



Italian Journal of Agronomy **Rivista di Agronomia**

An International Journal of Agroecosystem Management

III Convegno nazionale "Piante Mediterranee"

27 settembre – 1 ottobre 2006

Fiera del Levante, Bari, Italia



Università degli Studi di Bari

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali

Le piante mediterranee nelle scelte strategiche per l'agricoltura e l'ambiente

a cura di

Giuseppe De Mastro

Caratterizzazione molecolare di tre ecotipi di lenticchia (*Lens culinaris* Medik.)

Molecular Characterization of Three Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Ecotypes

F. Fiocchetti^{1*}, B. Laddomada², M. Roselli¹, P. Crino¹, S. Lucretti¹

¹ ENEA C.R. Casaccia, Dipartimento Biotecnologie, Agroindustria e Protezione della Salute
Via Anguillarese 301, 00123 Roma

² CNR ISPA, Via Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce

Riassunto

La lenticchia (*Lens culinaris* Medik.) è una delle specie di più antica utilizzazione, rinomata per l'elevato contenuto proteico della granella e per le sue proprietà salutari. I cambiamenti socio-economici che si sono verificati dal dopoguerra ad oggi nel nostro Paese hanno condotto ad una drastica riduzione (93%) delle superfici destinate alla coltivazione della lenticchia provocando la scomparsa di molti ecotipi e il rischio di erosione genetica per quelli ancora in coltura. Al fine di valorizzare e conservare la biodiversità presente nelle attuali popolazioni locali è stata condotta un'analisi molecolare per la stima della variabilità genetica presente all'interno e tra i tre ecotipi Onano, Altamura e Villalba, che vantano antiche origini e sono rinomati per le loro proprietà organolettiche. Le popolazioni sono state analizzate su base "singola pianta" mediante marcatori AFLP, e in "bulk" di più piante mediante marcatori I-SSR.

Abstract

Lentil (*Lens culinaris* Medik.) is an important grain legume cultivated worldwide as human food and dating back to pre-historic times. Social-economic changes, which occurred in the last 50 years in Italy, had conducted to a drastic reduction of lentil cultivation (by 93%) resulting in the disappearance of several local populations and exposing the ones still in cultivation to a high risk of genetic erosion. In order to improve and to preserve biodiversity still present inside the current landraces we investigated the level of genetic variation within and among three of the most appreciated Italian common lentil ecotypes: Onano, Altamura and Villalba.

Altamura, Onano and Villalba plants were analysed at individual level by fluorescent AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers and in bulk using I-SSR (Inter-Simple Sequence Repeats) markers.

Parole chiave: biodiversità, erosione genetica, marcatori molecolari, similarità.

Key words: biodiversity, genetic erosion, molecular markers, similarity.

Introduzione

La lenticchia (*Lens culinaris* Medik.; $2n = 2x = 14$) rappresenta una delle specie di più antica utilizzazione per il sostentamento dell'uomo ed è stata da sempre apprezzata per le qualità della sua granella che contiene una buona quantità di proteine, accompagnata da un basso contenuto in fattori antinutrizionali. Inoltre i residui colturali possono essere utilizzati per l'alimentazione del bestiame e, dal punto di vista agronomico, la lenticchia è considerata una coltura miglioratrice in quanto grazie all'azione azoto-fissatrice, arricchisce il terreno di azoto disponibile per la coltura successiva. Nella seconda metà del secolo scorso la coltivazione della lenticchia ha avuto un notevole incremento in paesi come l'Asia e l'America Centro-settentrionale, mentre ha subito un forte declino in Italia.

La lunga tradizione che detiene questa coltura ha permesso l'evoluzione nel tempo di numerose popolazioni locali ben adattate al microclima di ristretti areali. Attualmente in Italia la lenticchia è

* E-mail: floriana.fiocchetti@casaccia.enea.it

diffusa prevalentemente in zone svantaggiate di montagna e di collina collocate nella parte centrale e meridionale del nostro Paese. La produzione nazionale però non riesce più a sopperire al fabbisogno interno, tanto da dover ricorrere ad importazioni da Canada, Usa e Turchia, per coprire oltre la metà del nostro consumo. Ormai da tempo si sta verificando la scomparsa di molti ecotipi e il rischio di erosione genetica per quelli ancora in coltura. Risulta quindi necessario un rapido intervento che porti alla valorizzazione e alla conservazione della biodiversità presente nelle popolazioni locali di lenticchia ancora in vita. Le strategie di intervento per la lotta all'erosione genetica prevedono anche l'utilizzazione delle biotecnologie vegetali che a livello molecolare possono individuare e caratterizzare la variabilità genetica. È possibile rilevare la variabilità presente nelle sequenze del DNA mediante l'identificazione di marcatori molecolari correlati al polimorfismo intra-specifico dei materiali da salvaguardare.

Gli sforzi che recentemente si stanno sostenendo per cercare di salvaguardare popolazioni locali di antica tradizione incoraggiano lo studio e la caratterizzazione di queste ultime. Al tal fine è stata condotta un'analisi molecolare atta a stimare la variabilità genetica presente all'interno e tra i tre ecotipi Onano (Viterbo), Altamura (Bari) e Villalba (Caltanissetta), che vantano antiche origini e sono rinomati per le loro proprietà organolettiche. Nel secolo scorso la produzione di lenticchia nel nostro Paese si è incentrata essenzialmente su questi tre ecotipi (Piergiovanni, 2000). La lenticchia di Onano ha ottenuto riconoscimenti nazionali ed internazionali già a partire dai primi anni del 1900; la lenticchia di Altamura e quella di Villalba sono state particolarmente apprezzate dagli anni Trenta agli anni Cinquanta. Attualmente la coltivazione della lenticchia di Altamura è praticata solo sporadicamente da qualche vecchio agricoltore, mentre quella degli ecotipi di Onano e Villalba può ancora vantare una, seppur minima, presenza sul territorio. L'analisi molecolare è stata svolta utilizzando i marcatori AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e I-SSR (Inter Simple Sequence Repeat).

Materiali e metodi

I campioni vegetali analizzati nel presente studio appartengono alle tre popolazioni locali di lenticchia note con il nome di Onano, Altamura e Villalba (Fig. 1); essi sono stati inoltre confrontati con la varietà canadese Eston. La lenticchia di Onano è caratterizzata da seme grande (5 mm di diametro; 5.7g/100 semi) con colore variabile dal piombo scuro al cinereo-rosato e caratterizzato da una buccia tenera. Essa viene prodotta all'interno del Comune omonimo. La lenticchia di Onano e la cv. canadese Eston sono state fornite dall'Azienda Agricola "Camilli" Loc. Bicchiere, Onano (Viterbo). La lenticchia di Altamura è caratterizzata da seme piatto e particolarmente grande (5-7 mm di diametro; 6-7g/100 semi), dalla superficie liscia; viene prodotta in Puglia, nella zona dell'Alta Murgia, anche se attualmente è coltivata solo sporadicamente da qualche agricoltore; essa è stata fornita dal Prof. Giuseppe De Mastro, Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali (Università di Bari). Anche la lenticchia di Villalba è costituita da seme piatto e particolarmente grande (6-7g/100 semi); viene prodotta in Sicilia ed è caratterizzata da un notevole adattamento all'ambiente semi-arido presente nella parte centrale dell'isola (Gallo et al., 1997); essa è stata fornita dalla Ditta Sementiera MARTEA, Contrada Marraccia, Monreale (Palermo).

Le popolazioni, rappresentate ciascuna da almeno 25 piante, sono state analizzate su base "singola pianta" mediante marcatori AFLP e in "bulk" di più piante mediante marcatori I-SSR.

L'estrazione e la purificazione del DNA genomico totale è stata effettuata utilizzando il kit *NucleoSpin Plant* (MACHEREY-NAGEL, Germania) secondo le indicazioni riportate nel protocollo illustrativo. La valutazione degli assorbimenti spettrofotometrici è stata usata per quantificare la concentrazione dei campioni di DNA e determinarne la purezza (Sambrook et al., 1989).

L'analisi AFLP è stata condotta mediante il kit *AFLP™ Plant Mapping for Regular Plant Genomes* (Applied Biosystems, USA) che ha adattato tale tecnica al processamento finale mediante sequenziatore automatico, reso possibile dalla marcatura in 5' di uno dei due primer utilizzati nella reazione di amplificazione finale, con un colorante fluorescente. Sono state apportate alcune modifiche al protocollo suggerito dalla Applied Biosystems per cercare di renderlo più adatto alle

caratteristiche del genoma della lenticchia. I prodotti di AFLP sono stati separati tramite sequenziatore di acidi nucleici ABI PRISM 3130 a quattro capillari.

Per condurre l'analisi I-SSR è stato necessario individuare, mediante ricerca bibliografica, un certo numero di primers I-SSR potenzialmente adatti ad essere utilizzati con il genoma di lenticchia e mediante PCR selezionare quelli che amplificavano il DNA e mostravano buoni polimorfismi. Le reazioni di PCR sono state condotte aggiungendo a 30 ng di DNA Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), KCl 50 mM, 250 μ M di ciascun dNTP, MgCl₂ 3 mM, primer 0.6 μ M, 1 unità di AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, USA) in un volume finale di 25 μ l. L'amplificazione è stata eseguita nel termociclatore *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Germany) utilizzando le condizioni riportate in Barcaccia et al., 2003, con lievi modifiche. I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2,5% (p/v) e messi in evidenza mediante colorazione con bromuro di etidio (0.5 μ g/ml).

I marcatori AFLP e I-SSR sono stati registrati su una matrice binaria secondo la presenza (1) e l'assenza (0) dei picchi nel primo caso e delle bande nel secondo caso. Tutti i calcoli per le analisi di similarità genetica sono stati realizzati impiegando le appropriate applicazioni del software NTSYS-PC versione 2.11s (Exeter Publishing, Setauket, NY) (Rohlf, 2002). I coefficienti di similarità genetica tra individui sono stati calcolati in tutte le possibili combinazioni a coppie seguendo la formula di Dice (1945).

Risultati e discussione

In Italia attualmente vengono coltivati diversi ecotipi di lenticchia ma non esistono varietà registrate; la sola lenticchia di Castelluccio di Norcia ha assunto una consolidata posizione di prodotto di nicchia avendo ottenuto il marchio comunitario IGP. Le altre popolazioni locali mostrano un polimorfismo morfologico che non è chiaro se rispecchi anche un polimorfismo genomico. Gli studi riportati in letteratura sulla variabilità genetica di ecotipi italiani non sono molti (Barcaccia et al., 1998; Sonnante e Pignone, 2001) e, tra l'altro, non è mai stata studiata l'eventuale variabilità intra-popolazione esistente. Alla luce di queste osservazioni si è pensato di selezionare i tre ecotipi su cui si incentrava maggiormente la produzione di lenticchia in Italia nel secolo scorso (Fig. 1) e di campionarli "singola pianta" per verificare il grado di similarità presente non solo tra gli individui appartenenti ai diversi ecotipi ma anche tra quelli di una stessa popolazione. Per cercare di rilevare un buon numero di polimorfismi tra genotipi simili si è pensato di ricorrere ai marcatori molecolari AFLP (Vos et al., 1995; Zabeau e Vos, 1992) che combinano l'affidabilità e la riproducibilità degli RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) con la capacità discriminante della PCR. Sharma et al. (1996) hanno evidenziato che la tecnica degli AFLP è in grado di rilevare un maggior numero di polimorfismi rispetto all'analisi RAPD in campioni di lenticchia.

L'analisi AFLP è stata eseguita su DNA genomico estratto da singole piante per evidenziare eventuale variabilità intra-popolazione; in particolare sono stati utilizzati 30, 29 e 25 individui appartenenti rispettivamente agli ecotipi di Onano, Altamura e Villalba. Come controllo fuori tipo è stata scelta la varietà canadese Eston che è una delle lenticchie di importazione più diffusa in Italia. Sono state impiegate sei combinazioni di primer (E-ACA/M-CAC, E-ACT/M-CTA, E-AAC/M-CAG, E-ACC/M-CAT, E-ACT/M-CAA, E-AGC/M-CTA) che hanno permesso di ottenere 643 marcatori tra gli 85 campioni analizzati, essendo stati considerati solo i frammenti compresi tra 100 e 500 bp e con un'altezza del picco maggiore di 100.

In media ogni combinazione di primer ha permesso di analizzare 106 alleli marcatori. Sono stati evidenziati 565 loci polimorfici. L'analisi di raggruppamento condotta utilizzando la matrice dei coefficienti di similarità genetica di Dice ha portato alla definizione di un dendrogramma che mostra i campioni divisi in tre gruppi principali (Fig. 2).

Nel primo gruppo sono stati riuniti tutti i campioni di Altamura che hanno mostrato una similarità interna media di 0.819. Nello stesso raggruppamento, inaspettatamente, si è inserito anche il campione di Eston, che ci si attendeva si distribuisse a parte, costituendo una varietà straniera. L'elevata similarità tra l'ecotipo Altamura e la varietà canadese Eston idurrebbe a pensare ad un pool genico di origine comune. Nel secondo gruppo sono stati riuniti tutti i campioni

di Onano, con una similarità interna media di 0.855. Un risultato analogo è stato riscontrato anche nel terzo gruppo dove sono stati raggruppati tutti i campioni di Villalba con una similarità interna media di 0.860. Gli elevati coefficienti di similarità genetica riscontrati entro le singole popolazioni e le stime riguardanti la similarità genetica tra i diversi ecotipi (Tab. 1) hanno indicato un livello basso di differenziazione genetica, suggerendo un'origine comune dei materiali analizzati.

È interessante notare che i marcatori AFLP hanno permesso di raggruppare i genotipi appartenenti allo stesso ecotipo all'interno del medesimo cluster, riuscendo a distinguere le diverse popolazioni locali. Gli individui di Villalba hanno mostrato al loro interno una maggiore uniformità genetica rispetto agli altri due e sono risultati lievemente più simili ad Onano che ad Altamura.

Precedentemente campioni appartenenti agli stessi ecotipi sono stati analizzati mediante marcatori I-SSR (Zietkiewicz et al., 1994). In tal caso però il DNA rappresentativo di ciascuna popolazione locale è stato estratto da più piante. Tra 50 primers disponibili, ancorati a regioni SSR sia in 5' che in 3', ne sono stati selezionati 14, mediante reazioni di PCR in grado di amplificare il DNA e di fornire buoni polimorfismi. L'analisi I-SSR ha fornito 57 marcatori, tra i quali 50 polimorfici, scelti in base alla riproducibilità e all'intensità delle bande corrispondenti. L'analisi di raggruppamento condotta utilizzando la matrice dei coefficienti di similarità genetica di Dice ha portato alla definizione di un dendrogramma (Fig. 3a) che rispecchiava gli stessi rapporti di similarità tra gli ecotipi che erano stati ottenuti mediante AFLP (Fig. 3b). La comparazione dei cluster ottenuti dall'analisi AFLP "singola pianta" con i cluster ottenuti dai 57 marcatori prodotti dall'analisi I-SSR su DNA "bulked" ha indicato una correlazione del 96% suggerendo una buona efficienza di entrambe le metodologie ma una maggiore capacità discriminante dell'analisi AFLP rispetto a quella I-SSR (Fig. 3).

Conclusioni

I marcatori AFLP si sono dimostrati uno strumento utile ai fini di distinguere individui appartenenti ai diversi ecotipi di lenticchia presi in esame. Questo tipo di marcatori ha mostrato una buona sensibilità riuscendo ad individuare un buon numero di loci polimorfici (565).

Gli alti coefficienti di similarità genetica riscontrati entro le singole popolazioni (0.82-0.86) e le stime riguardanti la similarità genetica tra i vari ecotipi (0.71-0.75) sembrerebbero indicare un basso livello di differenziazione genetica tra Altamura, Onano e Villalba e una minima variabilità intra-popolazione.

La similarità di 0.78 tra l'ecotipo Altamura e la varietà canadese Eston farebbe supporre l'esistenza di un pool genico di origine comune.

La correlazione del 96% tra i dendrogrammi di similarità ottenuti con gli AFLP e gli I-SSR suggerisce una buona efficienza di entrambe le metodologie, ma una maggiore capacità discriminante dell'analisi AFLP rispetto a quella I-SSR.

Attualmente si stanno caratterizzando i tre ecotipi anche da un punto di vista morfo-fisiologico; l'unione dei dati ottenuti mediante caratterizzazione molecolare e caratterizzazione morfologica potrà permettere una inequivocabile identificazione genetica di ciascun ecotipo. Quest'ultima è di fondamentale importanza per la salvaguardia di risorse genetiche locali a rischio di erosione.

Bibliografia

- BARCACCIA G., ALBERTINI E., TORRICELLI R., RUSSI L., TOMASSINI C., FALCINELLI M. 1998. Molecular characterisation of local varieties of lentil and emmer. Proc. IV Convegno Nazionale sulla Biodiversità, 8-11 settembre, Alghero.
- BARCACCIA G., LUCCHINI M., PARRINI P. 2003. Characterization of a flint maize (*Zea Mays* var. *indurata*) Italian landrace, II. Genetic diversity and relatedness assessed by SSR and Inter-SSR molecular markers. *Genet. Res. Crop Evol.*, 50: 253-271.
- DICE L.R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
- GALLO G., BARBERA A.C., VENORA G. 1997. Valutazione agronomica di popolazioni di lenticchia (*Lens culinaris* Medik.) in ambienti semi-aridi. Proc. III Convegno Nazionale sulla Biodiversità, 16-17 giugno, Reggio Calabria. 279-288.

- PIERGIOVANNI A.R. 2000. The evolution of lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivation in Italy and its effects on the survival of autochthonous populations. *Genet. Res. Crop Evol.*, 47: 305-314.
- ROHLF F.J. 2002. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.1. Exeter Publishing, Ltd., Setauket, NY.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- SHARMA S.K., KNOX M.R., ELLIS T.H.N. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 751-758.
- SONNANTE G., PIGNONE D. 2001. Assessment of genetic variation in a collection of lentil using molecular tools. *Euphytica*, 120: 301-307.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRITERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M. 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.*, 23: 4407-4414.
- ZABEAU M., VOS P. 1992. European Patent Application. Publication no. EP 0534858.
- ZIETKIEWICZ E., RAFALSKI A., LABUDA D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

Tabella 1. Coefficienti di similarità genetica medi fra i diversi ecotipi calcolati sulla base dei marcatori AFLP.

Table 1. Matrix of genetic similarity coefficients among ecotypes calculated on the basis of AFLP markers.

	Altamura	Onano	Villalba	Eston
Altamura	1			
Onano	0.75	1		
Villalba	0.71	0.74	1	
Eston	0.78	0.76	0.69	1



Figura 1. Localizzazione geografica degli ecotipi di lenticchia analizzati.
Figure 1. Geographic location of lentil ecotypes analysed.

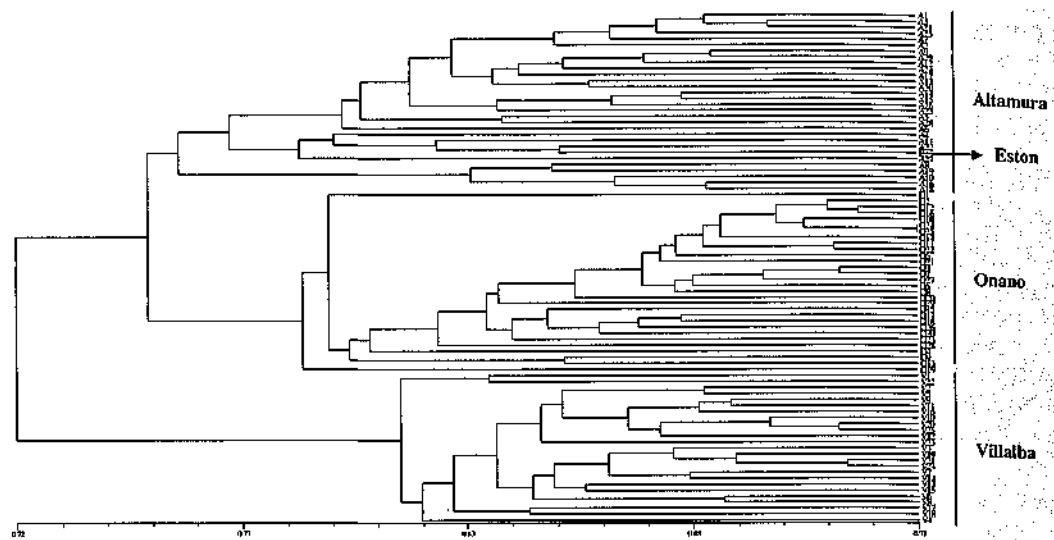


Figura 2. Dendrogramma dei campioni "singola pianta" di Altamura, Eston, Onano e Villalba costruito secondo il metodo UPGMA sulla base dei coefficienti di similarità genetica di Dice ottenuti dai marcatori AFLP.

Figure 2. Similarity dendrogram of the "single plant" DNA samples of Altamura, Eston, Onano and Villalba based on AFLP data and constructed according to the UPGMA method with Dice's coefficients.

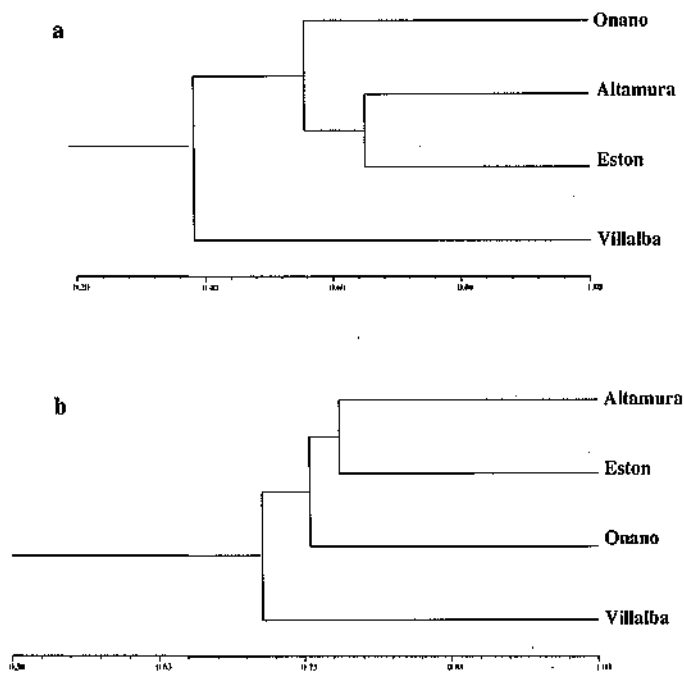


Figura 3. a) Dendrogramma costruito secondo il metodo UPGMA sulla base dei coefficienti di similarità di Dice ottenuti dai marcatori I-SSR. b) Dendrogramma costruito secondo il metodo UPGMA sulla base dei coefficienti di similarità medi ottenuti mediante i marcatori AFLP.

Figure 3. a) UPGMA dendrogram of the "bulked" DNA samples obtained from the genetic similarity matrix (Dice) based on I-SSR markers. b) UPGMA dendrogram obtained from mean values of the genetic similarity matrix (Dice) based on AFLP markers.