244 piante di castagno provenienti da differenti regioni slovene. Dallo studio emerse che le piante provenienti dalle regioni mediterranee risultavano più vicine alle cultivar di castagno italiane (marroni) rispetto a quelle provenienti dalle regioni continentali, sia dal punto di vista genetico che morfologico.

Nella monografia "*Châitagnes et Marrons*" del 1995 pubblicata dal *Centre technique interprofessionnel de fruits et legume* (CITFL), realizzata da Henri Breisch, compare una descrizione morfologica del castagno arricchita da informazioni riguardanti il tempo di conservazione naturale del frutto, l'attitudine alla pelatura meccanica ed alla trasformazione ed alcune indicazioni agronomiche (portainnesto consigliato per ciascuna cultivar e zona di coltivazione: questi dati vengono forniti solo su indicazione del CITFL secondo dati sperimentali).

Nella monografia Pomologia Friulana del 2000, Youssef *et al.* elaborarono e pubblicarono una scheda pomologica sul castagno che si componeva di caratteri riguardanti l'albero, caratteri produttivi ed epoca di raccolta per concludere con un giudizio di insieme riguardo alla pianta in esame.

Nel 2001 venne pubblicato l'*Inventory of Chestnut Research, Germplasm and References* da parte della FAO-CIHEAM (INTERREGIONAL COOPERATIVE RESEARCH NETWORK ON NUTS), contenente un gran numero di dati relativi allo studio del genere *Castanea* condotti dalle più importanti istituzioni coinvolte in questo ambito a livello mondiale e schede descrittive delle diverse cultivar (Bounous *et al.*, 2001).

Ertan nel 2007 pubblicò uno studio in cui la biodiversità del castagno in Turchia venne valutata attraverso l'utilizzo di caratteri pomologici, morfologici e biochimici, da tale studio emerse che i caratteri morfologici giocano un ruolo fondamentale nella distinzione varietale. Dai risultati ottenuti lo stesso autore valutò che alcune tra le variabili utilizzate fossero fortemente dipendenti dal genotipo e quindi utilizzabili nella caratterizzazione varietale del castagno; l'autore inoltre sottolineò l'importanza di integrare i dati da lui ottenuti con analisi molecolari.

Nel 2007 Bellini *et al.* in collaborazione con l'ARSIA (Agenzia per lo Sviluppo e l'Innovazione nel settore Agricolo-forestale) e la Regione Toscana pubblicò "Le Specie legnose da Frutto" una raccolta in due volumi delle liste dei caratteri descrittori per le piante legnose da frutto. Nella scheda riguardante la pianta del castagno, tra i caratteri presi in esame troviamo le caratteristiche dell'albero, dei rami di un anno, della foglia, del fiore, del riccio (fig. 1), del frutto e del seme (fig. 2). Ai caratteri descrittivi morfologici Bellini e collaboratori aggiunsero quelli fenologici, bio-agronomici e tecnologici, le anomalie riguardanti i frutti e la sensibilità ai parassiti.

Nell'Una-Sana Kanton, una regione ricca di foreste della Bosnia Herzegovina, nel 2010 Mujić *et al.* effettuarono uno studio comparativo tra piante innestate e non, basato sulle caratteristiche morfologiche del frutto, concludendo che le prime presentavano frutti di dimensioni e peso maggiori rispetto alle seconde. Da questo lavoro è così possibile dedurre quanto la tecnica colturale possa influenzare le caratteristiche carpologiche del frutto prese in considerazione da questi autori.

Anche se non puntualizzato dagli studiosi stessi, queste considerazioni mettono in evidenza l'importanza, nella caratterizzazione morfologica, di una preventiva valutazione delle condizioni di crescita delle piante in esame.

Caratterizzazione molecolare

I metodi tradizionali di caratterizzazione sono basati principalmente sull'osservazione di tratti morfologici i quali però possono subire l'influenza della variabilità ambientale.

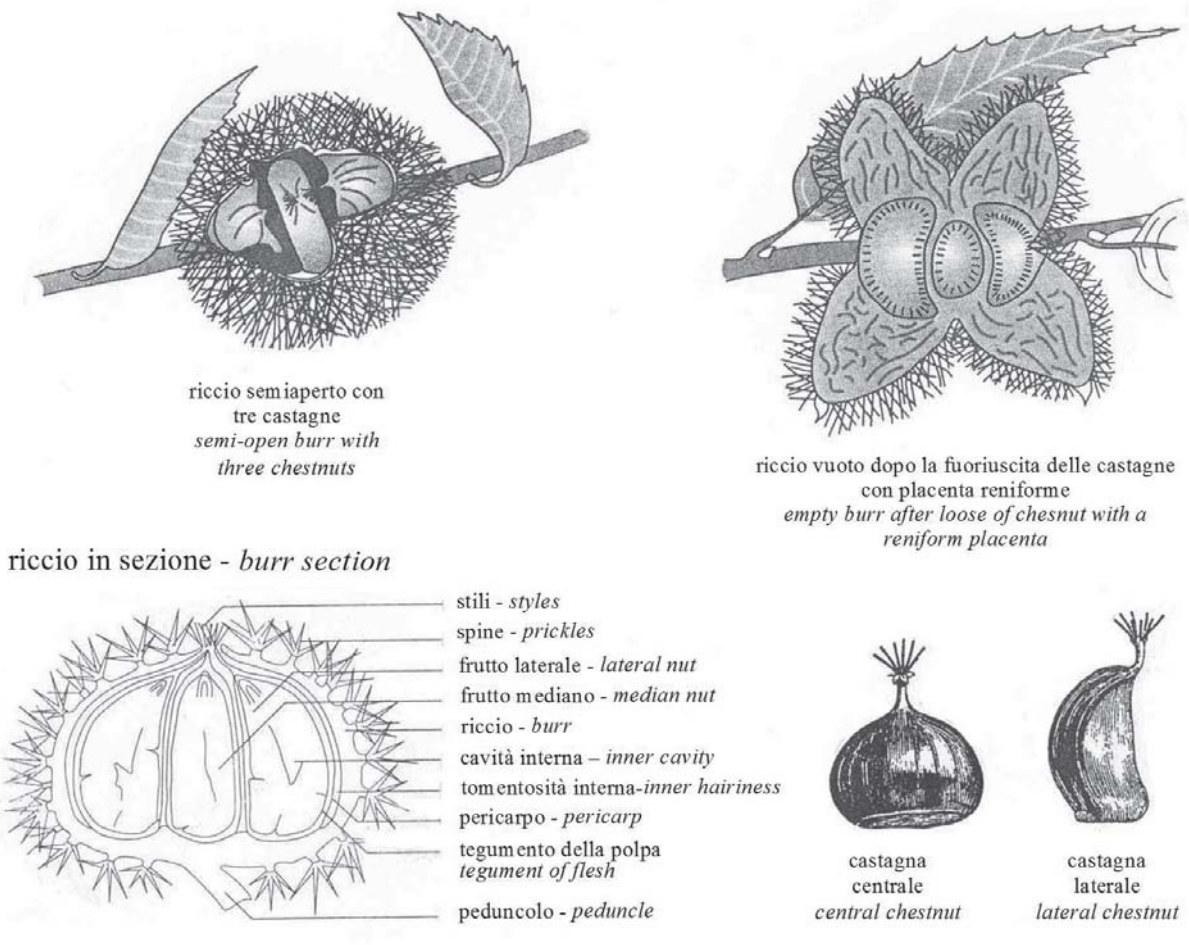


Fig. 1 - Frutto: aspetto del riccio (Bellini *et al.*, 2007).
Fig. 1 - Fruit: aspect of burr (Bellini et al*., 2007).*

I principali limiti della caratterizzazione morfologica consistono in:

- controllo poligenico dei caratteri morfologici e fenologici;
- forte influenza delle condizioni pedoclimatiche e delle tecniche colturali sulla loro espressione;
- necessità di considerare un elevato numero di caratteri per redigere un'idonea scheda descrittiva;
- esigenza di rilevare i parametri per più anni consecutivi.

Dunque, la sola utilizzazione di caratteri morfologici, fenologici e agronomici non consente la precisa identificazione varietale delle cultivar; per questo motivo negli ultimi anni si sono aggiunte analisi ultrastrutturali, biochimiche e molecolari.

Analisi ultrastrutturali

Alcuni Autori propongono lo studio della morfologia del polline come mezzo di identificazione (Fenaroli, 1945). Questo sistema non si è tuttavia affermato negli anni come valido strumento nella caratterizzazione varietale.

Analisi biochimiche e molecolari

I marcatori biochimici (come proteine totali e di riserva e isoenzimi) e molecolari sono utilizzati nello studio della tassonomia delle piante basandosi sul polimorfismo esistente in una popolazione o tra popolazioni per proteine, enzimi o sequenze di DNA genomico. In questo modo la caratterizzazione viene effettuata in modo oggettivo a prescindere dall'influenza dei caratteri poligenici (quantitativi) e dall'interazione genotipo-ambiente.

Isoenzimi

Gli isoenzimi sono forme molecolari diverse di enzimi aventi la medesima funzione metabolica. L'impiego dei marcatori isoenzimatici ha avuto un notevole sviluppo per la relativa semplicità di applicazione delle metodologie e per i costi contenuti d'analisi; i limiti al loro impiego derivano però dal fatto che molti isoenzimi hanno un numero di *loci* polimorfici molto limitato e i risultati sono piuttosto variabili in relazione a fattori ambientali, al tipo di tessuto od organo analizzato e allo stadio fisiologico

della pianta (Sansavini e Pancaldi, 1994). Gli isoenzimi hanno trovato largo impiego, soprattutto in passato, nello studio della variabilità genetica del castagno e sono stati molto utilizzati per studiare l'evoluzione di questa specie.

Nel 1991 Villani e collaboratori studiarono 13 popolazioni turche; gli autori nel loro lavoro evidenziarono la presenza di un notevole polimorfismo tra le popolazioni orientali e occidentali e trovarono che quest'ultime erano più correlate, da un punto di vista genetico, alle popolazioni italiane. Nel 1994, lo stesso gruppo di lavoro (Villani *et al.*, 1994) ampliò lo studio della struttura e della variabilità genetica a 52 popolazioni distribuite in tutto l'areale di diffusione del castagno in Europa. Gli autori misero in evidenza l'esistenza di 4 zone principali che giocarono molto presumibilmente un ruolo base per l'evoluzione e la diffusione del castagno: 1) la Turchia occidentale, probabile centro di origine della specie; 2) la Turchia orientale, area dove si presume la coltivazione del castagno ebbe inizio; 3) l'Italia, primo Paese a partire dal quale il castagno fu introdotto dai Romani nel resto dell'Europa; 4) la Francia, area vicina al limite settentrionale di diffusione della specie, che rappresenterebbe le ultime fasi di espansione di questa fagacea. Questa teoria è tuttavia ancor oggi oggetto di ampie discussioni, soprattutto alla luce dei più recenti studi palinologici.

Nel 1994 Fineschi e collaboratori impiegarono gli isoenzimi per lo studio della variabilità genetica di 20 cultivar di castagno diffuse nel nord, centro e sud Italia. Questo gruppo di ricerca mise in luce un grado relativamente alto di omogeneità tra gli individui appartenenti alla stessa cultivar e tra quelle appartenenti alla stessa area geografica, ma riscontrò un'elevata variabilità genetica tra cultivar provenienti da diverse aree geografiche.

In Portogallo, nel 1999, Pereira e collaboratori utilizzarono gli isoenzimi per la caratterizzazione genetica di cultivar portoghesi, mettendo in risalto un basso grado di omogeneità tra le cultivar.

Più recentemente, nel 2005, Ramos-Cabrer and Pereira Lorenzo impiegarono gli isoenzimi, oltre a marcatori morfologici, per lo studio di 50 accessioni di castagno diffuse in tutta la Spagna; i risultati ottenuti evidenziarono l'esistenza di una variabilità genetica più bassa in Estremadura (Spagna centrale) e Andalusia (Spagna meridionale), rispetto alla Galizia (Spagna nord-occidentale), fatto imputato all'importanza minore che questa coltura riveste nel Sud della Spagna. Questi risultati furono poi approfonditi estendendo lo studio degli isoenzimi, sempre unitamente all'osservazione dei tratti morfologici, a 152 cultivar spagnole, di cui 58 con valenza commerciale, e 94 di importanza locale. Vennero riscontrati ben 14 gruppi di sinonimie e fu messo in evidenza che le cultivar provenienti dalla Galizia e dalle Asturie non si differenziavano in termini genetici, mentre le cultivar del Sud della Spagna mostravano un livello di variabilità genetica nettamente inferiore, confermando in tal modo i risultati del precedente lavoro (Pereira-Lorenzo *et al.*, 2006).

Analisi molecolari

Alla fine degli anni '80, l'impiego delle tecniche di analisi del DNA ha contribuito in modo decisivo a risolvere i problemi di riconoscimento varietale, tramite la definizione di parametri di identificazione oggettivi, permettendo un riordino delle risorse genetiche e valorizzando in tal modo la biodiversità. Queste tecniche infatti permettono di studiare il genoma delle specie vegetali tracciando il "profilo di DNA" caratteristico di ciascun individuo, analizzando particolari zone del DNA dette marcatori molecolari.

Un marcatore molecolare può essere definito come quel locus genomico, rilevabile mediante sonde (= *probe*) o inneschi (= *primer*) specifici che, in virtù della sua presenza, individua in maniera caratteristica e inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica e le regioni che lo circondano alle estremità 5' e 3' (Barcaccia *et al.*, 2000). I marcatori molecolari si basano quindi sulla rilevazione diretta di differenze (polimorfismi) nella sequenza nucleotidica del DNA che costituisce il genoma di ogni individuo (dovute ad intersezioni, delezione, traslocazione, duplicazioni, mutazioni puntiformi, ecc.).

Per la ricerca genetica i marcatori molecolari rappresentano strumenti eccezionali, poiché consentono di identificare specifiche sequenze nucleotidiche e quindi di analizzare polimorfismi di particolari geni o regioni cromosomiche. All'interno di una specie gli individui si diversificano l'uno dall'altro per un numero più o meno elevato di caratteri e ciò mette nella condizione di poter rilevare i polimorfismi nelle regioni di DNA omologhe (*loci*).

Numerosi marcatori molecolari sono stati utilizzati nel castagno per differenti applicazioni oltre all'identificazione delle cultivar, che vanno dalla genetica delle popolazioni, all'analisi di linkage e alla selezione assistita: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), I-SSR (*Inter-simple Sequence Repeats o intermicrosatelliti*), SSR (*Simple Sequence Repeats o microsatelliti*), SAMPL (*Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci*), AFLP (*Amplification Fragment Length Polymorphism*) e più recentemente SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

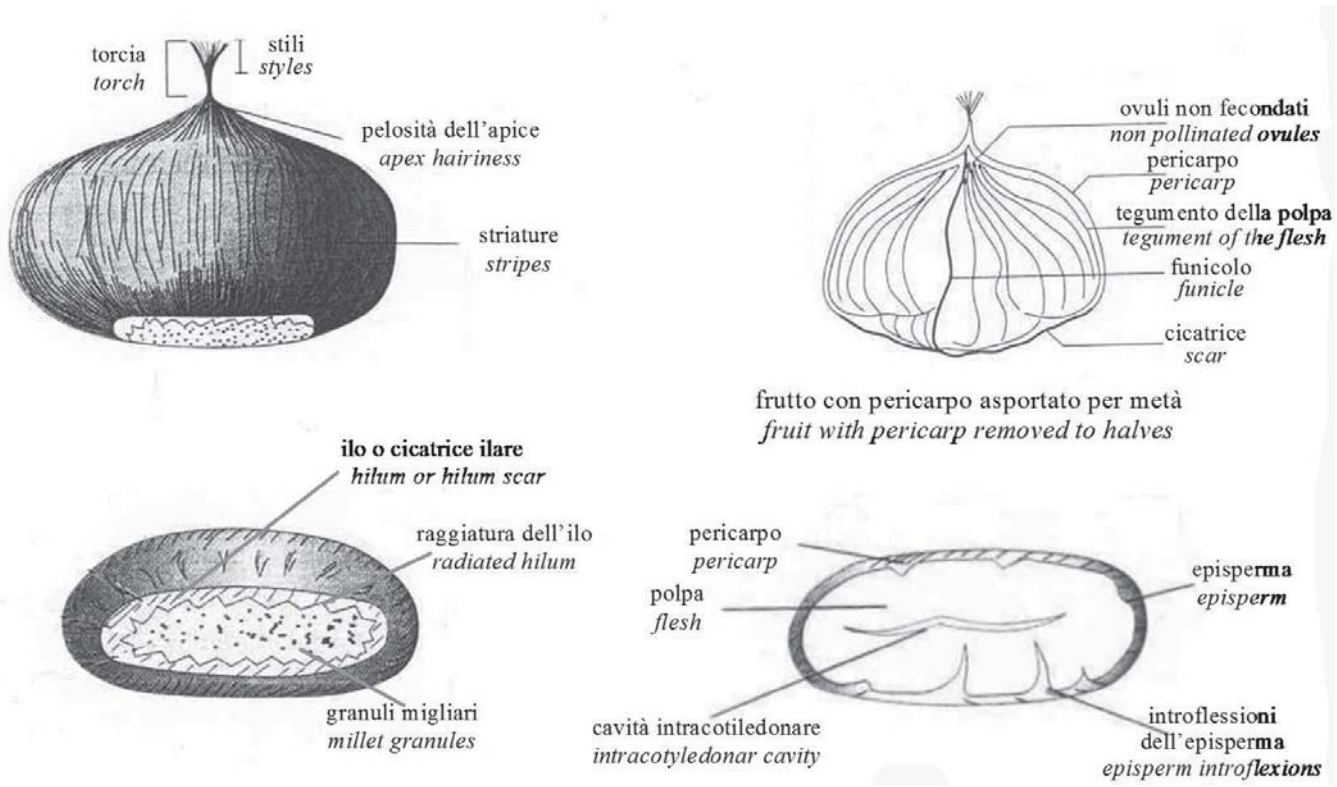


Fig. 2 - Frutto: caratteristiche e nomenclatura (Bellini *et al.*, 2007).
Fig. 2 - Fruit: characteristics, nomenclature (Bellini et al*., 2007).*

Questi sistemi di caratterizzazione fanno parte dei marcatori molecolari basati su tecniche di amplificazione, ovvero sulla reazione a catena della DNA polimerasi (PCR) scoperta da Mullis e collaboratori (1986). La PCR consente di sintetizzare ripetutamente in vitro e per via enzimatica uno o più segmenti di DNA situati tra due sequenze nucleotidiche note, producendo un numero elevato di copie attraverso una serie di reazioni di denaturazione del DNA, ibridazione dei primer e polimerizzazione dei nuovi filamenti (Tautz, 1988; Dietrich *et al.*, 1992; Morgante e Olivieri, 1993; Bell e Ecker,1994).

I marcatori RAPD consentono l'amplificazione del DNA, tramite l'utilizzo della PCR, senza che vi sia la necessità di conoscenze specifiche sulle sequenze nucleotidiche del DNA in esame, utilizzando primer di breve lunghezza (solitamente 10 basi) e di sequenza arbitraria (Welsh e McClelland 1990; Williams *et al.*, 1990); il polimorfismo tra genotipi si manifesta come presenza o assenza di frammenti amplificati dello stesso peso molecolare. Questa tecnica ha avuto un particolare successo per la possibilità di valutare contemporaneamente più individui a costi contenuti, per l'alto polimorfismo, per la buona copertura del genoma utilizzato e infine per la facilità con cui l'analisi è eseguibile senza la necessità di una strumentazione particolarmente avanzata; la tecnica presenta però alcuni aspetti negativi tra cui la necessità di standardizzare le condizioni di analisi per evitare una scarsa riproducibilità dei risultati, favorita anche dalla relativa sensibilità ai cambiamenti delle condizioni sperimentali. Nonostante questi aspetti negativi, l'introduzione dei marcatori RAPD ha suscitato un grande interesse nel campo dell'identificazione varietale e il numero di specie studiate con questa tecnica è veramente elevato. La tecnica dei RAPD è stata a lungo utilizzata per lo studio del castagno e, ancora recentemente, viene impiegata per la sua facilità di esecuzione e i costi contenuti.

Per quanto riguarda la caratterizzazione genetica nell'ambito del germoplasma di *Castanea sativa*, in Italia Galderisi e collaboratori (1998) impiegarono i marcatori RAPD per identificare le principali cultivar di castagno di importanza commerciale per la Regione Campania. In Portogallo, Valdiviesso (2000) usò lo stesso tipo di marcatori molecolari, unitamente però alla descrizione dei caratteri morfologici, per lo studio di cultivar portoghesi.

Sempre in Italia, nel 2001 Ponchia e collaboratori impiegarono marcatori RAPD per caratterizzare e dar vita ad un rilancio della castanicoltura da frutto nel comprensorio di Feltre, in provincia di Belluno, dove questa ad oggi occupa una superficie ridotta ma vanta una tradizione antichissima. In particolare i marcatori

Tab. 1 - Risultati ottenuti dai diversi autori che hanno caratterizzato popolazioni di castagno europeo. La lettera "s" in apice di alcuni alleli indica che l'allele in questione è caratteristico di *C. sativa* Mill.

Tab. 1 - Results of European chestnut germplasm characterization obtained by different Authors. The alleles with an "s" are typical for C. sativa *Mill.*

Primer	Area di studio	Dimensione alleli	N°Alleli	Fonte
CsCAT1	*Toscana (Colline Metallifere)*			Cantini *et al.*, 2009
	Toscana (Monte Amiata)			Paradisi, 2005
	Piemonte		5	Akkak *et al.,* 2002
	Piemonte	194-207-209-215-223	5	Marinoni *et al.,* 2003
	Spagna		8	Martin *et al.,* 2009
CsCAT2	*ITALY Appennino Parmense*	198-206-208-212-214-218-224-230-232-234-243-252	12	Beghè *et al.,* 2009
	Piemonte		8	Akka *et al.,* 2002
	Piemonte	207-211-213-215-219-225-229-231	8	Marinoni *et al.,* 2003
	Spagna		10	Martin *et al.,* 2009
	Svizzera		21	Gobbin *et al.,* 2007
CsCAT3	Piemonte		10	Akkak *et al.,* 2002
	Toscana (Colline Metallifere)			Cantini *et al.,* 2009
	Toscana (Monte Amiata)			Paradisi, 2005
	Piemonte	190-225-227-233-235-241-251-253-257-269	10	Marinoni *et al.,* 2003
	Spagna -Portogallo-Francia	198-210-224-226-228-230^{s}-232-234-236-238-240-242-244^{s}-250-252-254-256^{s}	17	Pereira-Lorenzo *et al.,* 2010
	Spagna		13	Martin *et al.,* 2009
CsCAT4	*Appennino Parmense*	214-216-222-238	4	Beghè *et al.,* 2009
	Piemonte		6	Akkak *et al.,* 2002
	Spagna -Portogallo-Francia	134-142-150-160	4	Pereira-Lorenzo *et al.,* 2010
	Piemonte	215-223-227-237-239-241	6	Marinoni *et al.,* 2003
CsCAT5	*Appennino Parmense*	216-222-234-240-244-246-252	7	Beghè *et al.,* 2009
	Piemonte		5	Akkak *et al.,* 2002
	Piemonte	216-231-233-239-245	5	Marinoni *et al.,* 2003
CsCAT6	*Toscana (Colline Metallifere)*			Cantini *et al.,* 2009
	Piemonte		8	Akkak *et al.,* 2002
	Toscana (Monte Amiata)			Paradisi, 2005
	Piemonte	161-167-175-181-185-187-195-197	8	Marinoni *et al.*, 2003
	Spagna		10	Martin *et al.,* 2009
CsCAT7	Piemonte		5	Akkak *et al.,* 2002
	Piemonte	188-208-212-214-224	5	Marinoni *et al.,* 2003
CsCAT8	Piemonte		5	Akkak *et al.,* 2002
	Piemonte	200-202-204-210-214	5	Marinoni *et al.,* 2003
CsCAT14	Piemonte		4	Akkak *et al.,* 2002
	Piemonte	135-144-152-163	4	Marinoni *et al.,* 2003
	Svizzera		10	Gobbin *et al.,* 2007
CsCAT15	*Appennino Parmense*	120-128-134-138-140-144	6	Beghè *et al.,* 2009
	Piemonte		7	Akkak *et al.,* 2002
	Piemonte	125-127-133-137-139-143-160	7	Marinoni *et al.,* 2003
CsCAT16	*Toscana (Monte Amiata)*			Paradisi, 2005
	Toscana (Colline Metallifere)			Cantini *et al.,* 2009
	Piemonte	127-132-134-143-145-147-157	7	Marinoni *et al.,* 2003
	Spagna -Portogallo-Francia	127-131-133-139-141-143-145-147	8	Pereira-Lorenzo *et al.,* 2010
	Spagna		5	Martin *et al.,* 2009

Tab. 1 - Risultati ottenuti dai diversi autori che hanno caratterizzato popolazioni di castagno europeo. La lettera "s" in apice di alcuni alleli indica che l'allele in questione è caratteristico di *C. sativa* Mill.

Tab. 1 - Results of European chestnut germplasm characterization obtained by different Authors. The alleles with an "s" are typical for C. sativa *Mill.*

Primer	Area di Studio	Dimensione alleli	N° alleli	Fonte
CsCAT17	*Toscana (Colline Metallifere)*			Cantini *et al.,* 2009
	Toscana (Monte Amiata)			Paradisi, 2005
	Piemonte	140-142-147-151-156-163	6	Marinoni *et al.*, 2003
	Svizzera		12	Gobbin *et al.,* 2007
CsCAT34	Piemonte	146-155-166-169-189	5	Marinoni *et al.,* 2003
CsCAT41B	Spagna -Portogallo-Francia	216-220-222^{s}-224-226-228-230-232-236-238	10	Pereira-Lorenzo *et al.,* 2010
CsCAT41	Piemonte	205-215-220-223-225-227-231-237-239	9	Marinoni *et al.,* 2003
EMCs2	*Appennino Parmense*	152-158-161-164-167	5	Beghè *et al.,* 2009
	Spagna -Portogallo-Francia	161-164-167	3	Pereira-Lorenzo *et al.,* 2010
	Regno Unito		3	Buck, 2003
EMCs4	*Appennino Parmense*	168-171-174	3	Beghè *et al.,* 2009
	Regno Unito		3	Buck, 2003
EMCs10	*Regno Unito*		3	Buck, 2003
EMCs11	*Regno Unito*		2	Buck, 2003
EMCs13	*Appennino Parmense*	150-159-162	3	Beghè *et al.,* 2009
	Regno Unito		3	Buck, 2003
EMCs14	Spagna -Portogallo-Francia	133-142	2	Pereira-Lorenzo *et al.,* 2010
	Regno Unito		1	Buck, 2003
EMCs15	Spagna -Portogallo-Francia	83-86-89-92	4	Pereira-Lorenzo *et al.,* 2010
	Regno Unito		5	Buck, 2003
EMCs17	*Appennino Parmense*	209-212-218-221	4	Beghè *et al.*, 2009
	Regno Unito		5	Buck, 2003
EMCs22	*Toscana (Monte Amiata)*			Paradisi, 2005
	Regno Unito		6	Buck, 2003
	Svizzera		4	Gobbin *et al.,* 2007
EMCs25	*Regno Unito*		5	Buck, 2003
	Spagna		5	Martin *et al.,* 2009
EMCs32	*Regno Unito*		8	Buck, 2003
EMCs38	*Toscana (Monte Amiata)*			Paradisi, 2005
	Regno Unito		12	Buck, 2003
	Spagna		10	Martin *et al.,* 2009
EMCs42	*Toscana (Monte Amiata)*			Paradisi, 2005
	Regno Unito		3	Buck, 2003
BH1	*Toscana (Colline Metallifere)*			Cantini *et al.*, 2009
BH2	*Toscana (Colline Metallifere)*			Cantini *et al.*, 2009
BH4	*Toscana (Colline Metallifere)*			Cantini *et al.,* 2009
OCI	Svizzera		6	Gobbin *et al.,* 2007
OAL	Svizzera		10	Gobbin *et al.,* 2007
RIC	Svizzera		7	Gobbin *et al.,* 2007
CIO	Svizzera		8	Gobbin *et al.,* 2007
QpZAG36	Spagna -Portogallo-Francia	210-216-218-220-222	5	Pereira-Lorenzo *et al.,* 2010
QpZAG110	Spagna -Portogallo-Francia	208^{s}-212-214-218-220-222-224	7	Pereira-Lorenzo *et al.,* 2010
QrZAG96	Spagna -Portogallo-Francia	149-153-155-159-161-163-165	7	Pereira-Lorenzo *et al.,* 2010

RAPD furono utilizzati per verificare alcune differenze morfologiche, biometriche e carpologiche. Dallo studio condotto emersero interessanti forme di polimorfismo in particolare nelle piante che mostravano differenze morfologiche nel fiore; la morfologia fiorale quindi risultò essere genotipo dipendente. Meneghetti e collaboratori (2001) utilizzarono marcatori RAPD, AFLP e SAMPL per valutare la distribuzione e la variabilità genetica di tre popolazioni di castagno dell'Italia nord-orientale: Colli Euganei (PD), Feltre (BL), Valli del Natisone (UD). I marcatori RAPD risultarono più efficienti nel discriminare tra individui con fiori astaminei e non astaminei, indipendentemente dalla loro provenienza; i marcatori AFLP separarono le due provenienze venete da quella friulana, senza però discriminare tra le prime due; i marcatori SAMPL si dimostrarono i più efficaci nell'analisi della variabilità genetica nell'ambito della popolazione dei Colli Euganei.

Nel 2001, in Slovenia, Solar e collaboratori iniziarono un progetto di ricerca con l'obiettivo principale di valorizzare il germoplasma castanicolo nazionale: gli autori analizzarono, con marcatori morfologici e RAPD, 171 cultivar di *Castanea sativa* provenienti da 3 diverse regioni della Slovenia ed estesero successivamente (Solar *et al.,* 2005) il numero di campioni oggetto di studio a 244. La Slovenia risultò essere una preziosa fonte di biodiversità, in particolare gli autori riscontrarono una maggiore diversità genetica delle cultivar presenti nell'area continentale, rispetto alle cultivar del Mediterraneo, che risultarono geneticamente più omogenee. Nel 2004 Abdelhamid e collaboratori utilizzarono RAPD e AFLP per identificare cultivar di castagno coltivate e diffuse in Svizzera, evidenziando un'alta e significativa correlazione tra i risultati ottenuti con questi due marcatori molecolari. Nel 2006 Emiliani e collaboratori applicarono i marcatori RAPD per caratterizzare alcune cultivar di castagno da frutto e da legno diffuse in Toscana.

Nel 2001 Goulão e collaboratori confrontarono i risultati ottenuti dall'utilizzo di marcatori RADP e I-SSR per la caratterizzazione genetica del castagno, mettendo in luce un'alta corrispondenza tra i risultati ottenuti con i due metodi, anche se i marcatori I-SSR si dimostrarono più riproducibili e più efficaci e veloci, in quanto marcatori multi-locus. I marcatori I-SSR o inter-microsatelliti (Zietkiewicz *et al.*, 1994), così chiamati perché mediante PCR vengono amplificate le regioni comprese fra due microsatelliti, sono chiamati marcatori multi-locus poiché permettono di analizzare molti loci genomici per esperimento; anche se la percentuale di polimorfismo che si trova con questi marcatori è bassa.

Abbastanza recente è invece l'impiego dei marcatori AFLP. La tecnica degli AFLP, introdotta nel 1992, da Zabeau e Vos, si basa sul polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione amplificate mediante PCR e consente di studiare fino ad un centinaio di loci contemporaneamente con una sola corsa elettroforetica. Il grosso vantaggio di questa tecnica è che consente di studiare molti loci contemporaneamente e quindi ottenere facilmente un elevato polimorfismo tra i genomi. Tra gli svantaggi della tecnica bisogna ricordare la necessità di disporre di DNA in grande quantità e di elevata qualità, ovvero privo di interferenti che inibiscano gli enzimi di restrizione. Gli AFLP sono stati utilizzati soprattutto nella caratterizzazione genetica del castagno di origine asiatica.

Gli SSR o microsatelliti consentono di mettere in evidenza i polimorfismi a livello delle sequenze ripetute di DNA. Nel genoma di ogni organismo sono infatti presenti sequenze ripetute molto semplici definite microsatelliti. I polimorfismi vengono messi in evidenza utilizzando primer specifici disegnati in modo da essere complementari alle sequenze fiancheggianti i microsatelliti che risultano essere altamente conservate; le differenze non riguardano il motivo ripetuto, bensì il numero di volte che questo è presente nel segmento di DNA amplificato. I prodotti ottenuti mediante la tecnica della PCR sono generalmente sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide in quanto questa permette di mettere in evidenza polimorfismi di poche basi (2-5 bp).

L'isolamento e la caratterizzazione dei *loci* microsatelliti prevede il clonaggio di sequenze *locus*-specifiche attraverso la costruzione di una libreria genomica della specie voluta, lo *screening* di questa con sonde per sequenze ripetute, il sequenziamento dei cloni positivi e il disegno dei primer complementari alle regioni fiancheggianti.

I microsatelliti risultano essere una tipologia di marcatori molto utilizzata in quanto:

- sono molto abbondanti (in media ogni 23,3Kb) (Wang *et al.*, 1994);
- sono estremamente polimorfici;
- sono co-dominanti, permettendo di distinguere la condizione omozigote da quella eterozigote;
- risultano essere facilmente trasportabili all'interno della stessa specie o di specie tassonomicamente molto vicine. Un marcatore è detto trasportabile quando utilizzato su un individuo diverso nell'ambito della stessa specie o di specie vicine può essere riprodotto (= amplificato) con gli stessi primer mantendo il polimorfismo (un esempio di trasportabilità è proposto da Pereira *et al.*, 2010);
- i risultati sono molto riproducibili.

I limiti maggiori degli SSR sono da ricercarsi soprattutto nel lungo lavoro necessario per l'isolamento del *locus* microsatellite stesso (e quindi anche per gli alti costi iniziali) e nella difficoltà di discriminare i cloni.

I microsatelliti trovano ampia applicazione nella costruzione di mappe di *linkage*, in studi di genetica di popolazione, in analisi di *pedigree* e *fingerprinting* ed in programmi di selezione MAS (*Marker Assisted Selection*).

Tra il 2001 ed il 2003, per la specie *C. sativa*, furono isolati e caratterizzati 33 SSR marker indicati con la sigla CsCAT dei quali 14 risultarono particolarmente polimorfici (Botta *et al.*, 2001; Akkak *et al.*, 2002; Marinoni *et al.*, 2003). Questi furono successivamente utilizzati dal dipartimento di Colture Arboree di Torino al fine di studiare la struttura genetica del castagno in 5 Paesi europei (Italia, Francia, Spagna, Regno Unito e Grecia) ed il flusso genico tra differenti popolazioni di castagno a diversi gradi di domesticazione.

Nel 2003 Buck e collaboratori isolarono, ottimizzarono e caratterizzarono 13 loci microsatelliti denominati con la sigla EMCS e ne proposero l'applicazione in studi riguardanti la mappatura e/o la caratterizzazione genetica. Caratteristica di alcuni di questi loci è quella di essere trinucleotidici ovvero il motivo ripetuto all'interno del microsatellite è costituito da 3 basi. Sebbene i microsatelliti trinucleotidici siano più facili da interpretare e più stabili (mutano infatti ad un tasso inferiore rispetto a quello dei dinucleotidici) (Chakraborty *et al.* 1997), possono risultare meno polimorfici (Buck *et al.*, 2003). Nel 2005 Paradisi e collaboratori insieme con l'Associazione per la valorizzazione della "Castagna dell'Amiata IGP", la Comunità Montana dell'Amiata e l'ARSIA, utilizzando 4 primer appartenenti al gruppo EMCs e 5 appartenenti al gruppo CsCAT, iniziarono un lavoro di ricerca con l'obiettivo di recuperare e valorizzare il germoplasma castanicolo toscano. Vennero presi in esame 22 esemplari di *C. sativa* appartenenti all'areale di produzione della "Castagna del Monte Amiata". I dati ottenuti evidenziarono un elevato grado di polimorfismo allelico e quindi di biodiversità; i profili genetici così ottenuti contribuirono alla creazione di un database per identificare i singoli individui.

Gobbin *et al.* nel 2007 isolarono e caratterizzarono 4 loci microsatelliti (OCI, OAL, RIC, CIO) e testarono 4 loci microsatelliti di cui 3 della serie CsCAT e uno della serie EMCs. Il gruppo di ricerca prese in esame 164 accessioni conservate in un campo collezione nei territori del Sud della Svizzera. Grazie all'utilizzo di questi primer fu possibile ottenere il profilo genetico e quindi individuare cultivar e valutarne la variabilità intracultivar, inoltre fu possibile individuare omonimie, sinonimie ed una complessa variabilità genetica nella popolazione oggetto di studio.

Martin e collaboratori nel 2009 pubblicarono uno studio il cui scopo era quello di caratterizzare dal punto di vista morfologico e genetico 38 varietà coltivate nel Sud della Spagna, in particolare provenienti dalle regioni di Huelva e Malaga. I 7 loci microsatelliti utilizzati delle serie CsCAT e EMCs permisero di identificare 35 genotipi ed attribuire ai due gruppi di differente provenienza profili allelici caratteristici.

Nello stesso anno, in Italia Cantini *et al.* utilizzarono 5 marcatori microsatelliti della serie CsCAT e 3 della serie BH nell'identificazione varietale di castagni coltivati nel territorio delle colline Metallifere, rappresentati da esemplari storici delle cultivar più diffuse sul territorio e da esemplari ad attribuzione incerta. Caratterizzando tutte le accessioni si diede un contributo al processo di valorizzazione delle produzioni castanicole locali.

Il primo studio molecolare su larga scala basato sull'utilizzo di microsatelliti fu pubblicato da Pereira *et al.* nel 2010. Oggetto di studio furono piante innestate provenienti dalla penisola Iberica e dalle isole Canarie e ibridi interspecifici resistenti al mal d'inchiostro. Utilizzando 10 loci microsatelliti 4 della serie CsCAT, 3 della serie EMCs, e 3 della serie QpZAG vennero analizzati 574 esemplari di *Castanea sativa* e 71 genotipi che gli autori definiscono genericamente "ibridi interspecifici", confrontati con 47 accessioni di *Castanea crenata*, 37 di *Castanea mollissima* e 33 di *Castanea henryi*; le accessioni furono infine analizzate con un modello statistico Bayesiano e con analisi fattoriale. I marcatori molecolari SSR utilizzati risultarono adeguati sia per la genotipizzazione delle quattro specie di *Castanea* e degli ibridi sia nell'indagine dei livelli di introgressione genetica delle specie provenienti dall'area atlantica nelle specie europee. In particolare sono emerse due principali origini della variabilità delle accessioni coltivate nella penisola Iberica di cui una nel nord ed una nel centro del Paese.

In tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti dai diversi autori che hanno caratterizzato popolazioni di *C. sativa*. Nella tabella vengono riportati, per ogni primer utilizzato, il numero e la dimensione degli alleli individuati e l'area di studio.

Conclusioni

Nonostante la grande ricchezza del germoplasma di varietà di *C. sativa* Mill., in molti contesti l'ecosistema castagneto è profondamente degradato e la bio-

diversità del panorama varietale ancora esistente rischia di essere perduta insieme ai tradizionali ruoli che questa specie ha rivestito nella storia; dalla produzione di legname e di castagne, alle funzioni paesaggistiche ed ambientali fondamentali per la qualità della vita dell'uomo.

La verifica della rispondenza varietale e la caratterizzazione delle cultivar, tradizionalmente eseguite con osservazioni morfologiche, fenologiche e biometriche, assume quindi un ruolo sempre più determinante nell'individuazione e nella conservazione del germoplasma: per questi motivi, la caratterizzazione varietale si avvale oggi dell'applicazione di tecniche d'analisi del DNA che utilizzano i marcatori molecolari. La messa a punto di adeguate tecniche di analisi del DNA, tuttavia, non è finalizzata alla sola caratterizzazione genetica per il recupero e la conservazione del germoplasma, ma motivata anche dall'interesse per la valorizzazione delle produzioni locali allo scopo di rendere possibile la tracciabilità delle stesse, cosa particolarmente sentita nell'ambito dei prodotti tutelati da certificazioni, per l'individuazione di errori nei campi collezione, che tanta importanza rivestono per la conservazione ex situ del germoplasma, per l'individuazione dei casi di omonimia e sinonimia e risoluzione di eventuali controversie legali e per la certificazione delle produzioni vivaistiche.

Da quanto detto emerge che un rilancio della castanicoltura deve prevedere l'acquisizione preliminare di informazioni sul germoplasma locale e la catalogazione delle accessioni attraverso l'impiego di descrittori morfologici e marcatori molecolari. Poiché tuttavia le esperienze finora condotte hanno seguito metodologie eterogenee, sarebbe utile una standardizzazione dei metodi utilizzati e l'utilizzo di una scheda descrittiva comune che rappresenti la base di partenza nel lavoro di caratterizzazione varietale alla quale ogni autore possa eventualmente aggiungere dei descrittori che siano di ausilio nella descrizione della cultivar oggetto di studio.

Le informazioni ottenute mediante le schede morfologiche devono necessariamente essere integrate da quelle inerenti il profilo genetico di ogni individuo. L'impiego delle tecniche molecolari presenta tuttavia due limiti: l'elevato costo delle analisi (che è andato diminuendo negli anni) e la necessità di personale altamente specializzato. Tali metodi, però, riuscirebbero ad evidenziare non solo le differenze tra le varietà, ma anche la variabilità intracultivar indipendentemente dall'ambiente. Poiché tra le tecniche molecolari gli SSR risultano essere i più efficaci e riproducibili, essi rappresentano i candidati ideali da utilizzare ad integrazione delle schede castanografiche; sarebbe auspicabile a tal proposito individuare un set di primer riconosciuto e condiviso a livello nazionale ed internazionale. Quest'ultima accortezza permetterebbe di costituire un SSR database condivisibile tra diverse unità di ricerca.

Ad oggi i problemi della caratterizzazione genetica mediante l'impiego di microsatelliti sono legati a due problematiche:

- pochi sono gli autori che pubblicano il profilo allelico per ogni cultivar analizzata e questo comporta l'impossibilità da parte dei ricercatori di confrontare i dati;
- quando i profili allelici vengono pubblicati non sempre risulta semplice il confronto dei dati in quanto manca una standardizzazione nella lettura delle dimensioni degli alleli (tab. 1).

L'utilizzo di soli loci dinucleotidici potrebbe essere integrato con quelli trinucleotidici. Questi ultimi, anche se meno informativi in quanto meno polimorfici, consentirebbero di avere dati più certi (grazie alla maggiore facilità di interpretazione) e maggiormente sovrapponibili ai dati prodotti in altri laboratori.

Recentemente è stato avviato un progetto dedicato allo studio delle risorse genetiche di varie specie appartenenti alla famiglia delle Fagaceae (Sederoff *et al.* 2008), tra le quali *C. mollissima* è considerata una specie modello. Una componente importante di questo progetto è incentrata sul sequenziamento del trascrittoma di *C. mollissima* e *C. dentata* (Carlson *et al.* 2007; 2008), rendendo disponibili numerose sequenze ESTs (*Expressed Sequence Tags*) che permetteranno di identificare ulteriori SSRs, SNPs e approfondire le conoscenze sulla genomica del genere *Castanea*. A tale proposito è stato creato un database [*Fagaceae Database Genomic* (FGD): http://www.fagaceae.org] (Ficklin *et al.*, 2007), dove saranno al più presto reperibili queste informazioni ed altre relative alla mappatura genetica e fisica del castagno e sull'analisi comparativa delle sequenze ottenute nell'ambito della famiglia delle *Fagaceae*.

Riassunto

La presenza del genere *Castanea* in Europa viene segnalata già in età terziaria; il genere si diffuse sulle terre emerse grazie alla sua capacità di adattamento ed all'azione antropica che ne favorì la diffusione. La coltura del castagno è infatti una pratica assai remota, da cui si originarono un gran numero di forme spesso difficili a caratterizzarsi scientificamente. Allo scopo di identificare e caratterizzare le varietà coltivate appartenenti alla specie *C. sativa* sono stati utilizzati nel corso della storia due principali metodi:

quello morfologico e quello molecolare. Obiettivo di questo lavoro è quello di ordinare cronologicamente i principali sistemi di caratterizzazione, allo scopo di dare al lettore una visione completa ed esaustiva dello stato dell'arte.

Parole chiave: castagno, schede castanografiche, caratterizzazione morfologica, marcatori molecolari, SSR.

Bibliografia

ABDELHAMID S., KÜPFER P., CONEDERA M., 2004. I*dentification of chestnut (C. sativa Mill.) cultivars using RAPD and AFLP markers in Switzerland*. Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture 36(6): 349-354.

AKKAK A., MARINONI D., BOTTA R., EDWARDS K., BOUNOUS G., 2002. *Isolation and characterisation of microsatellite sequence in* Castanea sativa *Mill*. VI Giornate Scientifiche SOI Spoleto 23-25 Aprile: 13-14.

AMSLER M., 1900. *Flore interglaciaire de Piànico, Compte Rendu des travaux de la Societé Helvétique de Sciencies Naturelles réunie à Thusis*. pp. 44-46.

ANTOGNOZZI E., 1986. *Osservazioni sulle cultivar di castagno da frutto in Umbria*. Giornate di studio sul castagno. Caprarola (VT): 37.

BACK E. J., HADONOU M., JAMES C. J., BLAKESLEY D., RUSSEL K., 2003. *Isolation and characterisation of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa *Mill.)* Molecular Ecology Notes 3: 239-241.

BAGLIONI A., 1907. *Di alcune varietà di castagno* (Atti Acc. Georg.), Firenze.

BALDINI E., 1958. *Contributo allo studio delle cultivar di Castagno della provincia di Arezzo*. Pubblic. N. 5 "Centro di studio sul castagno". Supplemento a "La ricerca scientifica".

BALDINI E., MARANGONI B., 1993. *Coltivazioni Arboree*. Ed. Cooperativa Libraria Universitaria, pp. 278 e sgg. Bologna.

BALDINI E., SCARAMUZZI F., 1952. S*ul valore dei dati biometrici nella descrizione e classificazione delle razze di olivo in coltura*. Estratto dagli Annali della Sperimentazione Agraria (nuova serie), pp. 1-40.

BASSANI F., 1886 *Su alcuni pesci del di deposito quaternario di Piànico in Lombardia*. Atti Società Italiana Scienze Naturali 26: 344-351.

BELL C.J., ECKER J.R., 1994. *Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of* Arabidopsis. Genomics, 19: 137-144.

BELLINI E., GIORDANI E., GIANNELLI G., PICARDI E., 2007. *Le Specie Legnose da Frutto. Liste dei caratteri descrittori.* ARSIA. Firenze: 417-437.

BIGNAMI C., MASTRANTONIO A., 1986. *Popolazioni di castagno da frutto dei monti Cimini*. Giornate di studio sul castagno. Caprarola (Viterbo). P 19.

BOLVANSKY M., MENDEL L., 2001. *Revised descriptor list for the evaluation of genetic resources of European Chestnut (*Castanea sativa *Mill.).* Forest Snow and Landscape Research. 76(3): 439-444.

BOTTA R., MARINONI D., BECCARO G., AKKAK A., BOUNOUS G., 2001. *Development of a DNA typing technique for the genetic certification of chestnut cultivars*. For. Snow Landsc. Res. 76, 3: 425-428.

BOUNOUS G., 2002. *Inventory of Chestnut Research, Germplasm and References*. Rome, Italy: FAO. Corporate Document Repository. Regional Office for Europe Interregional Cooperative Research Network on Nuts.

BOUNOUS G., 2005. *Sulle orme del castagno (*Castanea *spp.)* p. 74.

BREISCH H., 1995. *Châtaigne et Marrons*. Centre tecnique interprofessionnel des fruits et legume. Pp 64-65.

BREVIGLIERI N., 1955. *Indagini ed osservazioni sulle migliori varietà italiane di castagno.* Castanea sativa *Mill*. Suppl. "La ricerca scientifica" Anno 25. Centro Studi Castagno. Pubb. 2

BUCK E.J., HADONOU M., JAMES C.J., BLAKESLEY D., RUSSELL K., 2003. *Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa *Mill.)* Molecular Ecology Notes 3: 239-241

CANTINI C., AUTINI A., RIZZELLO R., NITTI D., 2009. *Caratterizzazione molecolare e recupero del germoplasma castanicolo delle colline Metallifere*. Atti del 5° Convegno Nazionale Castagno 13-16 Ottobre. Cuneo: 54-55.

CARLSON J., BARAKAT A., DILORETO D.S., SMITH C., 2008. T*he chestnut transcriptome*. Plant & Animal Genomes XVI Conference, January 12-16, San Diego, CA. 25.

CARLSON J., POWELL W., TOMKINS J., FICKLIN S., SMITH C., 2007. *GS20 454 sequencing of the chestnut transcriptome: results of a pilot study*. Plant & Animal Genomes XV Conference, January 13-17, San Diego, CA. W127.

CHAKRABORTY R, KIMMEL M, STIVERS DN, DAVISON LJ, DEKA R, 1997. *Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci.* Proc. Nat. Acad. Sci., 94: 1041-1046.

CIFERRI R., 1942. *Recenti progressi degli studi botanico – agrari sull'olivo*. Conv. di studi olivicoli. Accademia dei Georgofili.

COMELLI G.B., 1905. *Del castagneto nei nostri monti e della sua temuta scomparsa.* Memoria letta alla Società Agraria della Provincia di Bologna nell'adunanza del 18 giugno 1905.

CONEDERA M., KREBS P., TINNER W., PRADELLA M.,. TORRIANI D., 2004. *The cultivation of* Castanea sativa *(Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale.* Veget Hist. Archaeobot. 13: 161-179.

DIETRICH W., KATZ H., LINCOLN S.E., SHIN H.S., FRIEDMAN J., DRACOPOLI N.C., LANDER E.S. 1992. *A genetic map of mouse suitable for typing intraspecific crosses*. Genet., 131: 423-447.

ELORRIETA, J., 1949. *El castaño en España. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias.* Min. Agric. Dir. General de Montes, Caza y Pesca Fluvial. Madrid, Ed. Ares. 303 pp.

EMILIANI G., GIANNINI R., MALTONI A., MARIOTTI B., PAFFETTI D., TANI A., 2005. *Applicazione di dati molecolari, di parametri architetturali e di caratteri morfologici fogliari nella discriminazione di cultivar di* Castanea sativa *Mill*. Atti IV Conv. Naz. Castagno 2005. Montella (AV) 20-22 ottobre: 167-170.

FABBRI A., PONCHIA G., SCAREL A., 1985. O*sservazioni pomologiche su alcune cultivar di castagno delle Valli del Natisone.* L'informatore Agrario. Verona.

FENAROLI L., 1945. *Trattati di Agricoltura Vol.1 Il Castagno*. Roma.

FICKLIN S., SMITH C., SISCO P., WHEELER N., CARLSON J., SEDEROFF R., TOMKINS J. 2007. Fagaceae *genomic database (FGD): an integrated web-based resource for tree genomics.* Plant & Animal Genomes XV Conference, January 13-17, San Diego, CA. 848.

FINESCHI S., MALVOLTI M.E., MORGANTE M., VENDRAMIN G.G., 1994. *Allozyme variation within and among cultivated varieties of sweet chestnut (*Castanea sativa*)*. Canadian J. Forest Research 24(6): 1160-1165.

FINESCHI S., TAURCHINI D., VILLANI F., VENDRAMIN G.G., 2000. *Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in* Castanea sativa *Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries.* Molecular Ecol. 9: 1495-1503.

FISCHER In: A. Baltzer, 1893 *Glazialgeologisches von der Südseite der Alpen (1. Piànico-Sèllere)*. Mitteilungen der Naturforschenden Gesellschaft in Bern, Bern

GALDERISI U., CIPOLLARO M., BERNARDO G. DI, MASI L. DE, GALANO G., CASCINO A., 1998. *Molecular typing of italian sweet chestnut cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis*. J. Hort. Sci. Biotech. 73(2):259-263.

GOBBIN G., HOHL L., CONZA L., JERMINI M., GESSLER C., CONDERA M., 2007. *Microsatellite-based characterization of the Castanea sativa cultivar heritage of southern Switerland*. Genome 50: 1089-1103.

GOULÃO L., VALDIVIESSO T., SANTANA C., OLIVEIRA C.M. 2001. *Comparison between phenetic characterisation using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa *Mill.)*. Genetic Resources and Crop Evolution 48: 329-338.

KOTOBUKI K., 1996. *Evaluation of characteristics of chestnut genetic resources*. In: Cultivation end Evaluation of Fruit Tree PGR, Ref. Nà 9. Jap. Int. Cooperation Agency. 91-101.

LAVIALLE G.B., 1911. *Essai de la classification du genere* Castanea. Ed. Arn. Pomp.

MARINONI D., AKKAK A., BOUNOUS G., EDWARDS K.J., BOTTA R., 2003. *Development and characterization of microsatellite markers in* Castanea sativa *(Mill.).* Mol. Breeding 11: 127-136.

MARTIN M.A., ALVAREZ J.B., MATTIONI C., CHERUBINI M., VILLANI F., MARTIN L.M., 2009 *Identification and characterisation of traditional chestnut varieties of southern Spain using morphological and simple sequence repeat (SSRs) markers*. Annals of Applied Biology 154: 389-398.

MENEGHETTI S., BARCACCIA G., PONCHIA G., LUCCHIN M., 2001. *Caratterizzazione molecolare di popolazioni di castagno dell'Italia nord-orientale*. Atti del Convegno Nazionale Castagno 2001. Marradi (Firenze) 25-27 ottobre:109-114

MICHELI P.A., 1723. *Rariorum plantarum*. Musei Micheliani, presso la Biblioteca botanica dell'Università di Firenze.

MORGANTE M., OLIVIERI A.M., 1993. *PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics*. The Plant Journal, 3: 175-182.

MUJIĆ I., ALIBABIĆ V., ŽIVKOVIĆ J., JAHIĆ S., JOKIĆ S., PRGOMET Ž., TUZLAK Z., 2010. *Morphological charateristics of chestnut Castanea sativa from the area of una-sana canton.*

PARADISI G., FATTORINI M., AUTINO A., CRESTI M., TURCHI R., 2005. L*'analisi del DNA come strumento per la salvaguardia e la valorizzazione del patrimonio castanicolo dell'Amiata*.

PASSERINI C., 1908. *Sulle varietà del castagno*. Atti Accademia dei Georgofili, Firenze

PEREIRA-LORENZO S., 1996. *Variability and Grouping of Northwestern Spanish Chestnut Cultivars. I. Morphological Traits*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 121(2): 183-189.

PEREIRA-LORENZO S., RIOS D., GONZÁLES-PÉREZ J., CUBAS F., PERDOMO A., CARDILLA C., RAMOS-CABRER A.M., 2001. *Chestnut cultivars on the Canary Islands*. Forest Snow and Landscape Research. 76(3): 445-450.

PEREIRA M.J.P., CASTRO L.F.T., TORRES-PEREIRA J.M.G., LORENZO S.P., 1999. *Isozyme polymorphisms in portuguese chestnut cultivars*. Acta Horticulturae 494:283-286.

PEREIRA-LORENZO S., DÍAZ-HERNÁNDEZ M.B., RAMOS-CABRER A.M., 2006. *Use of highly discriminating morphological characters and isozymes in the study of Spanish chestnut cultivars*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 131(6): 770-779.

PEREIRA-LORENZO S., LOURENÇO COSTA M.R., RAMOS-CABRER M.A., MARQUES RIBEIRO A.C., SERRA DA SILVA F.M., MANZANO G., BARRENECHE T., 2010. *Variation in grafted European chestnut and hybrids by microsatellites reveals two main origins in the Iberian Peninsula*. Tree Genetics & Genomes 6: 701-715.

PEREIRA-LORENZO S., RAMOS-CABRER, A.M., DÍAZ-HERNANDEZ, M.B., CIORDIA-ARA, M., 2005. *Caracterıstícas morfológicas e isoenzimaticas de los cultivares de castaño (*Castanea sativa *Mill.) de Asturias.* Monografías INIA 16, Serie Agrícola. 541.

PICCIOLI L., 1902. *Monografia del castagno. Suoi caratteri varietà, coltivazione, prodotti e nemici*. Tip. Landi Firenze: 25-28.

PLINIO C., 79 a.C. *Historiae Mundi* Vol. II libro XV.

PONCHIA G., FABBRI A., BRUGNA F., 1985. *Osservazioni pomologiche su alcune cultivar di castagno della provincia di Trento*. L'informatore Agrario. Verona.

PONCHIA G., AGUANNO M., MENEGHETTI S., 2001a. *Osservazioni morfologiche, carpometriche e molecolari su alcune piante di castagno del Feltrino*. Atti del Convegno Nazionale Castagno 2001. Marradi (Firenze) 25-27 ottobre:103-108.

PONCHIA G., CELEGATO P., OSSARI E., PASQUALIN A., 2001b. *Prime osservazioni sulle caratteristiche morfologiche e carpo metriche di piante di castagno dei Colli Euganei*. Atti Convegno Nazionale Castagno 2001, Marradi (FI): 137-142.

PRADISI G., FATTORINI M., AUTINO A., CRESTI M., TURCHI R., 2005. *L'analisi del DNA come strumento per la salvaguardia e la valorizzazione del patrimonio castanicolo dell'Amiata.* ARSIA Toscana.

QUEIJERO J.M., BLANCO D., DE LA MONTAÑA J., MÍGUEZ M., 2005. I*dentification and Morphological Description of Chestnut Cultivars of the Region of Verín - Monterrei* (Ourense, Spain).

RAMOS-CABRER A.M., PEREIRA-LORENZO S. 2005. G*enetic relationship between* Castanea sativa *Mill. trees from northwestern to south Spain based on morphological traits and isoenzymes*. Gen. Res. Crop Evol. 52(7): 879-890.

RICCI., BOVOLO., 1925. *I castagneti nel circondario di Mondovì*.

ROSELLI G.C., SCARAMUZZI F., 1974. *Definizione dei termini di cultivar e clone*. Accademia Nazionale di Agricoltura. Estratto dagli annali - 167° anno - serie IV fascicolo N. 2 - Bologna

SANSAVINI S., PANCALDI M., 1994. *Ruolo delle biotecnologie molecolari nell'identificazione, moltiplicazione e diffusione di materiale di propagazione in frutticoltura*. In Atti del simposio su: Tecnologie avanzate per l'identificazione varietale e il controllo genetico sanitario nel vivaismo frutticolo, 6, (S.Sansavini e M.Pancaldi, eds): 9-30.

SCARASCIA MUGNOZZA G.T., 1988. *Miglioramento genetico vegetale*. Ed. Patron. 540 e sgg. Bologna.

SEABRA R., COTRIM H., RIBEIRO G., PAIS M.S., 1996. *First approach for the molecular characterization of* Castanea sativa *Mill*. by RAPDs. Silva-Lusitana 4(2):251-253.

SEABRA R.C., 2000. *Molecular characterization of the genus* Castanea. Silva Lusitana 8(2): 149-164.

SEDEROFF R., NIELSON D., SMITH C., TOMKINS J., ATKINS M., BLACKMON B., STATON M., FICK-LIN S., HEBARD F., SISCO P., CARLSON J., DILORETO S., BARAKAT A., POWELL W., BAIER K., ANAGNOSTAKIS S., KUBISIAK T., WHEELER N., 2008. *Genomic tool development for the* Fagaceae. Plant & Animal Genomes XVI Conf., January 12-16, San Diego, CA. 494.

SOLAR A., 2005. *Phenotypic diversity of European Chestnut (*Castanea sativa *Mill.) in Slovenia - opportunity for genetic improvement*. Gen. Res. Crop Evol. 52: 381-394.

SOLAR A., PODJAVORŠEK A., OSTERC G., ŠTAMPAR F., 2001. *Evaluation and comparison of domestic chestnut (*Castanea sativa *Mill.) populations in Slovenia*. Forest Snow and Landscape Research 76(3): 455-459.

SOLAR A., PODJAVORŠEK A., ŠTAMPAR F., 2005. *Phenotypic and genotypic diversity of European chestnut (*Castanea sativa *Mill.) in Slovenia - opportunity for genetic improvement*. Gen. Res. Crop Evol. 52: 381-394.

SORDELLI F., 1896. *Flora Fossilis Insubrica. Studi sulla vegetazione di Lombardia durante i tempi geologici*, Cogliati, Milano (1896) p. 289.

TARGIONI TOZZETTI O., 1813. *Istituzioni Botaniche*. TOMO III. Firenze presso Guglielmo Piatti.

TAUTZ D., 1988. *Hypervariability of simple sequence repeats as a general source for polymorphic DNA markers*. Nucleic Acids Research, 17: 6463-6471.

TREHANE P., BRICKELL C.D., BAUM B.R., HETTERSCHEID W. L. A., LESLIE A. C., MC NEILL, SPONGBERG S. A., VRUGTMAN F., 1995. *International Code of Nomenclature for Cultiveted Plants*. Qarterjack Publishing. Wimborne, UK.

UPOV, 1991. I*nternational Convention for the Protection of New Varieties of Plants*

VALDIVIESSO T., 2000. *Characterization of cultivars of* Castanea sativa *Mill*. Silva Lusitana 8(2): 195-213.

VIGIANI D., 1900. *Il Castagno da frutto nel Casentino*. Agricoltura Italiana. Fasc. 432: 279-291.

VIGIANI D., 1908. *Il castagno*. Tip. Lit. C. Cassone. Casale.

VIGIANI D., 1943. *La Coltivazione del Castagno*. Cap. IV: 26-35. Società Anonima Editrice Dante Alighieri. Genova – Roma – Napoli - Città di Castello.

VILLANI F., PIGLIUCCI M., BENEDETTELLI S., CHERUBINI M., 1991. G*enetic differentiation among Turkish chestnut (*Castanea sativa *Mill.) populations*. Heredity 66: 131-136.

VILLANI F., PIGLIUCCI M., CHERUBINI M., 1994. *Evolution of* Castanea sativa *Mill. in Turkey and Europe*. Genetical Research 63(2):109-116.

WANG Z., WEBER J.L., ZHONG G., TANKSLEY S.D., 1994. *Survey of plant short tandem DNA repeats*. Thoer. Appl. Gen. 83:1-6.

WELSH J., MCLELLAND M., 1990. *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary Primers*. Nucleic Acid Research 18: 7213-7218.

WILLIAMS J.C.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J.,RAFALSKY J.A., TINGEY S.V., 1990. D*NA polymorphism amplified by arbitrary Primers are useful as genetic markers*. Nucleic Acid Research 18:6531-6535.

YOUSSEF J., STRAZZOLINI E., TOFFOLUTTI B., PIAZZA L., 2000. *Pomologia Friulana*: 211-212

ZABEAU M., VOS P., 1992. *Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting*. European Patent Office Publication 0 534 858 A1. Bullettin 93/13: 1-43.

ZIETKIEWICZ E., RAFALSKI A., LABAUDA D., 1994. *Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification*. Genomics 20:176-183.