

Progetto URBE: il castagno nella riserva di biosfera Alpi Ledrensi e Judicaria

Luisa Palmieri^{1*}, Diego Micheletti¹, Valentino Poletti¹, Massimiliano Luzzani², Urska Vrhovsek¹, Damiano Gianelle¹

¹Centro di Ricerca e Innovazione-Fondazione Edmund Mach, via E Mach 1, 38010 San Michele all'Adige

²Associazione Tutela Castagno Valle del Chiese

Introduzione

La Riserva di Biosfera Alpi Ledrensi e Judicaria è caratterizzata da un'elevata varietà di piante ed ecosistemi di interesse naturalistico. Le piante forestali presenti sia in ambienti naturali che antropizzati, forniscono una testimonianza dei cambiamenti avvenuti nel territorio e nelle attività delle popolazioni locali, e costituiscono un importante elemento del paesaggio, non solo per la diversità di boschi e la varietà di colori delle chiome, ma anche per il loro impiego in agricoltura come piante da frutto. In passato, alcune latifoglie nobili come il castagno sono state ampiamente utilizzate come fonte di reddito¹. Nel territorio italiano, in seguito all'abbandono di queste attività, i castagneti si sono progressivamente ridotti. Sia per il castagno che per altre specie la biodiversità forestale attuale può raccontare il territorio e il rapporto tra l'uomo e l'ambiente. Per valorizzare e conservare la biodiversità è importante considerare diversi aspetti, quali la diversità forestale, funzionale e genetica² delle specie forestali. In tal senso il progetto URBE impiegherà approcci innovativi basati sul telerilevamento iperspettrale³, l'impiego di sensori posizionati sui tronchi per monitorare la diversità funzionale della pianta, l'impiego di marcatori molecolari⁴⁻⁶ e metabolici⁷ per la caratterizzazione dei genotipi/ecotipi ed infine la micropropagazione in vitro per la conservazione del germoplasma.

Materiali e metodi

Materiale vegetale

Le foglie giovani di 9 individui provenienti da aree collocate all'interno della Riserva di Biosfera Alpi Ledrensi sono state raccolte utilizzando uno sventatoio, data l'altezza delle piante secolari campionate

* luisa.palmieri@fmach.it

(tab. 1). Per ogni pianta sono stati prelevati 3 differenti campioni per avere la replica biologica. I campioni sono stati immediatamente riposti in falcon di plastica dotate di tappo contrassegnate con la zona di provenienza ed il nome del campione. Le foglie sono state quindi poste in un liofilizzatore per una notte per poi essere conservate. Sono inoltre stati campionati dalle stesse piante germogli erbacei di 5-8 centimetri che sono stati avvolti in carta assorbente bagnata e riposti in falcon di plastica. I germogli sono stati conservati una notte a 4 °C.

Estrazione DNA

Il DNA è stato estratto da 50 mg di tessuto di ognuna delle 3 repliche utilizzando il Kit il DNeasy Plant Mini Kit[®] Qiagen. Il DNA estratto è stato quantificato mediante spettrofotometria con il NanoDrop[™]8000 (Thermo Fisher Scientific).

Genotipizzazione

Il DNA ottenuto dalle differenti accessioni è stato utilizzato per il lavoro di genotipizzazione delle accessioni analizzate mediante marcatori microsatelli-

Tab. 1 - Individui campionati e zone di provenienza.

ecotipo	zona di prelievo	Descrizione pianta
1	Merlino	Marrone pianta secolare
2	Merlino	Marrone pianta secolare
3	Merlino	Marrone pianta giovane
4	Merlino	Marrone pianta giovane
5	Lodrone Fratela	Marrone
6	Lodrone Ronchi	Marrone
7	Ricomassimo	castagno probabile varietà vecchia "Podet"
8	Ricomassimo	castagno probabile varietà vecchia "Podet"
9	Daone	castagna precoce probabile "castagna di San Michele"

te (SSR) su 16 loci⁸. Per la genotipizzazione sono stati utilizzati 30 ng di DNA per ciascun campione. I primer utilizzati per amplificare il DNA sono stati marcati con 4 differenti fluorocromi (HEX, TAMRA, 6-FAM, TxRd) ed utilizzati in multiplex seguendo i protocolli precedentemente pubblicati da Pererira-Lorenzo et al., 2017. L'analisi dei frammenti è stata fatta utilizzando un sequenziatore ABI3130® Applied Biosystems, e la determinazione delle taglie alleliche è avvenuta grazie all'impiego del GeneMapper® Software (Applied Biosystems).

Analisi statistica

I profili di amplificazioni ottenuti nella precedente analisi sono stati utilizzati per le successive analisi statistiche. A tal fine sono stati impiegati il software GenAlex⁹ per determinare il pattern allelico ed il livello di eterozigosi presenti nelle accessioni analizzate. Il software Structure¹⁰ è stato utilizzato per la determinazione della presenza di raggruppamento in cluster delle accessioni e quindi una possibile suddivisione in differenti popolazioni. Infine il software Colony¹¹ ha permesso di svolgere un'analisi preliminare di parentela tra gli individui analizzati.

Micropropagazione in vitro

Per la micropropagazione i germogli sono stati defogliati e tagliati in frammenti, aventi ciascuno una gemma. Gli espianti sono stati sterilizzati mediante una soluzione al 16% di ipoclorito di sodio per circa 20 minuti. Sono state successivamente lavati 3 volte in acqua demineralizzata sterile. Successivamente messi in due diversi terreni di coltura, privi di ormoni di crescita, (Schenk e Hildebrandt ed Murashige e Skoog modificato) in jar di vetro. Le jar sono state riposte in camera di crescita a 24-26 °C, fotoperiodo 16-8.

Risultati e discussione

Da tutti i campioni analizzati è stata ottenuta una quantità di DNA sufficiente e sufficientemente integra per svolgere la successiva analisi di genotipizzazione.

Genotipizzazione

Tutti e 16 i marcatori utilizzati per la genotipizzazione hanno dato i profili di amplificazione attesi su tutti i campioni analizzati mostrando un buon grado di polimorfismo tra gli ecotipi analizzati. Il numero di alleli individuati variava da 2 a 4 a seconda del marcatore considerato con una frequenza che poteva variare da 1,6 a 1,8 a seconda della popolazione considerata. Il valore di eterozigosi attesa (He) variava tra

0,3 e 0,4 e l'indice di Shannon (I), indice di biodiversità, tra 0,43 e 0,56 a seconda della popolazione analizzata. Sono stati individuati alleli privati negli individui campionati nella zona di Ricomassimo e Daone così come alleli comuni aventi una frequenza pari allo 0,9 in entrambe le popolazioni. (fig. 1).

Popolazioni presenti

In seguito all'analisi con il software Structure le popolazioni sono state suddivise in due cluster principali (K=2): il primo comprendente le varietà di castagne ed il secondo il gruppo dei 'Marroni' (fig. 2). L'analisi di parentela svolta con il software Colony, evidenzia che sia entro marroni che entro castagno tutti gli individui possono essere interpretati come fullsib, ovvero fratelli (tab. 2). Tale risultato va però interpretato con cautela, visto che nonostante le provenienze degli individui siano differenti, il numero estremamente ridotto dei campioni analizzati potrebbe portare ad una sovrastima del grado di parentela.

Micropropagazione

Nelle piante micropropagate in terreno solido dopo 15 giorni la gemma sull'espianto ha mostrato rigonfiamenti e successivamente la comparsa di foglioline (fig. 3). Una volta emesse le prime radici le

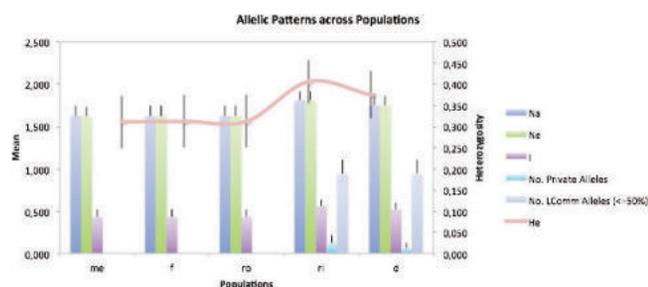


Fig. 1 - risultati analisi GenAlex: Na=numero di alleli; Ne=numero effettivo di alleli; I=indice di Shannon; No di Alleli Privati; No di alleli Comuni; He=eterozigosi attesa

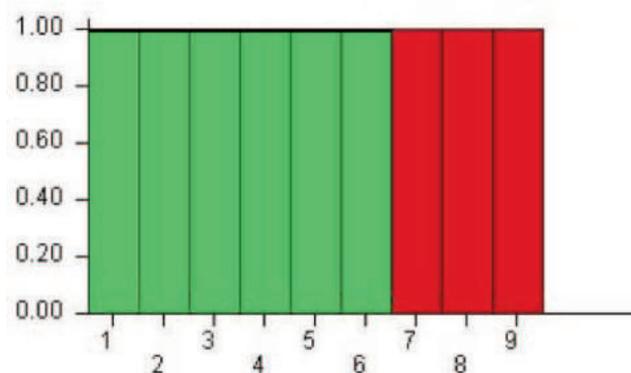


Fig. 2 - Risultati analisi Structure: K=2. In verde pop1 Marroni in rosso pop 2 castagno

Tab 2 - Analisi di parentela.

Full Sibship Index	Prob. _(Inc.)	Prob. _(Exc.)	Member					
			1	2	3	4	5	6
1	0.9955	0.9955	me1	me2	me3	me4	f	ro
2	0.9982	0.9982	ri1	ri2	d			

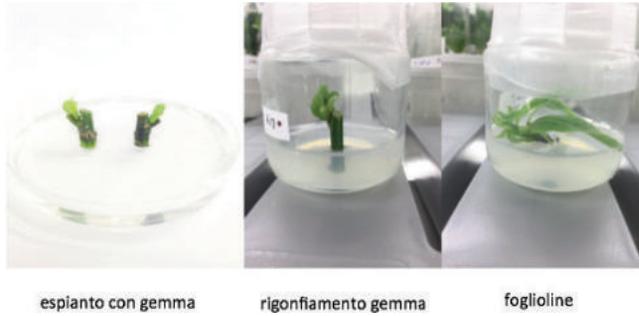


Fig. 3 - risultati preliminari micropropagazione

piante saranno trapiantate in terreni successivi fino all'ottenimento di piante in vaso da utilizzare in campo. L'obiettivo finale vuole essere quello di propagare materiale autoctono in un'ottica di conservazione del germoplasma locale.

Conclusioni

In questo studio preliminare su popolazioni di castagno presenti all'interno della Riserva di Biosfera Alpi Ledrensi, finanziato dal MAB-Unesco, è stato dimostrato che gli ecotipi analizzati si possono suddividere in due gruppi precisi uno contenente gli ecotipi di castagne e l'altro quello di marroni. I marcatori utilizzati sono sufficientemente informativi per discriminare queste due popolazioni. L'incremento del numero di campioni, delle zone campionate e del numero di marcatori, con il supporto ulteriore dell'analisi dei metaboliti presenti negli individui analizzati, potrà permettere di ottenere un'ulteriore diversificazione anche all'interno dei due gruppi individuati, castagne e marroni. Inoltre i risultati ottenuti dalla attività preliminare di micropropagazione fanno sperare in una futura attività applicabile al vivaismo locale al fine di poter utilizzare il materiale locale caratterizzato in futuri impianti, per conservare quanto più possibile il germoplasma presente sul Trentino e la sua biodiversità.

Bibliografia

- AVAGYAN A., BRATANOVA-DONCHEVA S., BELLINI E., BOBOKASHVILI Z., BOLVANSKÝ M., B. M. ., BOUFFIER V. A., BOUNOUS G., BUENO S.C.S., CASEY J., CASEY B., CHIPEV N., C. M., COSTA R.; CRADDOCK H.J., ČURKOVIĆ-PERICA M., DIAMANDIS S., D.-H. M. B., ERTAN E., FENG Y., FERREIRA-CARDOSO J., GOMES-LARANJO J., G.-D. A. J. . G. Z., HALTOFOVÁ P., HARUTYUNYAN M., HENNION B., HOVHANISYAN M., HOZOVÁ L., I. L., IDŽOJIĆ M., JANKOVSKÝ L., JURC D., JURETIĆ, D., KLINAC D., KNOWLES R., KREBS P., M. J., MAGHRADZE D., MAURER W. D., MERT C., MUJIĆ O. I., NIŇ S., NOVAK-AGBABA S., N., R.Y., OSTERC G., PEIXOTO F.; PEREIRA-LORENZO S., PINKOVSKIJ M.D., POLJAK, I., P. C. V., PRIDNJA M.V., PRGOMET Ž., QIN L., RAMOS-CABRER A.M., R.-M. D. R. A. V., RUSSELL K., SAITO T., SELJAK G., SERDAR Ū., SOBIEJAJSKI G.R., SOLAR A., SOYLU A., S. F., AND TARINOVÁ D., TUZLAK Z., VILDANA A., ŽIVKOVIĆ V. J., Y. O. K., 2009. *Sulle Orme del Castagno Following Chestnut Footprints (Castanea spp.)*. Scr. Hortic.
- DELLASALA, D. A., BAKER, R., HEIKEN, D., FRISSELL, C. A., KARR, J. R., KIM NELSON, S., NOON, B. R., OLSON, D., STRITTHOLT, J., 2015. *Building on two decades of ecosystem management and biodiversity conservation under the Northwest Forest Plan, USA*. Forests.
- NEX, F., GERKE, M., REMONDINO, F., PRZYBILLA, H. J., BÄUMKER, M., AND ZURHORST, A., 2015. *Isprs benchmark for multiplatform photogrammetry*. ISPRS Annals of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences, pp 135–142.
- MARINONI, D., AKKAK, A., BOUNOUS, G., EDWARDS, K. J., BOTTA, R., 2003. *Development and characterization of microsatellite markers in Castanea sativa (Mill.)*. Mol. Breed. 11, 127–136.
- BEGHÈ, D., GANINO, T., DALL'ASTA, C., SILVANINI, A., CIRLINI, M., FABBRI, A. 2013. *Identification and characterization of ancient Italian chestnut using nuclear microsatellite markers*. Sci. Hortic. (Amsterdam). 164, 50–57.
- QUINTANA, J., CONTRERAS, A., MERINO, I., VINUESA, A., OROZCO, G., OVALLE, F., GOMEZ, L. 2015. *Genetic characterization of chestnut (Castanea sativa Mill.) orchards and traditional nut varieties in El Bierzo, a glacial refuge and major cultivation site in northwestern Spain*. Tree Genet. Genomes 11.
- COLUCCI G., DE VITO V., VARRICCHIO E., DE CUNZO F., COCCIA E., PAOLUCCI M., DI STASIO M., BOSCAINO F., VIOLA C., VOLPE M.G., 2016. *Identification of Traceability Markers in Italian Unifloral Honeys of different Botanical Origin*. J. Nutr. Food Sci. 06.
- PEREIRA-LORENZO, S., RAMOS-CABRER, A. M., BARRENECHE, T., MATTIONI, C., VILLANI, F., DÍAZ-HERNÁNDEZ, M. B., MARTÍN, L. M., AND MARTÍN, Á. 2017. *Database of European chestnut cultivars and definition of a core collection using simple sequence repeats*. Tree Genet. Genomes 13.
- PEAKALL, R., SMOUSE, P. E. 2006. *GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. Mol. Ecol. Notes 6, 288–295.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. 2000. *Inference of population structure using multilocus genotype data*. Genetics 155, 945–959.
- JONES, O. R., WANG, J. 2010. *COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data*. Mol. Ecol. Resour. 10, 551–555.