

S. FINESCHI (*), M.E. MALVOLI (*)

POLIMORFISMO ISOENZIMATICO IN CASTAGNO:
ANALISI GENETICA, SISTEMATICA DELLE VARIETÀ,
DIFFERENZIAZIONE CLONALE

Riassunto — Viene discussa l'importanza della analisi genetica quale mezzo per interpretare i fenotipi enzimatici e vengono esposte alcune tra le problematiche più interessanti legate alla analisi elettroforetica. Il problema della differenziazione delle varietà e il loro difficile inquadramento sistematico è stato affrontato sulla base dei dati ottenuti su materiale raccolto in Irpinia.

Infine vengono commentati i risultati di un'indagine condotta in un arboreto clonale che dimostrano la validità di questo metodo sperimentale per la classificazione.

Abstract — *Enzyme polymorphism in sweet chestnut (Castanea sativa Mill.): genetic analysis, systematics of cultivated varieties, clonal differentiation.* The significance of genetic analysis as a method to understand enzyme phenotypes was discussed. Authors report on some problems connected to the electrophoresis.

The question of clone-cultivar differentiation was discussed on the basis of results obtained on five varieties from Irpinia (Southern Italy) and a clonal orchard.

Key words: *Castanea sativa*, isozymes, genetic analysis, clone cultivar identification

INTRODUZIONE

Lo studio della struttura genetica di popolazioni si basa sulla stima della variabilità dei caratteri osservati. Il metodo che valuta e quantifica il polimorfismo enzimatico è attualmente uno dei più usati per le popolazioni forestali.

L'esame fenotipico dei profili elettroforetici fornisce indicazioni sulla variabilità degli individui esaminati, l'analisi genetica permette di dare una interpretazione genetica dei profili, trasformando i

(*) CNR - Istituto per l'Agroselvicultura - viale G. Marconi 2, 05010 Porano (TR).

fenotipi enzimatici in genotipi e i marcatori biochimici in marcatori genetici.

L'analisi del polimorfismo isoenzimatico nella ricerca forestale consente di affrontare studi sulla struttura genetica e quindi di valutare la variabilità genetica tra ed entro le popolazioni fornendo informazioni sulla strategia adattativa e la storia evolutiva della specie considerata. Inoltre possono essere condotti studi sui fenomeni di adattamento a particolari ambienti e le conseguenti variazioni climatiche; studi sulla selezione che si verifica contro alcuni alleli e/o genotipi in popolazioni soggette a immissioni di inquinanti; studi di chemiotassonomia; studi di identificazione clonale; studi sulla biologia riproduttiva e sui meccanismi di incrocio di questi organismi vegetali caratterizzati da cicli vitali lunghi e da impollinazione incrociata (FINESCHI, 1984a, 1984b).

Nel corso del nostro lavoro svolto su castagno (*Castanea sativa* Mill.) abbiamo affrontato alcuni settori di ricerca. Oltre alla analisi genetica, indispensabile per la identificazione di marcatori genetici, abbiamo considerato l'interessante aspetto della differenziazione delle varietà e della distribuzione dei genotipi entro le stesse. L'esistenza di numerose varietà coltivate di castagno da frutto, nonché il disordine tassonomico delle medesime, ha offerto lo spunto per uno studio sistematico su alcune varietà diffuse in aree geografiche diverse del territorio italiano. Infine, lo studio di riconoscimento e di differenziazione clonali è stato applicato a una piantagione clonale di castagno.

I risultati sperimentali che intendiamo mostrare riguardano appunto queste tematiche di ricerca.

ANALISI GENETICA

L'analisi genetica richiede generalmente l'analisi di progenie ottenuta da incroci controllati per comprendere il modo con cui i caratteri genetici vengono trasmessi alla progenie. L'ottenimento di materiale da incroci controllati per gli alberi forestali è ostacolato da alcuni fattori come la tardiva maturità riproduttiva, la non costante intensità di fioritura, alcuni fenomeni di incompatibilità non ancora del tutto chiari.

Per il castagno tutti questi problemi devono essere affrontati e quindi l'identificazione di loci genici richiede una procedura alquanto laboriosa.

Per questo motivo i primi studi basati sulla variabilità enzimatica in castagno sono stati svolti a livello fenotipico (SAWANO *et al.* 1984; FINESCHI, 1986, 1988). Successivamente è stata effettuata l'analisi genetica seguendo due metodi alternativi tra loro che si sono rivelati ugualmente validi: il classico metodo di analisi mendeliana e il metodo basato sulla analisi di F_1 ottenuta per libera impollinazione da piante madri note.

Nel caso degli isoenzimi l'analisi genetica si rende indispensabile in casi particolari in cui la semplice interpretazione del fenotipo enzimatico potrebbe portare a una errata identificazione del genotipo (HATTEMER, 1990). Questi casi si riferiscono:

- alla presenza di bande multiple messe in evidenza dall'analisi di enzimi monomeri su materiale aploide di individui omozigoti (BERGMANN, com. pers.);
- alla sovrapposizione di zone elettroforetiche in sistemi enzimatici monomeri, dove l'assenza di bande ibride rende più difficile l'interpretazione (RAJORA, 1986, MALVOLTI com. pers.);
- alle interazioni intergeniche che portano alla formazione di bande eterodimere (GIANNINI *et al.*, 1989; MULLER-STARCK, com. pers.);
- alla presenza di alleli recessivi detti «alleli nulli» la cui attività non è manifesta. Infatti da un esame esclusivamente fenotipico un individuo eterozigote per un allele risulta omozigote per l'allele dominante in base al principio della codominanza (FINESCHI e MALVOLTI, 1988; MALVOLTI *et al.*, 1990).

Questi aspetti sono stati esaminati e approfonditi in via teorica e sperimentale da HATTEMER (1990), GILLET e HATTEMER (1989), e FINESCHI *et al.* (1990a).

Oltre al classico metodo di analisi mendeliana (analisi genitori-figli con progenie di origine nota) è stata eseguita anche una prova su progenie ottenuta per libera impollinazione da piante madri note. Questo metodo, per quanto possa apparire meno preciso del precedente, offre due vantaggi da non sottovalutare. In primo luogo, è molto più semplice da realizzare, soprattutto per quelle specie per cui l'esecuzione di incroci controllati presenta notevoli difficoltà (questo è in genere il caso delle piante arboree), inoltre consente la raccolta e l'analisi di un maggior numero di individui F_1 .

I risultati ottenuti con i due metodi hanno fornito le stesse informazioni sulla segregazione mendeliana dei caratteri, dimostrando così che quello più semplice (progenie da libera impollinazione) rappresenta una valida alternativa al metodo classico, ove questo riesca particolarmente difficoltoso.

La disponibilità di marcatori genetici non è facilmente reperibile in letteratura per le latifoglie arboree. Al contrario, lo studio sul controllo genetico di sistemi enzimatici nelle conifere può prescindere dall'esame di progenie controllata perché grazie alla analisi dell'endosperma primario (aploide), il genotipo materno viene automaticamente identificato nella progenie da libera impollinazione. Questo metodo di indagine semplifica molto la analisi genetica ma, come si è detto, è applicabile solo alle conifere.

Il metodo semplificato si basa su due condizioni necessarie per dimostrare un modo di ereditarietà di tipo *codominante*. La prima condizione che deve essere soddisfatta è che la progenie di pianta madre *omozigote* (A_iA_i) presenti sempre l'unico allele materno. In base alla seconda condizione, in progenie di pianta madre *eterozigote* A_iA_j ognuno dei due tipi ha la stessa possibilità di essere «usato» nella fecondazione. Questo significa che nella progenie entrambi gli alleli materni devono essere associati a quelli paterni in uguali proporzioni. Ne deriva che le frequenze genotipiche della progenie eterozigote e quelle dei due tipi omozigoti sommate tra loro saranno uguali:

$$F_1 (A_iA_j) = F_1 (A_iA_i + A_jA_j) = 0.5$$

(Per i risultati ottenuti e per ulteriori informazioni sul metodo applicato si rimanda a: FINESCHI e MALVOLTI 1988; GILLET e HATTEMER 1989; VILLANI *et al.* 1987; MALVOLTI e FINESCHI 1987; FINESCHI *et al.*, 1990a, 1990b).

STUDIO SISTEMATICO DELLE VARIETÀ

Poiché il castagno è una specie da lungo tempo soggetta a coltivazione da parte dell'uomo è particolarmente importante lo studio delle modificazioni della struttura genetica apportate attraverso la propagazione agamica per l'impianto di castagneti da frutto.

La presenza di numerose varietà di castagno da frutto e il problema della loro classificazione ha interessato e continua a interessare selvicoltori e frutticoltori. Molti studi sono stati affrontati a tale riguardo con scopi sistematici basati principalmente sulla analisi biometrica di caratteri morfologici.

Un aspetto particolarmente problematico è dovuto alla presenza, in varie regioni italiane, di varietà di ignota origine a cui viene attribuita una denominazione locale, spesso legata all'area di colti-

vazione. Non è da escludere che la stessa varietà, coltivata in regioni diverse, venga conosciuta con nomi diversi.

Abbiamo affrontato questo problema campionando piante isolate di marroni scelte a caso in aree limitrofe alla nostra sede.

Inoltre è stata scelta una area limitata di un castagneto da frutto situato nel Comune di Montecchio (località Melezzole, prov. TR) dove sono state campionate tutte le piante presenti (circa un centinaio).

Il primo dato interessante scaturito dalla analisi di questa porzione di castagneto è stata la assoluta identità nei fenotipi enzimatici di tutti gli individui, identità relativa a 8 sistemi esaminati (LAP, GOT, ŠKDH, IDH, 6-PGDH, MDH, GDH e G-6-PDH).

Questo risultato pone la inquietante domanda se si debbano considerare i castagneti da frutto (costituiti da un'unica varietà) come arboreti *monoclonali*, dove quindi ogni individuo sia identico a tutti gli altri, così come ramet di uno stesso ortet (FINESCHI 1988). Se questa situazione si verifica regolarmente nei castagneti da frutto, ci troviamo di fronte a un grosso errore commesso dalla selvicoltura: avere sacrificato la variabilità genetica per scopi produttivi. Appare evidente che uniformare geneticamente gli individui di un popolamento significa esporli a tutti i rischi e svantaggi biologici della monocoltura o della coltura monoclonale.

Ulteriori indagini che abbiamo condotto sostengono la nostra ipotesi.

Una prima indagine riguarda piante di «marrone» più o meno isolate che abbiamo campionato nei dintorni di Porano e analizzato per diversi sistemi enzimatici. È apparso presto evidente quello che già era stato osservato nel castagneto di Melezzole, cioè l'identità dei fenotipi enzimatici.

È importante sottolineare il fatto che fenotipi osservati per questi marroni sono uguali a quelli delle piante di Melezzole, difatti in base alle testimonianze ottenute sul luogo della raccolta, anch'essi sono riconducibili alla varietà «marrone fiorentino».

In seguito a queste osservazioni sono stati analizzati altri «marroni» raccolti a Vallombrosa, che hanno confermato ancora una volta questa uniformità.

I dati così ottenuti, verificati dalla analisi genetica, hanno consentito di definire il «genotipo multilocus» (per 10 loci genici) dei marroni da noi analizzati, che è, come si è detto, un genotipo identico per tutti (Tab. 1)

Occorre precisare che si intendono i termini «uniformità» e «iden-

TAB. 1 - *Genotipo multilocus del marrone fiorentino (10 loci).*

PGI-B	AP-A	AP-B	AP-C	EST-A	EST-C	IDH-A	ADH-A	PER-A	DIA-A
B ₂ B ₃	A ₃ A ₃	B ₂ B ₂	C ₁ C ₁	A ₁ A ₁	C ₁ C ₁	A ₂ A ₂	A ₁ A ₂	A ₁ A ₂	A ₃ A ₃

tità» riferiti ai loci genici da noi analizzati e che quindi queste osservazioni costituiscono un *indizio* (la cui validità può essere statisticamente valutata) e non una prova della suddetta identità, non essendo possibile analizzare tutti i loci genici degli individui.

Per esaminare più a fondo questo problema abbiamo eseguito un altro campionamento in alcuni castagneti dell'Irpinia.

In questa zona non viene utilizzata la denominazione di «marrone» ma solamente quella di «castagna».

Il campionamento in Irpinia ha riguardato 18 zone situate in 11 comuni diversi della provincia di Avellino; per ogni zona sono stati raccolti circa 20 campioni da individui innestati con 5 varietà locali che assumevano denominazioni diverse: «Nere», «Santimango», «Verdole di Serino», «Forino» e «Montella» (FINESCHI *et al.* 1989).

I campioni classificati come appartenenti alle var. «castagna di Montella» e «castagna di Forino» presentano lo stesso genotipo multilocus. Questi risultati inducono a pensare una volta di più che la pratica dell'innesto ha portato a una drastica riduzione della variabilità genetica. A nostro avviso, la maggiore sensibilità al cancro corticale dei castagneti da frutto rispetto al ceduo (genotipi selvatici che presentano maggiore variabilità genetica), potrebbe essere spiegata anche con questa uniformità (FINESCHI 1988).

Molto omogenea appare anche la raccolta di campioni denominati «Verdole di Serino», mentre una maggiore variabilità è presente nelle castagne «Nere» e in quelle «Santimango».

Ovviamente anche se questi dati sono assolutamente preliminari data l'esiguità del campionamento, costituiscono comunque una prima analisi che si è rivelata particolarmente significativa, anche in base a quanto osservato per il «marrone fiorentino».

L'analisi elettroforetica si pone quindi come valido complemento alla analisi morfologica e anatomica classica. L'individuazione del genotipo e il paragone che si può fare a questo livello tra individui della stessa varietà e tra varietà diverse, offre possibilità maggiori per la tassonomia e la sistematica.

RICONOSCIMENTO E DIFFERENZIAZIONE CLONALE

Spesso il riconoscimento di cloni sostituisce un problema perché i metodi normalmente utilizzati possono non offrire una risposta valida. Ciò è tanto più importante per specie di ampio interesse commerciale.

Vengono qui discussi i risultati di un'indagine condotta su un arboreto clonale di castagno situato in Germania (Stato della Bassa Sassonia).

Questo arboreto era costituito inizialmente da 523 individui ottenuti innestando i portinnesti con marze provenienti da 20 piante (circa 26 individui per clone). L'arboreto attualmente non è molto curato, per cui anche la sola fase di orientamento risulta difficoltosa, essendo venute a mancare molte piante ed essendo la mappa non aggiornata. Per questo motivo si è proceduto a una raccolta sistematica di gemme da tutte le piante vive, registrando quelle non più presenti o morte in piedi.

Dalle analisi delle 360 piante risulta la presenza di numerosi genotipi multilocus (10 loci genici), quindi un numero di cloni completamente diverso dai 20 previsti.

Questo fatto si può spiegare con il fenomeno della affrancatura dell'innesto, verificato peraltro dalla raccolta e analisi di gemme prelevate da rami diversi su quelle piante che derivano da polloni differenti di una ceppaia; evidentemente solo uno o solo alcuni dei polloni hanno il genotipo innestato, gli altri quello selvatico. Si ha pertanto la *presenza di genotipi diversi su uno stesso individuo*.

È evidente che in questo caso la mappa della piantagione perde completamente il suo significato. La eventuale raccolta di materiale da una particolare pianta, scelta in base alla sua classificazione clonale, risulterebbe errata.

Questo non è comunque l'unico esempio di classificazione non valida. È opportuno considerare l'importanza di questo tipo di analisi e la sua applicazione nella pratica. Impostare una ricerca o prevedere la raccolta di materiale da propagazione basandosi solamente sullo schema di una simile piantagione, senza poter identificare il genotipo delle piante, potrebbe avere conseguenze indesiderate.

BIBLIOGRAFIA

- FINESCHI S. (1984 a) - Isoenzimi e loro significato nella ricerca forestale. I. Aspetti generali. *Inf. Bot. It.* **16**, 164-173.

- FINESCHI S. (1984 b) - Isoenzimi e loro significato nella ricerca forestale. II. Applicazioni in genetica forestale. *Inf. Bot. It.* **16**, 173-181.
- FINESCHI S. (1986) - Genetics of Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) I. *Electroforetic patterns of several enzyme systems*. *Proc. Iufro Joint Meeting on Biochemical Genetics and Legislation of Forest Reproductive Material*, Großhansdorf, June 25-28, 1985, 1-10.
- FINESCHI S. (1988) - Genetics of Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) II. *Uniformity of enzyme phenotypes in grafted tree orchards*. *Silvae Genetica* **37**, 82-83.
- FINESCHI S., MALVOLTI M.E. (1988) - Populationsgenetische Untersuchungen an Kastanie (*Castanea sativa* Mill.). *Ergebnisse einer Nachkommenschafts-Untersuchung*. In: *Ber. 5. Arbeitstagung Forum Genetik-Wald-Forstwirtschaft*, Innsbruck, Schriftenr. FBVA Nr. 28, 19-27, Wien 1988.
- FINESCHI S., GILLET E., MALVOLTI M.E. (1990 a) - Genetics of sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) III. *Genetic analysis of zymograms of single tree offspring from open pollination*. *Silvae Genetica*, in press.
- FINESCHI S., MALVOLTI M.E., GILLET E. (1990 b) - Segregation among fruits from single burrs of Chestnut (*Castanea sativa* Mill.). In: *Proc. Int. Workshop Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees*, H.H. Hattemer and S. Fineschi eds., SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 47-56.
- FINESCHI S., MALVOLTI M.E., PACIUCCI M. (1989) - Studio sistematico delle varietà di castagno (*Castanea sativa* Mill.) I: *Analisi di alcune varietà dell'Irpinia*. *Monti e Boschi*, **40**, 47-50.
- GIANNINI R., MOGANTE M., VENDRAMIN G.G. (1990) - A putative gene duplication in Norway spruce for 6PGD and its phylogenetic implications. In: *Proc. Int. Workshop Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees*, H.H. Hattemer and S. Fineschi eds., SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 21-27.
- GILLET E., HATTEMER H.H. (1989) — Genetic analysis of isozyme phenotypes using single tree offspring and estimation of paternal allele frequencies. *Heredity*, **63**, 135-141.
- HATTEMER H.H. (1990) - Genetic analysis and population genetics. In: *Proc. Int. Workshop Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees*, H.H. Hattemer and S. Fineschi eds., SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 3-20.
- MALVOLTI M.E., FINESCHI S. (1987) - Analysis of enzyme systems in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Genetica Agraria* **41**, 243-256.
- MALVOLTI M.E., TEISSIER DU CROS E., FINESCHI S. and PACIUCCI M. (1990) - Biochemical Markers in Eastern Cottonwood (*Populus deltoides* Bartz.). Enzymatic variation in a factorial mating design. In: *Proc. Int. Workshop Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees*, H.H. Hattemer and S. Fineschi eds., SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 29-38.
- RAJORA O.P. (1986) - Studies on genetics and relationships of *Populus deltoides* Marsh., *P. nigra* L. and *P. maximoviczii* Henry using isozymes, pollen competition and leaf morphology. Thesis University of Toronto.
- SAWANO M., ICHII T., NAKANISHI Y., KOTERA Z. (1984) - Studies on identification of chestnut species and varieties by isozyme analysis. *Sci. Rep. Fac. Agr. Kobe Univ.* **16**, 67-71.
- VILLANI F., MALVOLTI M.E., FINESCHI S., PACIUCCI M. (1987) - Allelism and linkage studies in Chestnut. Poster presentato al Convegno SIGA, Como 1987.

(ms. pres. il 21 settembre 1989; ult. bozze il 22 dicembre 1989)