

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

---

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA VEGETALE  
XXIV CICLO

**La biodiversità del castagno nelle valli del Ceno e del Taro – Analisi  
molecolari, morfologiche e composizione chimica delle farine**

**Chestnut biodiversity of Ceno and Taro valleys – Molecular and  
morphological analysis and flour chemical composition**

Candidato  
Annalisa Silvanini

Tutor  
Prof. Andrea Fabbri

Coordinatore  
Prof. Marcello Tomaselli

2012



<b>I SCOPO DELL'INDAGINE</b>	<b>1</b>
<b>II INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>1. Origine e diffusione</b>	<b>3</b>
1.1. Il castagno in provincia di Parma	6
<b>2. Cronologia dei sistemi di caratterizzazione del germoplasma di castagno</b>	<b>8</b>
2.1 Caratterizzazione morfologica	9
2.2 Caratterizzazione molecolare	12
<b>3. Descrizione botanica</b>	<b>19</b>
<b>4. La composizione chimica della castagna</b>	<b>20</b>
4.1 L'amido	20
4.2 Gli zuccheri liberi	22
4.3 Amminoacidi	22
4.4 Lipidi	23
4.5 La fibra	25
4.6 Sostanze minerali	26
4.7 Acidi organici	27
4.8 Vitamine	28
4.9 Composti fenolici	29
4.10 Alcaloidi	31
<b>5. La farina</b>	<b>31</b>
<b>III MATERIALI E METODI</b>	
<b><i>Caratterizzazione molecolare</i></b>	<b>35</b>
<b>1. Origine del materiale</b>	<b>35</b>
<b>2. Valutazione genetica del materiale</b>	<b>36</b>
<b>3. Analisi SSR</b>	<b>37</b>
<b>4. Analisi dei dati SSR</b>	<b>39</b>
<b>IV MATERIALI E METODI</b>	
<b><i>Caratterizzazione chimica degli sfarinati</i></b>	<b>41</b>
<b>1. Origine del materiale</b>	<b>41</b>
<b>2. Caratterizzazione chimica delle farine</b>	<b>43</b>
2.1 Umidità	43
2.2 Analisi della frazione lipidica	43
2.3 Determinazione del profilo in acidi grassi	44
2.4 Analisi della frazione proteica	44
2.5 Profilo degli amminoacidi liberi	45
2.6 Analisi degli zuccheri totali	46
2.7 Analisi del potere antiossidante delle farine di castagne	48
<b>3. Analisi dei dati</b>	<b>49</b>

<b>V MATERIALI E METODI</b>	
<i>Valutazione morfologica e qualitativa di due cultivar a diverse altitudini</i>	<b>51</b>
1. Origine del materiale	51
2. Valutazione morfologica	51
3. Valutazione chimica delle farine	54
4. Analisi dei dati	54
4.1 Test di correlazione di Mantel	54
<b>VI RISULTATI E DISCUSSIONI</b>	
<i>Caratterizzazione molecolare</i>	<b>57</b>
<b>VII RISULTATI E DISCUSSIONI</b>	
<i>Analisi qualitativa delle farine</i>	<b>63</b>
<b>VIII RISULTATI E DISCUSSIONI</b>	
<i>Valutazione morfologica e qualitativa di due cultivar a diverse altitudini</i>	<b>75</b>
1. Valutazione molecolare	75
2. Valutazione morfologica	76
3. Valutazione qualitativa	93
4. Correlazione e analisi discriminante	102
<b>VIII CONCLUSIONI</b>	<b>105</b>
<b>IX BIBLIOGRAFIA</b>	<b>109</b>

## I SCOPO DELL'INDAGINE

L'avvento dell'era industriale che indusse le popolazioni ad abbandonare le campagne e le colture più disagiate, la sostituzione di queste con colture a più breve ciclo e più redditizie, l'ampliamento delle reti viarie che facilitarono il trasporto degli alimenti e resero sempre meno significativa l'economia di autosufficienza, l'aumento della richiesta del legname utilizzato nell'edilizia ma anche nella produzione di carbone vegetale, l'aumento della richiesta di materia prima, nel novecento, da parte dell'industria di estrazione dell'acido tannico ed infine i problemi di ordine fitopatologico, tra i quali il mal dell'inchiostro, lasciarono la maggior parte dei castagneti in uno stato di degrado ed abbandono. Questa situazione di incuria favorì poi la diffusione del cancro corticale importato dagli Stati Uniti nel '38 e diffusosi in Italia nella seconda metà del novecento, provocando seri danni e perdite alle regioni vocate alla castanicoltura. Ad oggi non si può certo dire che la castanicoltura rappresenti una coltura redditizia ma il castagno, come modello agroforestale, può essere considerato un elemento connotante il paesaggio rurale e rappresenta un unico ed insostituibile ponte tra cultura e coltura. Secondo l'Agenzia Europea dell'Ambiente (EEA) e l'Unione Mondiale per la Natura (IUCN), i castagneti che hanno raggiunto una situazione di equilibrio paesaggistico – ambientale, accentuando la polifunzionalità e la biodiversità di ecosistemi e paesaggi, rientrano a pieno titolo nelle tipologie di paesaggi europei da proteggere.

Castagne e marroni freschi alimentano un sostenuto mercato nei principali Paesi dell'Occidente industrializzato. I castagneti, oltre al frutto ed al legno, sono fonte di numerosi beni secondari quali miele, melata, funghi porcini e materie prime per prodotti fitoterapici. Detti beni, se debitamente valorizzati, sono in grado di migliorare sensibilmente l'economia delle aziende castanicole e possono fornire materie prime per le industrie di prima trasformazione come farine alimentari, birra e liquori.

È nell'ottica di salvaguardare la biodiversità che la prima parte di questo lavoro di ricerca si propone di recuperare cultivar, appartenenti alla specie *Castanea sativa* Mill. e tipicamente presenti sul territorio oggetto di studio, che altrimenti andrebbero perdute. L'incertezza in merito al nome ed all'origine delle piante dovuta alla possibilità che queste originino da semine casuali o da ricacci dal portainnesto e le confusioni generate dall'uso di nomi volgari o dialettali nell'identificazione delle piante, rende la classificazione ed il riordino varietale il primo traguardo di questo studio. Dal raggiungimento di tale traguardo si otterrebbero le conoscenze per l'eventuale recupero delle varietà desiderate.

Obiettivo strategico per la valorizzazione del settore castanicolo è infatti il miglioramento della filiera e lo sviluppo e promozione di nuovi prodotti a base di castagna. Il mercato attuale si presenta sempre più orientato verso la ricerca di nuovi prodotti che richiamano al passato ed alla tradizione, ad oggi considerate come indicatori di salute e genuinità.

È in questo contesto che la nostra ricerca inserisce il suo secondo obiettivo: indagare sulla composizione chimica di 10 farine monovarietalì di castagna provenienti da cultivar tipiche del territorio della provincia di Parma. Il profilo chimico ottenuto potrà quindi essere utilizzato come strumento di discriminazione tra farine provenienti da cultivar differenti e di individuazione delle caratteristiche peculiari così da poter eventualmente tipicizzare una produzione o orientare al meglio il processo tecnologico verso l'utilizzo più idoneo di questi sfarinati.

Le caratteristiche morfologiche e la qualità della produzione di una cultivar dipendono da due componenti principali, il genotipo e l'ambiente. Ogni genotipo costituisce una precisa varietà agraria (o cultivar). Infatti, dalla letteratura si evince che la componente genetica determina la composizione chimica della castagna e in alcuni casi è possibile discriminare le differenti cultivar sulla base di alcuni dei parametri biochimici misurati. Per quanto riguarda la componente ambientale esistono pochi studi sulle variazioni dei caratteri morfologici in relazione ai parametri ambientali; alcuni studiosi hanno ad esempio valutato l'accrescimento di germogli di alcune varietà di castagno a tre diverse altitudini individuando delle differenze significative all'interno della stessa cultivar a diversa altitudine. Non esistono invece studi su *Castanea* che evidenzino le variazioni della composizione chimica del frutto al variare delle condizioni ambientali; esistono però studi su altre specie vegetali, quali per esempio il girasole (*Helianthus annuus* L.) che hanno evidenziato che la composizione lipidica nei semi varia a seconda della latitudine e dell'altitudine. Da queste considerazioni scaturisce l'ultimo obiettivo di questo studio e cioè quello di valutare come l'altitudine possa influenzare la composizione chimica delle farine e la morfologia di due cultivar di castagno (Luetta e Leccardina), estesamente coltivate nell'Appennino parmense.

## II INTRODUZIONE

### 1. Origine e diffusione

Il Genere *Castanea* è naturalmente diffuso in tre grandi areali: in Europa e in tutti i paesi affacciati 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 (Bonous, 2005).

Jaynes nel 1975 ipotizzò che il genere si fosse originato in Cina, Paese descritto come il sito di maggiore diversità del genere; dal comune antenato si sarebbero generate 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. Per quanto riguarda la *Castanea sativa* Mill. molti studi, indicano invece il Nord-est della Turchia e la regione del Caucaso come centro di probabile origine. (Bounous e Marinoni, 2005).

Villani *et al.* nel 1991 confermano una maggiore diversità genetica all'interno delle popolazioni turche ed un più alto livello di differenziazione genetica tra le queste. Tuttavia, fino ad ora, non sono disponibili dati molecolari che confermino le relazioni genetiche tra castagno turco ed il resto delle popolazioni europee (Mattioni *et al.*, 2010). Fineschi *et al.*, (2000), studiando il cpDNA non sono riusciti a definire un modello possibile per la migrazione di questa specie 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).

Le riserve genetiche di *Castanea* evidenziano inoltre un'elevata variabilità dovuta all'adattamento del genere alle più disparate condizioni ambientali. 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 dovuta all'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 nella letteratura antica, secondo Condera (2004) si otterrebbe un'idea più precisa del ruolo che l'attività umana ed in particolare le civiltà Greche e Romane 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 potrebbero aiutare la ricostruzione della storia del castagno e dell'impatto dell'azione antropica su questo.

Riguardo all'appellativo, questo appare solo nel I sec. a.C nel manuale di agricoltura *De re rustica* di Marco Terenzio Varrone dove la castagna venne identificata col termine castanea. Il nome dal latino castanea-um o dal greco kastanon (sottint. Mélon = frutto) vuoi derivato da Kastania, villaggio della Tessaglia o da Kastanis nell'area del Ponto, dove si dice abbondasse (senza però escludere che il toponimo prendesse il nome dalla cosa e che si trattasse di voce proveniente da qualche lingua asiatica). Un'altra ipotesi emerge da un racconto di Plinio il Vecchio nel *Naturalis Historiae* dove l'autore racconta che la castagna veniva chiamata "la ghianda di Dio" e per questo in seguito considerata il frutto del Cristo. La sua conformazione chiusa in un guscio ricco di aculei spinosi infatti ha evocato nella cultura cristiana l'immagine di Gesù tormentato. Inoltre si è voluto associare a tale frutto il concetto di castità in quanto, chiuso nel suo guscio, evoca qualcosa che debba esser preservato. Quest'ultima interpretazione sembra inoltre derivare dal nome latino *castanea* contenente la radice *casta* ovvero "pura" (Impelluso 2003).

Il castagno (*Castanea sativa* Mill.) appartenente alla famiglia delle Fagaceae o Copuliferae di cui fanno parte anche *Lithocarpus*, *Northofagus* e *Quercus*, venne designato nel 1753 dallo svedese 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.

Nel caso del castagno e della sua larga diffusione nei vari continenti è importante ricordare che l'espressione genica di una pianta è imputabile non solo l'ereditabilità dei caratteri ma anche l'adattamento della pianta ai vari fattori locali, biotici ed ecologici. Si parla infatti di "areale di distribuzione" di una specie, cioè la zona in cui la pianta ha raggiunto l'equilibrio con i fattori ambientali (Baldini e Marangoni, 1993). Secondo il Codice Internazionale per la nomenclatura per *cultivated variety* si intende "un insieme di piante coltivate, chiaramente distinto da qualsiasi carattere (morfologico, fisiologico, citologico, chimico o altro) che, quando riprodotto (per via sessuata o asessuata), conserva i propri caratteri distintivi" (Trehane, *et al.*, 1995).

È anche vero che i caratteri morfologici e biologici possono non apparire sempre costanti in ogni zona e per ciascun clone, in seguito all'azione dei particolari ambienti pedoclimatici in cui essi vengono a trovarsi; si deve introdurre, quindi, il concetto di "ecotipo", ossia il particolare aspetto biologico,

morfologico ed agronomico che varietà e cloni vengono ad assumere in ambiente diverso (Baldini e Scaramuzzi, 1952).

L'interesse e la diffusione di questa pianta, dovuta principalmente all'intervento antropico, è da imputarsi da sempre e principalmente alla sua valenza quale risorsa economica in grado di garantire un presente ed un futuro in molte zone montane. Ad oggi una rinnovato interesse per l'ambiente e il mondo rurale accompagnato dall'insediamento o il reinsediamento di nuovi abitanti in queste zone, ha comportato la manifestazione di un rinnovato entusiasmo, anche imprenditoriale, per questa coltura. Spesso però i nuovi abitanti, per la maggior parte pensionati o pendolari, non portano nel loro bagaglio culturale le tradizionali conoscenze riguardanti questa coltura ed un suo eventuale recupero rimane legato ad un'attività part time e ad una presenza non continuativa sul territorio. Nella rivalutazione del castagneto quale fonte di reddito, va ricordato che per quanto riguarda quello tradizionale non si tratta solo di una coltivazione produttiva ma che caratterizza un paesaggio "culturale" e che grazie alla sua valenza ecologica spesso possiede un importante ruolo nella gestione del territorio montano.

Non bisogna inoltre dimenticare che il frutto o castagna ha assunto agli occhi del consumatore un valore che è strettamente associato all'immagine dell'ambiente naturale dal quale proviene la cui "naturalità", addirittura, assume maggior importanza dell'indubbio potere nutritivo dell'alimento.

Ecco che una corretta gestione della fertilità del suolo, il non utilizzo di antiparassitari di sintesi, anche a fronte di un'eventuale conseguente perdita di prodotto ed il mantenimento della biodiversità all'interno degli impianti divengono punti chiave sui quali si basa la futura fortuna del frutto di castagno.

Nonostante la sua origine antropica, il castagneto rimane un bosco con dinamiche e cicli propri, che gli interventi mirati a mantenerne il solo aspetto produttivo possono danneggiare. Per ciò che riguarda la castanicoltura tradizionale si tratta sempre di una coltivazione a bassa intensità e poco meccanizzata ed il beneficio economico dato dalla produzione di castagne non è mai disgiunto da vantaggi più generali legati alla caratterizzazione del paesaggio, al mantenimento della scarsa antropizzazione, della naturalità dell'ambiente, all'effettiva protezione del suolo ed alla regimazione delle acque garantita dal soprassuolo forestale castanicolo. Questi ulteriori benefici possono acquisire maggior valenza del peso economico legato alla produzione, alla quale inoltre vanno aggiunti altri prodotti del castagneto quali funghi e selvaggina. In alcune regioni europee il castagno viene talvolta coltivato in impianti che sono veri e propri frutteti. Le piante vengono tenute spaziate e di piccole o medie dimensioni per facilitarne la gestione e raccolta. In questo contesto la coltivazione è finalizzata alla produzione frutticola ma la necessaria artificializzazione dell'ecosistema porta a maggiori costi di gestione, minor valenza ambientale degli impianti e del prodotto e maggior predisposizione agli attacchi di parassiti quali funghi ed agenti del mal d'inchiostro favoriti da una minor complessità dell'ecosistema.

### 1.1. Il castagno in provincia di Parma

Le prime notizie riguardanti la pianta di castagno nella provincia di Parma ci giungono dall'agronomo reggiano Filippo Re che formulò un elenco delle principali cultivar corredato da alcune caratteristiche tipiche di queste, quali la produttività o la resistenza al freddo (Tab. 1).

---

<b>Rossola maschia</b>	<i>Fa frutti abbondanti ma è delicata assai e teme il freddo perciò riesce nei monti bassi che negli altri</i>
<b>Rossola femina</b>	<i>È delicatissima, mostra maggior abbondanza sull'albero che in terra mentre spesso volte i ricci sono vuoti o pieni per metà</i>
<b>Polidola</b>	<i>Di sua natura s'alza pochissimo. Fa frutta copiosa</i>
<b>Cortina</b>	<i>Frutta molto ma non tutti gli anni. Ha rami corti</i>
<b>Marzola</b>	<i>È fecondissima ma tardiva e per ciò non buona pè terreni soggetti ai primi freddi</i>
<b>Ponticosa</b>	<i>Invecchia presto</i>
<b>Biancana</b>	<i>È una delle migliori perché riesce bene per tutto</i>
<b>Dal lazzaretto o dal</b>	<i>Alligna facilmente ovunque ma soffre gli estremi delle stagioni</i>
<b>Rossale</b>	<i>Non teme né il freddo né il caldo e di rado falla. Presto invecchia né terreni sottili</i>
<b>Manico di Rastello</b>	<i>Ha una vegetazione prospera e cresce più delle altre</i>
<b>Mazzangajo</b>	<i>Produce belle e grosse castagne ma scipite e tardive</i>
<b>Marone</b>	<i>Le sue castagne sono le più grosse di tutte ma non molto abbondanti, onde in montagna se ne trovano pochi. Giova coltivarle in collina</i>
<b>Selvatica</b>	<i>È l'albero più alto e ramoso del suo genere. Tarda ogni anno spogliarsi de fiori maschi. È il più scarsi di rami fruttiferi</i>
<b>Femminella</b>	
<b>Carpanese</b>	
<b>Fusetto</b>	<i>Sono rare e poco conosciute</i>
<b>Morone</b>	
<b>Pungente</b>	<i>Rimane infruttifera pè freddi che non lasciano maturarla onde è buona per le colline</i>
<b>Garfagnina</b>	<i>Riesce ovunque ed è delle prime a maturare. Torna innestare i selvatici con questa specie perché di rado falla</i>

---

Tab. 1- Elenco delle cultivar presenti sul territorio parmense redatto Da Filippo Re

Nel 1913 l'agronomo parmense Fabio Bocchialini stilò una lista di 37 varietà (Fig. 1) soffermandosi in particolare su quattro di queste che valutò come le più interessanti e diffuse: *Selvatica*, *Perticaccia*, *Pelosetta* e *Mondaiola*.



Fig.1 - Diffusione indicativa delle varietà di castagno in provincia di Parma secondo Bocchialini.

In occasione della giornata del castagno svoltasi in provincia di Arezzo nel 1977, Bagnaresi pubblicò i risultati di un'indagine svolta sul patrimonio castanicolo tosco – emiliano nella quale individuò nella provincia di Parma e più precisamente nei comuni di Albareto, Corniglio e Monchio, otto cultivar: *Cardine, Incardina, Mandaiola, Luetta, Massese, Plosino, Tingin e Tosco*.

Qualche anno più tardi Avolio e collaboratori (1979), in uno studio sugli aspetti colturali e varietali della castanicoltura da frutto calcolarono l'incidenza delle singole cultivar sulle produzioni emiliano romagnole. I risultati nella provincia di Parma furono: Luetta 50%; Incardina 30%; Massese 10%; Mosette 5%; Verdeise 5% (le ultime due non trovano rispondenza nelle cultivar segnalate da Bagnaresi *et al.*). In occasione della mostra organizzata durante il convegno di Montella (AV) nel 2005 campioni di castagne provenienti dalla provincia di Parma sono stati esposti e giudicati di particolare interesse (Tab. 2).

Cultivar (ecotipo)	Inizio raccolta	Luogo	Presentato da
Ampollana	Prima decade di ottobre	Valle del Manubiola, loc. Bergotto (PR)	A. Marchi, D. Spagnoli
Bonella	Prima decade di ottobre	Valle del Taro, Loc.Carniglia di Bedonia (PR)	L. Guglielminetti
Carpinese	Seconda decade di ottobre	Valle del Taro, Loc.Carniglia di Bedonia (PR)	L. Guglielminetti
Foglia Stretta	Prima decade di ottobre	Valle del Taro, loc. Carniglia di Bedonia (PR)	S. Boglioli, I. Botti
Garbei	Prima decade di ottobre	Valle del Manubiola, loc. Valbona (PR)	P. Iasoni, F. Squeri
Gabella	Seconda decade di ottobre	Valle del Gotra, Albareto (PR)	I. Bertorelli
Gursona	Prima decade di ottobre	Valle del Manubiola, loc. Valbona (PR)	P. Iasoni, F. Squeri
Leccardina	Prima decade di ottobre	Valle del Gotra, Albareto (PR)	I. Bertorelli
Luetta	Prima decade di ottobre	Valle del Taro, loc. Carniglia di Begonia (PR)	I. Botti
Luetta	Prima decade di ottobre	Albareto (PR)	I. Bertorelli, I. Botti
Lunetta	Prima decade di ottobre	Montarsiccio di Bedonia (PR)	S. Boglioli, I. Botti
Maggione	Seconda decade di ottobre	Valle del Taro, Loc.Carniglia di Bedonia (PR)	L. Guglielminetti
Marrone di Al lumiere	Prima decade di ottobre	Albareto (PR)	E. Bassoni, I. Botti
Marrone di Vicenza	Prima decade di ottobre	Albareto (PR)	E. Bassoni, I. Botti
Mondaiola	Terza decade di settembre	Valle del Gotra, loc.Groppo di Albareto (PR)	M. Bassoni, I. Botti
Paiasca	Prima decade di ottobre	Valle del Gotra, loc.Groppo di Albareto (PR)	M. Bassoni, I. Botti
Perticaccia	Prima decade di ottobre	Valle del Manubiola, loc. Corchia (PR)	P. Iasoni, I. Botti
Pezza	Prima decade di ottobre	Valle del Gotra, loc.Groppo di Albareto (PR)	M. Bassoni, I. Botti
Preila	Prima decade di ottobre	Valle del Taro, loc. Carniglia di Bedonia (PR)	S. Boglioli, I. Botti
Valente	Prima decade di ottobre	Albareto (PR)	I. Bertorelli, I. Botti

Tab. 2 - *Cultivar della Provincia di Parma esposti in occasione del Convegno di Montella (AV) 2005*

## 2. Cronologia dei sistemi di caratterizzazione del germoplasma di castagno

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. Gaio Plinio Secondo o Plinio il vecchio nel tomus XV del *Naturalis Historiae* 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).

## 2.1 Caratterizzazione morfologica

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, rigidità 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 della buccia, le dimensioni del residuo stilare, quelle della macchia alla base e la sottigliezza e tenacità dell'episperma (che Piccioli definiva con il termine toscano *sansa*, altrimenti 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.

Il 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 della membrana interna.

Intanto in Francia il castagno veniva descritto da Tricaud, Lamy de Lachapelle ed in particolare nel 1911 Laviolle, 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 delle 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 e riguardo alla qualità del prodotto commerciale. Fenaroli inoltre puntualizzava però 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 le varietà coltivate in diverse regioni vengono designate con differenti nomi, 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 nel 1985 per descrivere cultivar di castagno nelle valli del Natisone (Fabbri A. *et al.*, 1985) e nelle valli di Trento (Ponchia G. *et al.*, 1985). Nel 2001 la medesima scheda servì per lo studio di piante di castagno nelle aree della Comunità montana di Feltrina (Ponchia G. *et al.*, 2001 a) e nel parco regionale dei colli Euganei (Ponchia G. *et al.*, 2001 b).

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 (per esempio 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 regioni di Verin – Monterrey (Queijero J.M., *et al.*, 2005) e nelle Asturie (Pereira-Lorenzo S. *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 *Châtaignes 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 di 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 Bounous *et al.*, pubblicarono l'Inventory of Chestnut Research, Germplasm and References da parte del FAO-CHEAM (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.

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 descrittivi 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, del frutto e del seme. Ai caratteri descrittivi morfologici Bellini e collaboratori aggiunsero quelli fenologici, bio – agronomici e tecnologici, le anomalie riguardanti i frutti e la sensibilità ai parassiti.

Nel 2010 Mujic *et al.* Nell'Una – Sana Kanton, una regione ricca di foreste della Bosnia Herzegovina, 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.

## 2.2 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.

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'ideale 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.

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 tuttavia 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-Cabrera 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 e che 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).

Alla fine degli anni '80, l'impiego delle tecniche di analisi del DNA contribuì 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, delezioni, traslocazioni, 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 inter-*

*microsatelliti*), 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*).

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, nel 1998, impiegarono i marcatori RAPD per identificare le principali cultivar di castagno di importanza commerciale per la Regione Campania. In Portogallo, Valdivieso (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, coltura che ad oggi occupa una superficie ridotta ma vanta una tradizione antichissima. In particolare i marcatori 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 florale 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 amplificati 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:

- a) sono molto abbondanti (in media ogni 23,3Kb) (Wang *et al.*, 1994);
- b) sono estremamente polimorfici;
- c) sono co-dominanti permettendo quindi di distinguere la condizione omozigote da quella eterozigote;
- d) 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 mantenendo il polimorfismo (un esempio di trasportabilità è quello proposto da Pereira *et al.*, 2010);
- e) 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; Akkac *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 EMC<sub>s</sub> 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.

### 3. Descrizione botanica

Il castagno europeo è una pianta longeva e maestosa dotata di una chioma espansa più o meno rotondeggiante che può superare anche i 30 m. Il tronco adulto è caratterizzato da profonde solcature a spirale della corteccia grigio – bruna e può raggiungere diametri ragguardevoli fino a superare i 400 cm in piante plurisecolari. Nelle piante in fase giovanile la corteccia si presenta liscia di colore grigiastro mentre i rami di un anno, di colore - bruno rossastro, sono caratterizzati da lenticelle biancastre.



Fig. 2 - Koblner, F.E.1890.

Il castagno possiede un sistema radicale diffuso con fittone non molto sviluppato e robuste radici laterali che esplorano il terreno in profondità. Le foglie di consistenza coriacea sono lunghe dagli 8 ai 20 – 25 cm. e larghe dai 3 ai 6 – 8 cm. di forma lanceolata o ellittica. La pagina fogliare superiore si presenta di un verde cupo mentre quella inferiore di un grigio verde giallognolo e leggermente pubescente. Le nervature sono generalmente evidenti e di colore chiaro, l'apice acuminato ed il bordo presenta dentature assai pronunciate. Le gemme globose, lisce e di colore bruno inizieranno il germogliamento verso la fine di marzo o più tardi e dalle gemme fuoriusciranno germogli sui quali si svilupperanno infiorescenze maschili e femminili. I fiori maschili disposti in amenti eretti sono lunghi dai 10 ai 20 – 35 cm mentre quelli femminili si presentano meno numerosi, solitari, o aggregati in numero di 2 o 3 alla base delle infiorescenze staminifere.

La classificazione botanica del frutto, volgarmente detto castagna, costituisce oggetto di discussione. Secondo alcuni autori infatti la castagna dovrebbe essere classificata come achenio (Merendi 1954, Fenaroli *et al.*, 1976, Baroni 1969), mentre secondo altri come noce. Si definisce *achenio* un frutto semplice, secco, indeiscente, contenente un unico seme ed il cui tegumento seminale non è aderente al pericarpo. Si definisce *noce* un frutto secco indeiscente, con pericarpo duro, racchiudente un unico seme, derivato da un gineceo formato dalla fusione di più carpelli (Raven 1973). La castagna di forma globosa – schiacciata, possiede una faccia esterna convessa e una interna piana, il pericarpo si presenta coriaceo color marrone lucido all'esterno e peloso all'interno. Si trova racchiusa in una cupola spinescente detta riccio costituita da 4 valve ed il pericarpo presenta alla base una grande cicatrice denominata ilo. I cotiledoni in numero di due e differenti tra loro sono ricoperti da una sottile pellicola membranosa non sempre facilmente staccabile e detta episperma.

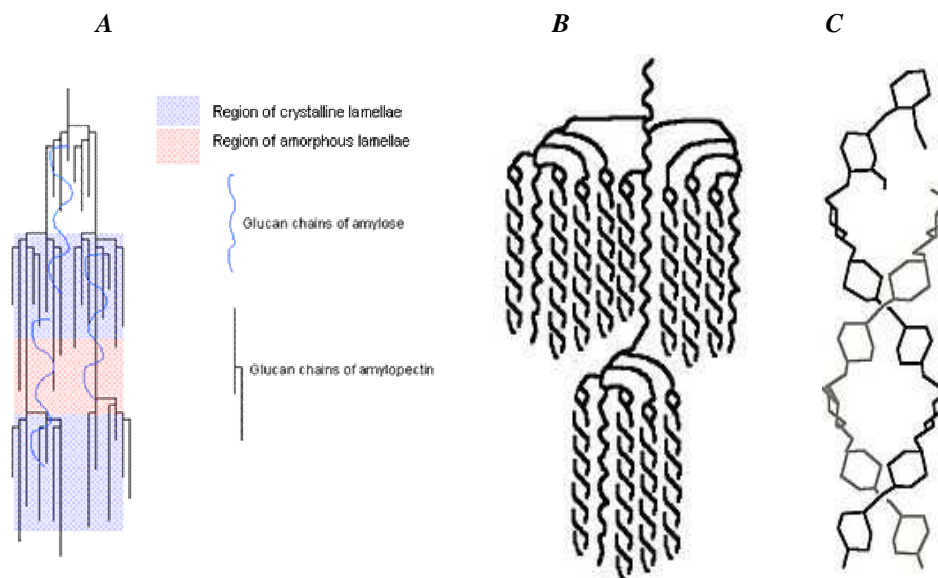
#### 4. La composizione chimica della castagna

##### 4.1 L'amido

L'amido rappresenta la principale riserva di carbonio e costituisce il carboidrato di riserva delle piante. Diversi polimeri di glucosio arrangiati in strutture tridimensionali semicristalline vanno a formare i granuli di amido. La biosintesi dell'amido coinvolge infatti la produzione di glucani polimerici ma anche il loro arrangiamento nella forma organizzata contenuta in un granulo di amido.

Questo carboidrato polisaccaridico viene sintetizzato durante il giorno a livello delle foglie e traslocato durante le ore notturne. I siti di maggior accumulo dell'amido sono rappresentati da organi di riserva quali semi, frutti, e tuberi all'interno dei quali i plastidi provvedono principalmente alla sua sintesi e quindi denominati amiloplasti. (Martin 1995).

L' amido è una sostanza importantissima nella nostra dieta poiché costituisce la parte preponderante dei carboidrati complessi assunti in un'alimentazione equilibrata. È composto da due tipi di glucani polimerici: amilosio e amilopectine. L'amilosio consiste principalmente in catene lineari costituite da residui di  $\alpha$ -D-glucopiranoside recanti legami  $\alpha$  (1-4). L'amilopectina è anch'essa costituita da catene lineari di glucosio con legami  $\alpha$  (1-4) di cui il 4-5% formano però legami  $\alpha$  (1-6) dando così origine a punti di ramificazione. La teoria per lungo tempo accreditata in merito all'arrangiamento delle catene laterali dell'amilopectina è quella di Mayer e Bernfeld (1940) secondo la quale la molecola aveva una disposizione ad "albero". Successivamente grazie all'utilizzo della pullulanasi, un'enzima deramificante ad azione specifica sui legami  $\alpha$  (1-6), è emersa l'esistenza di due differenti tipi di catene, delle quale una più abbondante formata da circa 15 unità, detta catena A e l'altra formata da circa 40 unità chiamata catena B. Il complesso formato dalle due catene è stato proposto nel 1974 da Robin ed è ad oggi noto come "modello a grappolo" (Fig. 3).



*A: rappresentazione delle zone amorphe e cristalline della molecola di amilopectina B: rappresentazioni modello a grappolo dell'amilopectina C: rappresentazione dell'elica di amilosio e amilopectina*

*Fig. 3 - Modello a grappolo dell'amido proposta da Robin nel 1974*

La forma dei granuli di amido è caratteristica per ogni specie (Gerola & Gerola, 1986) ma risultano scarsi gli studi riguardanti l'amido nel frutto di castagno. Attanasio e collaboratori nel 2004 hanno osservato gli effetti della temperatura sulle proprietà chimico fisiche della castagna durante il processo di essiccazione evidenziando che i granuli di amido del frutto fresco si presentano di forma arrotondata o ovale di dimensioni comprese tra i 3 e 15  $\mu$ m

Il frutto di castagno ne contiene mediamente 22,3 g/100 g. di prodotto fresco laddove la patata ne contiene 15,9 g/100 g ed i legumi vanno dai 19,5g/100 g dei fagioli ai 2,1g/100 g delle fave. (Italian Food Composition Table, 1997).

Questo pone la castagna quale una delle maggiori fonti di amido, nonostante il suo contributo per quel che concerne l'apporto di questo nutriente nella nostra dieta sia piuttosto scarso a causa del basso consumo, in particolare rispetto a quello delle patate e dei legumi.

#### 4.2 Gli zuccheri liberi

Il saccarosio che rappresenta un terzo degli zuccheri totali presenti nella castagna (Desmaison & Adrian, 1986) costituisce uno dei parametri maggiormente utilizzati nella valutazione della qualità della frutta. Il contenuto zuccherino e la sua composizione non risultano tuttavia costanti ma possono essere influenzati da diverse condizioni quali la temperatura, l'umidità relativa, il tempo di raccolta, il tenore di ossigeno ed il metodo di confezionamento (Kazantzis *et al.*, 2003). La composizione in zuccheri liberi in oltre dipende dalla cultivar e dal genotipo cui appartiene il frutto in esame e dalle tecniche colturali utilizzate. Unitamente al saccarosio, glucosio, fruttosio e maltosio sono presenti in discrete quantità e possono contribuire alla caratterizzazione di una specifica cultivar (Balta *et al.*, 2009).

La presenza degli zuccheri liberi unitamente ad un elevata percentuale in amido determinano nella castagna caratteristiche sensoriali positive e gradevoli al palato che ne aumentano il valore commerciale. (De Vasconcelos *et al.*, 2010). Da analisi preliminari sul contenuto zuccherino in frutti freschi di cultivar italiane e spagnole emerge quanto segue in tabella (Tab. 3).

	Saccarosio (g 100 g <sup>-1</sup> DM)	Glucosio (g 100 g <sup>-1</sup> DM)	Fruttosio (g 100 g <sup>-1</sup> DM)	Maltosio (g 100 g <sup>-1</sup> DM)
Castagne spagnole (Bernàrdez <i>et al.</i> , 2004)	19,5	0,3	0,3	nr
Castagne italiane (Attanasio <i>et al.</i> , 2004)	29,7	1,4	1,9	1,5

Tab. 3 - Comparazione del contenuto in zuccheri liberi in due studi sul castagno (Bernàrdez *et al.* 2004, Attanasio *et al.* 2004)

#### 4.3 Amminoacidi

Il contenuto proteico di un alimento è un fattore molto importante nell'ottenimento di una dieta nutrizionale sana ed equilibrata. Il contenuto proteico nella castagna si attesta mediamente intorno ai 3,5 g su 100 g. di prodotto fresco, il che rappresenta approssimativamente il 9,2% della dose giornaliera raccomandata (RDI) per le donne ed il 7,6% per gli uomini. Gli amminoacidi sono molecole

biologicamente attive e svolgono diverse importanti funzioni nell'organismo quali quelle di fonte energetica, precursori di proteine ed altre molecole. Si dividono in amminoacidi essenziali, che non vengono sintetizzati dall'organismo in quantità sufficienti e devono quindi essere apportati attraverso la dieta e quelli non essenziali che invece vengono sintetizzati dall'organismo in quantità adeguate. (DeVasconcelos *et al.*, 2010). In uno studio del 2007 condotto su alcune cultivar portoghesi, De Vasconcelos e collaboratori hanno evidenziato la presenza di 15 amminoacidi (acido aspartico, acido glutammico, asparagina, serina, glutammina, glicina, treonina, arginina, alanina, tirosina, valina, triptofano, isoleucina, leucina e fenilalanina) nella castagna 7 dei quali essenziali (arginina, isoleucina, leucina, treonina, valina e fenilalanina e triptofano), anche se alcuni risultano essere presenti solo in tracce (tirosina, triptofano, glicina, e treonina) (Borges *et al.*, 2008). Il profilo amminocidico della castagna è dominato dall'acido aspartico, risultato della conversione dell'asparagina, seguito poi dall'acido glutammico, dalla leucina, dall'alanina e dall'arginina. Questi 5 amminoacidi costituiscono il 50% degli amminoacidi liberi totali. In uno studio riguardante il metabolismo dell'azoto nei semi di lupino e la maturazione dei cotiledoni nei fagioli di soia l'asparagina è stata individuata quale punto chiave in quanto durante la maturazione i semi necessitano di azoto per stoccaggio delle proteine sintetizzate, azoto che si ipotizza derivi appunto dall'asparagina (Demaison A. M. *et al.*) La castagna risulta quindi essere una buona fonte di questi composti nonostante non presenti un profilo amminocidico che possa essere definito equilibrato poiché l'apporto di alcuni amminoacidi essenziali risulta essere ai limiti minimi delle raccomandazioni nutrizionali della FAO (1990).

#### 4.4 Lipidi

I lipidi dal greco *lypos* = grasso sono molecole organiche costituite prevalentemente da atomi di carbonio e di idrogeno uniti tra loro con legami covalenti scarsamente polari (caratteristica che conferisce il comportamento idrofobo) e disposti simmetricamente. Rappresentano un'importante riserva energetica poiché sono in grado di liberare una grande quantità di calorie per unità di massa. Il valore calorico di un grammo di lipidi (circa 9 Kcal/g) è circa il doppio rispetto a zuccheri e proteine e proprio per questo rappresentano il substrato energetico ideale per le cellule. I grassi nell'organismo assumono anche altre funzioni che vanno oltre all'importante funzione energetica; svolgono infatti funzioni strutturali nelle membrane biologiche, sono precursori di biomolecole quali ormoni steroidei e acidi biliari e fungono da trasportatori di vitamine liposolubili (A, D, E, K) ragione per cui eccessive riduzioni di lipidi nella dieta possono provocare una diminuzione dell'apporto vitaminico. Il loro deposito vicino ad organi importanti come cuore, fegato, milza, reni, cervello e midollo spinale rappresenta un' importante protezione meccanica, ed inoltre il suo deposito nel sottocute svolge un ruolo isolante contro le basse temperature. Si dividono in lipidi semplici costituiti da carbonio, idrogeno

e ossigeno (trigliceridi, triacilgliceroli, cere e terpeni) e lipidi complessi, detti anche lipoidi, costituiti da carbonio, idrogeno, ossigeno e fosforo o azoto e sono frutto di esterificazione degli acidi grassi con alcoli di vario tipo. Comprendono fosfolipidi, fosfatidi, glicolipidi e solfolipidi. I lipidi complessi sono anche detti saponificabili perché se immersi in soluzione alcalina formano saponi.

Per quanto riguarda il tenore lipidico della castagna diversi autori hanno pubblicato dati a riguardo. Si va dall' 1.3% secondo Ferreira-Cardoso (2002) al 2.40-2.52% secondo Borges (2007), al 3.55% riportato da Desmason and Adrian (1986) fino al 3.6% di McCarthy and Meredith (1988). La causa della variabilità di questo dato risiede probabilmente in quanto scritto da Üstün e collaboratori nel 1999 riguardo all'influenza della cultivar e delle caratteristiche pedoclimatiche sul tenore lipidico così come su tutti i costituenti naturali delle piante. La castagna presenta un tenore lipidico notevolmente più basso rispetto ad altri prodotti simili quali mandorle (36-53%) (Abdallah *et al.*, 1998) o nocciole (46.7-76.8%)(Percherisa *et al.* 1993) e la frazione grassa è risulta esser costituita principalmente da 3 acidi grassi: acido linoleico (C18:2 Δ9,12), acido oleico (C18:1 Δ9) e acido palmitico (C16:0) che insieme costituiscono circa l' 80% del totale degli acidi grassi presenti (Fig. 4)

Gli acidi grassi saturi o SFA, la cui presenza conferisce maggior resistenza in termini di shelf life al prodotto, rappresentano il 15-17% secondo Borges e collaboratori (2007), mentre per Barreira ed il suo

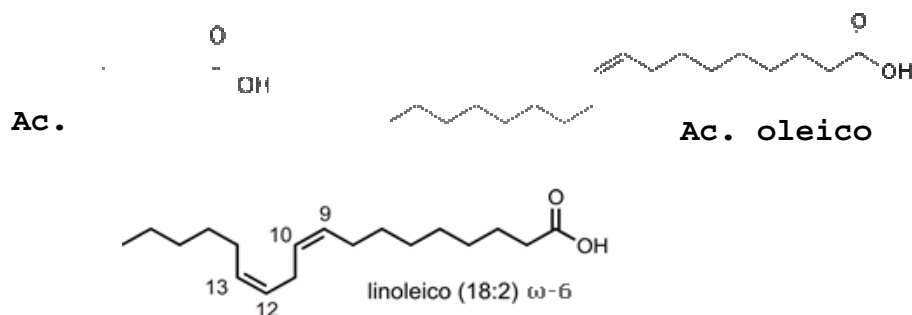


Figura 4 - Formule di struttura degli acidi grassi maggiormente presenti nella castagna.

gruppo di ricerca (2009b) la percentuale sta tra il 16 ed il 19%. La frazione di acidi grassi insaturi o USFA varia invece, secondo i due autori sopra citati dall' 83 all'85% del totale; questi si dividono in monoinsaturi o MUFA e polinsaturi o PUFA.

Dal rapporto tra PUFA e MUFA che è risultato essere inferiore ad uno, come evidenziato in uno studio di Borges del 2007, si può evincere la predominanza dei PUFA che come noto possiedono un'influenza negativa sulla conservabilità del prodotto ma gli conferiscono effetti positivi per la salute umana ed in particolare per il sistema cardiovascolare. Tra gli acidi grassi polinsaturi due possono essere definiti essenziali ovvero l'acido linoleico (C18:2 Δ9,12), precursore dell'arachidonico e l'acido α-linolenico (18:3 Δ9,12,15) precursore dell'acido ecosapentaenoico o EPA (20:5 Δ5,8,11,14,17) e acido

docosaesaenoico DHA (22:6  $\Delta$ 4,7,10,13,16,19). Questi acidi grassi possono esser definiti essenziali poiché l'uomo non possiede il sistema enzimatico in grado di deidrogenare gli ultimi 6 atomi di carbonio della catena e devono quindi essere introdotti tramite la dieta.

#### 4.5 La fibra

La fibra alimentare (o fibra dietetica) è l'insieme di quei carboidrati complessi (polisaccaridi, cellulosa, emicellulosa, lignine, inulina, oligosaccaridi) e di altre sostanze non immediatamente digeribili dall'uomo e perciò non assimilate dal nostro organismo. Gli enzimi digestivi contenuti nello stomaco ( $\alpha$ -glicosidasi, maltasi-isomaltasi, saccarasi) non riescono infatti a scindere i legami che uniscono le molecole di glucosio che la compongono (legame beta-glucosidico). La fermentazione completa o parziale avviene nell'intestino crasso. I batteri del colon proseguono la fermentazione degli zuccheri, e i vari processi fermentativi danno origine a numerosi prodotti finali che vengono rilasciati nel colon: oltre a idrogeno gassoso, biossido di carbonio e metano si originano grandi quantità di acidi grassi a corta catena SCFA, specialmente acido acetico, acido propionico e acido butirrico e persino etanolo. Questi sottoprodotti sono riassorbiti nel colon e sono associati ad un corretto metabolismo ed integrità della mucosa del colon (Cook and Sellin, 1998).

Poiché le fibre solubili hanno la caratteristica di assorbire l'acqua riducono l'indice glicemico degli alimenti, danno un lieve senso di sazietà e fanno aumentare la massa delle feci facilitando lo svuotamento dell'intestino.

Per semplicità, si chiamano spesso "fibra" anche sostanze non fibrose come le pectine. La fibra alimentare infatti pur non potendosi considerare un nutriente, esercita effetti di tipo funzionale e metabolico che la fanno ritenere una importante componente della dieta umana. Oltre che all'aumento del senso di sazietà e al miglioramento della funzionalità intestinale e dei disturbi ad essa associati (stipsi, diverticolosi), l'introduzione di fibra con gli alimenti è stata messa in relazione alla riduzione del rischio per importanti malattie cronico - degenerative, in particolare i tumori al colon-retto (in parte spiegata dalla diluizione di eventuali sostanze cancerogene e dalla riduzione del loro tempo di contatto con la mucosa), il diabete e le malattie cardiovascolari (in parte per una riduzione dei livelli ematici di colesterolo) (National Research Council, 1989).

La castagna mostra valori di fibra grezza (CF), formata da cellulosa e lignina, estremamente cultivar-dipendenti e compresi tra 2,63% e 3,33% calcolati sulla materia secca come riportato da Borges e collaboratori (2008); gli stessi Autori hanno riportato valori di ADF (acid detergent fibre) compresi tra l'1,89% e il 3,07% e valori di NDF (neutral detergent fibre) variabili dal 13,8% al 21,8%. Questi valori sono in accordo con i risultati presentati da Pereira-Lorenzo e collaboratori (2005) e leggermente superiori a quelli emersi da quanto pubblicato da McCarty & Meredith (1988). Secondo Salas-Salvadò &

Megias (2005) la frutta a guscio contiene quantità significative di fibre se comparate ai valori di fibra riportati per frutta e verdura. Alla fibra sono associati numerosi claim salutistici come riportato in Tab. 4.

Physiological importance and health benefits claimed for non-digestible oligosaccharides	
Physiological effects	Health factors
Stimulated carbohydrate metabolism in colonic bacteria; increased bacterial cell mass, short chain fatty acids, and fermentation gases	Through short chain fatty acids, they provide energy sources for the colonic epithelium and control of differentiation. Flatulence may be a problem. Laxative effects
Selection of bifidobacterial and lactic acid bacterial growth in large bowel	Enhanced resistance to invading pathogens
Not hydrolysed by oral micro-organisms	Protection against caries
Not glycaemic	Potentially useful for diabetics
Non-specific stimulation of immune function	Resistance to infection
Modulation of carcinogen metabolism	Anticancer properties
Reduced hepatic synthesis of very low density lipoprotein cholesterol and serum triglycerides	Coronary heart disease
Increased absorption of Mg and Ca	Osteoporosis

From: [BMJ. 1999 April 10; 318\(7189\): 999-1003.](#)

Tab. 4 - Claim salutistici associati all'assunzione di fibra.

#### 4.6 Sostanze minerali

Gli animali, contrariamente alla maggior parte dei vegetali, assumono l'azoto in forma organica e covalente, in genere attraverso le proteine, e così per la gran parte del fosforo, che proviene ugualmente da composti organici. Il ferro, pur potendo essere assunto in forma salina, in molte specie animali è meglio e maggiormente assimilato se fornito in forma chelata, come ad esempio avviene assumendolo attraverso la mioglobina delle carni. Lo zolfo è principalmente introdotto tramite gli aminoacidi solforati metionina e cisteina ed il cobalto in tutti i vertebrati, uomo compreso, non è essenziale ma anzi tossico in forma inorganica, e deve essere introdotto tramite cobalamina in forma coordinata. Nell'uomo la quantità di sali minerali presenti rappresenta circa il 6% del peso corporeo, pertanto il fabbisogno giornaliero è limitato, tuttavia essendo essi eliminati costantemente dall'organismo, attraverso le feci, l'urina ed il sudore, devono essere costantemente reintegrati.

Le sostanze minerali si distinguono in: **macroelementi e microelementi**

I **macroelementi** sono gli elementi presenti nell'organismo umano in quantità relativamente elevate, il cui fabbisogno giornaliero è superiore a 100 mg. come calcio, cloro, fosforo, magnesio, potassio, sodio e zolfo; sono costituenti fondamentali e strutturali delle molecole biologiche, o circolano nei fluidi extracellulari in forma ionica.

I **microelementi** sono gli elementi il cui fabbisogno giornaliero varia da meno di 1 mg sino a 99 mg. e tra questi ritroviamo ferro, rame, zinco, fluoro, iodio, selenio, cobalto, manganese e molibdeno. Sono elementi di cui si conosce il valore biologico, la localizzazione molecolare o la funzione biochimica ed

esiste una vastissima letteratura scientifica e medica sul loro ruolo nell'organismo. Dei microelementi fanno parte anche gli **oligoelementi** (dal greco: ολίγος, oligo, poco) e cioè quegli elementi chimici presenti solo in tracce nell'organismo umano, in genere rilevati da studi dell'ultimo quarto del ventesimo secolo, per l'evoluzione delle tecnologie analitiche. Spesso di questi elementi non si conosce la localizzazione molecolare o la funzione biochimica, sempre se esistente. Il reale fabbisogno di questi elementi non è sempre stabilito né appurato, e molti autori li considerano in gran parte inessenziali. Si tratta di apporti dell'ordine dei microgrammi o meno, giornalieri. In alcuni casi si tratta di metalli estremamente tossici, anche a basse dosi, e spesso soggetti ad accumulo nell'organismo, per cui il reale dosaggio non deve essere banalizzato. Sono molto più frequenti i rischi da sovradosaggio e contaminazione ambientale.

Il contenuto minerale delle castagne è risultato non essere dipendente solo dal genotipo e dalle condizioni pedoclimatiche ma anche dalla composizione minerale del suolo ove le piante sono state coltivate (De Vasconcelos *et al.*, 2010). Secondo diversi autori tra i macroelementi presenti nella castagna si trovano, in ordine di grandezza, potassio, fosforo, calcio e magnesio (Breisch 1995; Pereira-Lorenzo *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2008). Per quel che concerne i microelementi gli autori riportano dati discordanti (McCarthy & Meredith, 1988; Portela, Ferreira-Cardoso, Reboredo, & Pimentel-Pereira, 1999; Ustun, Tosun, & Serdar, 1999; Ferreira-Cardoso, 2000)

#### 4.7 Acidi organici

La natura e la concentrazione degli acidi organici nei frutti e nei vegetali possono influenzarne le caratteristiche organolettiche (Vaughan & Geissler, 1997). La quantità relativa e la presenza o assenza di ogni acido organico inoltre è considerata utile negli studi tassonomici (Coppola & Starr, 1986; Silva *et al.*, 2002; Valentão *et al.*, 2005a) per la determinazione quantitativa di frutti in prodotti derivati nelle analisi di autenticità (Silva *et al.*, 2002) ed è inoltre utile per valutare il processo tecnologico ed in particolare la shelf life e quindi il confezionamento cui verrà sottoposto il prodotto (Silva *et al.*, 2004a; Valentão *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 1993) (Ribeiro *et al.*, 2007).

Esistono numerosi studi sulla composizione chimica delle castagne, tuttavia solo pochi studi riguardano gli acidi organici. Ribeiro ed il suo gruppo di ricerca nel 2007 hanno condotto uno studio sul contenuto in acidi organici in due cultivar portoghesi di *Castanea sativa* Mill., identificandone 7: acido ossalico, acido cis-aconitico, acido citrico, acido ascorbico, acido malico, acido chinico e acido fumarico (Fig. 5).

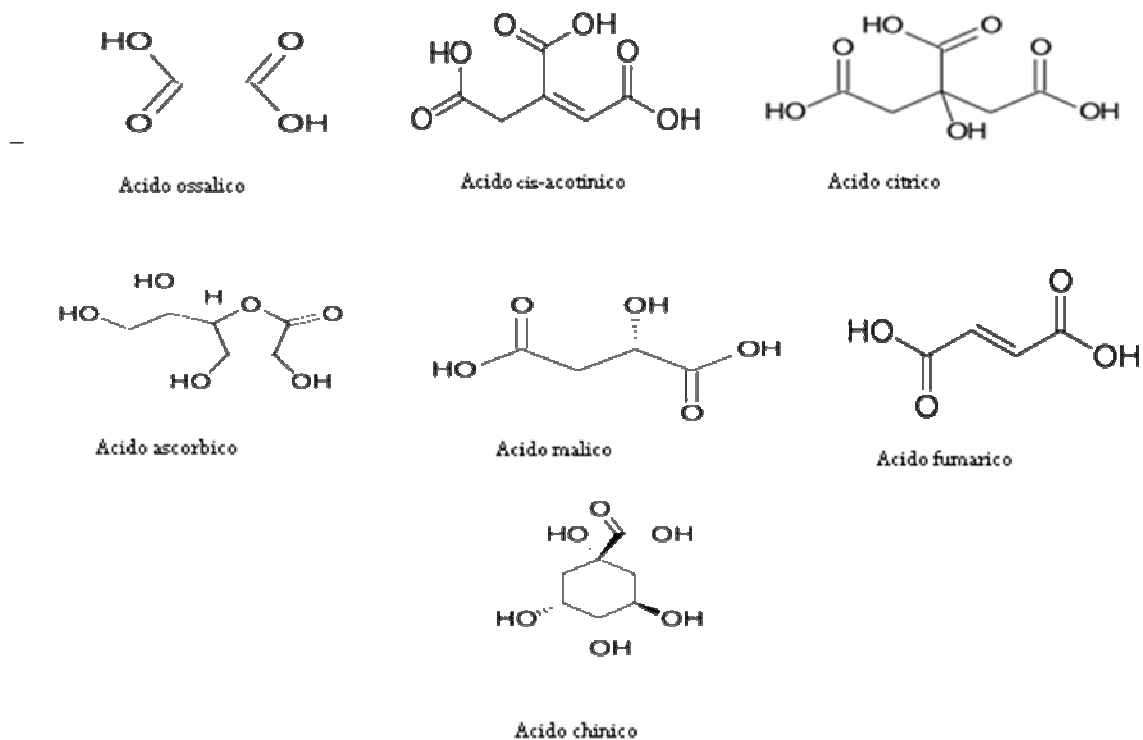


Fig. 5

Fig. 5 - Formule di struttura degli acidi organici identificati nella castagna.

#### 4.8 Vitamine

Il termine vitamina viene dal tedesco Vitamin, ovvero "ammina della vita" in quanto erroneamente scambiate per ammine dallo scienziato Casimir Funk.

Le vitamine costituiscono un insieme disomogeneo di sostanze nutrienti dalla complessa struttura organica, che sono presenti nei materiali biologici non solo di natura alimentare. Dal punto di vista strutturale, le vitamine non hanno nulla in comune, così come le loro funzioni biologiche non offrono alcun aiuto per quanto riguarda la loro definizione o la loro classificazione. Al momento infatti l'unica classificazione operativamente valida è quella che le distingue in due gruppi:

- vitamine liposolubili, cioè solubili nei grassi: sono le vitamine A, D, E, K, F;
- vitamine idrosolubili, cioè solubili in acqua: sono le vitamine C, B1, B2, B5, B6, PP, B12, Bc, H.

Le vitamine idrosolubili non sono accumulate dall'organismo umano, per questo vanno assunte con regolarità. Al contrario, quelle liposolubili possono essere accumulate.

Le vitamine idrosolubili svolgono principalmente la funzione di coenzimi, mentre non tutte quelle liposolubili hanno una simile attività.

Non tutte le vitamine vengono assunte nella loro forma biologicamente utilizzabile ma piuttosto come precursori che vanno sotto il nome di provitamine. Una volta assunti, tali composti vengono trasformati da specifici enzimi metabolici nella loro forma attiva, al fine di renderli utilizzabili.

Studi riguardanti le vitamine (De Vasconcelos *et al.*, 2010a) nelle castagne hanno evidenziato la presenza delle vitamine E, C, A, B1, B3, B5, B6 e di folati (Tab. 5).

Barreira e collaboratori nel 2009 hanno condotto uno studio sui profili di tocoferoli di alcune cultivar di *Castanea sativa* in Portogallo. I tocoferoli sono composti che insieme ai tocotrienoli vengono comunemente designati col termine vitamina E. Diversi studi in letteratura riguardanti antiossidanti lipofili, evidenziano i numerosi benefici che questi hanno sull'organismo. Dallo studio di Barreira (2009) è inoltre emerso che i profili di tocoferoli possono essere utilizzati quale attendibile discriminante nell'identificazione delle cultivar di *Castanea sativa*.

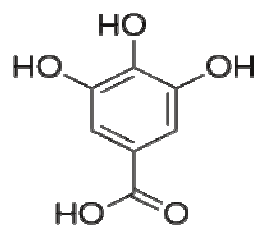
#### 4.9 Composti fenolici

I composti fenolici sono ampiamente diffusi in natura e rappresentano una importante classe di metaboliti secondari. La diffusione dei fenoli è comune in tutto il regno vivente ma la maggior quantità si ritrova nei tessuti vegetali. In questi sono responsabili di molte caratteristiche organolettiche, fitoterapiche e cromatiche; ad esempio ai tannini si riconoscono qualità astringenti, agli antociani il colore dei fiori, agli acidi fenolici il sapore acidulo, ad alcuni flavonoidi il sapore amaro. I composti fenolici sono noti già da molto tempo quali sostanze presenti negli estratti vegetali capaci di combinarsi con le proteine della pelle animale in complessi insolubili, di prevenirne la putrefazione da parte degli enzimi proteolitici e trasformarla in cuoio. I tannini in particolare sono composti polifenolici comuni nelle piante vascolari; nelle angiosperme in particolare sono associati ai tessuti legnosi. Nella cellula vegetale i tannini sono separati dalle proteine e dagli enzimi del citoplasma, ma quando avviene una lesione (attacco da parte di erbivori) la reazione tanninica può rendere meno assimilabile la pianta per il predatore. Inoltre il contenuto in sostanze tanniche del legno rappresenta la caratteristica che gli conferisce la capacità migliorare la conservazione del legno stesso in ambiente umido, utile soprattutto per il legname navale per impedirne o rallentarne la degenerazione.

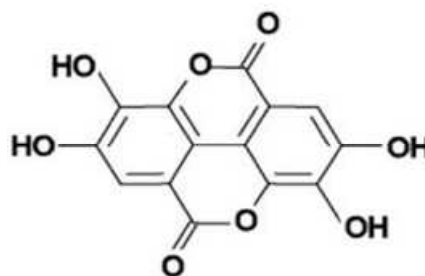
Le fonti più ricche di tannini sono le cortecce di piante come quercia, castagno, abete, acacia.

In base alla capacità di idrolizzarsi, i tannini sono stati classificati in due categorie: tannini idrolizzabili e tannini condensati.

I tannini idrolizzabili sono copolimeri degli acidi gallico e/o ellagico (Fig. 10) uniti agli zuccheri (solitamente glucosio). Vengono infatti anche denominati rispettivamente tannini gallici e tannini ellagici.



**Acido**



**Acido**

Fig. 6 - Formule di struttura dei monomeri dei tannini idrolizzabili.

I tannini condensati (Fig. 7), denominati anche proantocianidine in quanto possono dare origine ad antocianidine, sono polimeri di flavonoidi che si sono condensati principalmente tramite legami C-C. Tali legami non vengono facilmente idrolizzati in condizioni normali. La polimerizzazione tra i monomeri avviene attraverso i carboni nelle posizioni 4, 6 e 8 nel sistema dei flavonoidi (Bartolomè *et al.*, 1995). La loro capacità di formare complessi con le proteine conferisce, ai cibi che ne sono ricchi, la caratteristica astringenza (Haslam & Lilley, 1988). Esperimenti condotti in vivo su animali hanno dimostrato che da una dieta ricca in tannini condensati si ottengono effetti nutrizionali negativi, quali una riduzione dell'appetito, una diminuzione della capacità di assorbimento dei nutrienti ed un abbassamento del tasso di accrescimento (Reddy *et al.*, 1985; Butler, 1989; Clausen 1990; Salunke *et al.* 1990).

Studi effettuati sul castagno (Barreira *et al.*, 2008) hanno messo in evidenza la presenza di composti fenolici in tutti i tessuti, anche se in quantità differenti, a partire dal pericarpo, dove se ne trovano in maggior quantità, seguito dall'episperma, dai fiori, dalle foglie ed in fine dai frutti.

Nei frutti a differenza del legno i composti fenolici non sono ancora stati identificati (Lampire *et al.*, 1998) in letteratura si ritrovano infatti i quantitativi di composti fenolici totali, che per il frutto si attestano tra i 15 mg/g e i 22 mg/g di peso secco (Gonçalves *et al.* 2010).

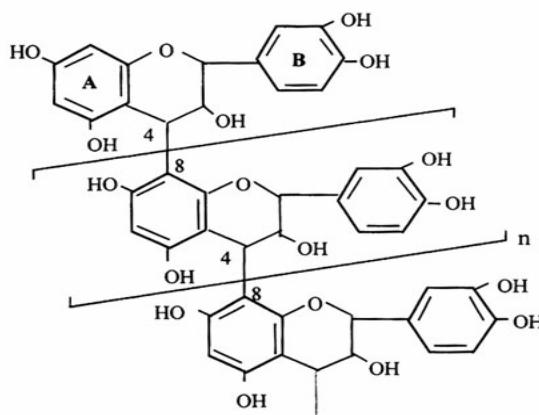


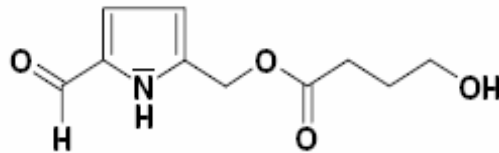
Fig. 7 - Struttura dei tannini condensati.

Vazquez e collaboratori nel 2009 hanno pubblicato uno studio sul pericarpo ed episperma della castagna con l'obiettivo di ampliare le conoscenze a riguardo e trovare un impiego per quelli che ad oggi sono considerati scarti di lavorazione ma che rappresentano materiale ricco in antiossidanti polifenoli.

#### 4.10 Alcaloidi

Gli alcaloidi sono basi organiche azotate ritrovate principalmente nelle piante superiori. Queste molecole sono caratterizzate dalla presenza di uno o più atomi d'azoto, normalmente come ammine primarie, secondarie o terziarie e ciò conferisce loro una certa basicità che è spesso utilizzata per il loro isolamento e purificazione poiché consente di formare sali idrosolubili in presenza di acidi minerali.

Nella castagna è stato identificato un alcaloide pirrolico (Fig. 8) (Hiermann *et al.*, 2001), il metil-(5-formil-1H-pirrolo-2-yl)-4-idrossibutirrato, ma non esistono studi riguardo gli effetti biologici di questo composto (positivi o negativi che siano).



Methyl-(5-formyl-1H-pyrrole-2-yl)-4-hydroxybutyrate

Fig. 8 - Struttura dell'alcaloide pirrolico identificato nella castagna.

#### 5. La farina

Oggigiorno nella maggior parte dei casi le castagne immesse sul mercato sono sottoposte ad operazioni di selezione o prima lavorazione. Selezione e calibratura consentono di vendere un prodotto scelto che presenta basse percentuali di scarto e quindi un prezzo maggiorato sul mercato rispetto al prodotto non selezionato detto "di massa". La castagna come altri semi nei giorni seguenti la fuoriuscita dal riccio presenta un'elevata attività metabolica. I carboidrati presenti in abbondanza nella polpa vengono utilizzati come fonte energetica nella respirazione dei tessuti con produzione, oltre a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, di calore. L'ammassamento e la temperatura ambiente favoriscono lo sviluppo di muffe e marciumi, mentre un'essiccazione troppo rapida provoca un distacco dell'episperma e permette alle crittogame di attaccare il seme. La polpa costituita da un 50% in acqua e l'epicarpo, poroso e non lignificato,

favoriscono lo scambio gassoso con l'ambiente ma anche attacchi da parte di numerosi insetti e patogeni fungini. Le castagne quindi pur essendo considerate, dal punto di vista merceologico, tra i frutti secchi, si differenziano da questi per la difficoltà nella conservazione. La qualità del prodotto finale è infatti molto influenzata dalle condizioni sanitarie del prodotto al momento della raccolta e dal processo applicato al fine di scartare i frutti alterati, arrestare le infezioni fungine e mantenere le caratteristiche organolettiche della castagna inalterate. Quanto detto riguarda in particolar modo le castagne destinate al consumo fresco e soprattutto a quello fresco non immediato. Queste infatti subiscono processi di conservazione che possono essere tradizionali come la ricciaia, la curatura o idroterapia e l'essiccazione o industriali quali la sterilizzazione o termoterapia, la fumigazione con bromuro di metile, la refrigerazione in atmosfera controllata e non, i trattamenti con CO<sub>2</sub> e la surgelazione.

L'essiccazione rappresenta l'antico procedimento adottato per secoli in quasi tutte le realtà castanicole italiane, come testimoniano gli essiccatoi ancora presenti nei boschi d'Italia. Attraverso l'essiccazione i frutti acquistano in digeribilità con una riduzione del tenore idrico dal 50% a meno del 10% ed un aumento della concentrazione dei principi attivi e degli elementi minerali. All'essiccazione sono destinate le castagne di ridotta pezzatura, zuccherine, poco settate e facilmente pelabili. Questa operazione avviene ancora frequentemente come un tempo e si svolge in appositi essiccatoi ovvero piccoli edifici in pietra di due piani che a seconda della regione in cui sorgono prendono nomi differenti come *secom* nel cuneese, *metati* in Toscana e *cannicci* nell'Appennino bolognese.

La farina di castagna viene ottenuta dalla macinazione di frutti secchi dopo l'eliminazione dell'episperma (Bounous & Giacalone 1992) e risulta essere un componente importante nella produzione dolciarie di Francia ed Italia (Breisch, 1993). In letteratura ritroviamo alcuni studi condotti sulla farina di castagna (Pinnavaia *et al.*, 1984; Pinnavaia *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1994) dai quali emerge che questa farina può esser utilizzata per alimenti prodotti attraverso il processo dell'estrusione/cottura. Questa tecnologia è una tecnica utilizzata dall'industria alimentare per lavorare e contemporaneamente cuocere prodotti amidacei e/o proteici, e permette di ottenere prodotti alveolati e leggeri, in particolare snack, cereali da colazione (come i corn flakes) e alimenti per animali. Rappresenta una tecnologia i cui vantaggi sono dati dalla rapidità e da una maggiore flessibilità del processo stesso (Harper, 1981). Secondo uno studio pubblicato da Sacchetti e collaboratori (2003) i prodotti ottenuti per estrusione/cottura con farina di castagna sono realizzabili solo se questa viene opportunamente mescolata con altre farine a causa dell'alto contenuto in zuccheri che ha un effetto restrittivo sulla gelatinizzazione e limita l'espansione del prodotto. Oltre a questo le alte temperature di estrusione possono innescare reazioni di Maillard provocando un imbrunimento del prodotto e variazioni nel sapore.

L'uso della farina di castagne potrebbe migliorare le caratteristiche nutrizionali di un prodotto poiché presenta un minor contenuto in proteine rispetto a quella di cereali e le proteine in essa contenute mostrano caratteristiche nutrizionali peculiari tra cui un alto contenuto in globuline ed albumine. La composizione amminoacidica delle globuline presenti nella farina di castagna è risultata essere simile a quella presente nei semi delle leguminose così come per le albumine. Il contenuto in lisina e treonina, amminoacidi essenziali, risulta piuttosto alto mentre la metionina rappresenta l'amminoacido limitante ovvero quell'amminoacido essenziale presente nella concentrazione più bassa rispetto al fabbisogno, che impedisce l'ottimale utilizzo degli altri amminoacidi per la sintesi proteica.

Inoltre vi si ritrova una considerevole quantità di  $\alpha$ -acido amminobutirrico derivato dall'arginina ed importante neurotrasmettitore nel sistema nervoso centrale (Tixier & Desmaison, 1980), ed un livello apprezzabile di fibra alimentare e vitamine (Salvini et al. 1998).



### III MATERIALI E METODI

#### *Caratterizzazione molecolare*

##### *1. Origine del materiale*

A seguito di una ricerca dei dati esistenti in bibliografia riguardanti la castanicoltura nei territori dell'Appennino parmense ed particolare nelle valli del Ceno e del Taro e con l'ausilio delle indicazioni fornite dai castanicoltori locali, nel 2008 sono stati individuati 30 genotipi appartenenti alla specie *Castanea sativa* Mill. storicamente presenti su questo territorio. Dalle 30 cultivar individuate (Tab. 5) sono poi stati prelevati campioni di materiale vegetale per le analisi, volte a valutare la variabilità genetica della specie in quest'area geografica.

codifica estrazione DNA	varietà	altro nome dialettale	codifica albero
1	<b>Luetta</b>		1A
5	<b>Leccardina</b>	Cardenina	2A
9	<b>Mondaiola</b>	Mondadi	3A
19	<b>Luetta Carniglia</b>		1I
23	<b>Preila</b>		4A
27	<b>Lusetta</b>		5A
31	<b>Fogliastretta</b>		(X) Ca 1
32	<b>Pezzua</b>		(X) GR1
33	<b>Paiasca</b>		(X) GR2
34	<b>Marrone di Vicenza</b>		(X) GR3
35	<b>Marrone di Viterbo</b>		(X) GR4
36	<b>Vignolese 3</b>		(X) GR5
37	Vignolese?		(X) FO1
38	Vignolese 2		(X) FO2
39	Marrone?		(X) FO3
40	<b>Perticaccia</b>		(X) BO1
41	<b>Pelladella</b>		Ba1
42	<b>secolare non identificato</b>		Ba2
43	<b>Massese</b>		Ba3
44	<b>garbella</b>		Ba4
45	<b>negrella</b>		Be1
46	<b>Fusnella</b>		Be2
47	<b>Gursona</b>		Co1
48	<b>Ampollana</b>	"Ampollona"	Co2
49	<b>Perticaccia</b>	"Pardgassa"	Co3
50	<b>Carpinese</b>	"Carpineisa"	To1
51	<b>Boiasca</b>		SM1
52	<b>Boneira</b>		SM2
53	<b>Maggione</b>		SM3
54	<b>Rossellina</b>		SM4

*Tab. 5 - Elenco delle cv di castagno in analisi e loro localizzazione geografica.*

## 2. Valutazione genetica del materiale

### 2.1 Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto da foglie prelevate, utilizzando il metodo CTAB (Belaj *et al.*, 2001), da piante in piena fase vegetativa e, per quanto possibile, la raccolta del materiale è stata eseguita avendo cura di prelevare foglie giovani ed esenti da problemi fitosanitari.

Il materiale vegetale è stato conservato, previa immersione in azoto liquido, in congelatore alla temperatura di -80°C.

La metodologia CTAB utilizzata permette di estrarre il DNA rapidamente e con una buona resa di estrazione sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo.

Il protocollo utilizzato viene riportato di seguito:

- prelevare 0,1 g di campione precedentemente polverizzati in azoto;
- preparare il tampone di estrazione costituito da EDTA (0.002 M), TRIS (0.1 M), NaCl (1.4 M) e CTAB (2%) (500 µl per ogni campione);
- aggiungere al tampone DTT (50 µl/ml di tampone);
- incubare a 65°C per 5 min;
- aggiungere 500 µl di buffer a ciascun campione;
- agitare vigorosamente;
- incubare a 65°C per 3 min e successivamente lasciare riposare a T° ambiente per 2-3 min;
- aggiungere 500 µl di cloroformio isoamilico (24:1);
- centrifugare 12000 xg per 10 min;
- trasferire il surnatante;
- aggiungere 2/3 di isopropanolo;
- riporre a -20°C per almeno 15 min;
- per favorire ulteriormente la precipitazione del DNA riporre a 4°C per 10 min;
- centrifugare a 12000 xg per 5 min ed eliminare il surnatante;
- lavaggio in 500 µl di etanolo 70%;
- precipitazione in freezer a -20°C ;
- centrifugare 12000 xg per 7 min;
- eliminare il surnatante e seccare il pellet;
- risospingere il pellet in acqua (50-100 µl);
- aggiungere 5 ng/µl di RNasi A;
- incubare in bagno riscaldato a 37°C per 40 min;

- conservare a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Il DNA è stato quindi quantificato misurando l'assorbanza a 260 nm con uno spettrofotometro (Spectrophotometer Uvikon 930, Kontron Instruments Inc., Boston, MA, USA). Il rapporto  $R = \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  rappresenta un indice di purezza (qualità) del DNA. Infatti, mentre la lettura dell'assorbanza a 260 nm ci permette di rilevare e quantificare gli acidi nucleici, la lettura dell'assorbanza a 280 nm ci permette di valutare le impurezze (soprattutto proteine). Un valore di R compreso tra 1.8 e 2 indica un buon grado di purezza del DNA. In questo studio, e per i marcatori utilizzati, è stato considerato accettabile un valore di R compreso tra 1.6 e 2. La qualità del DNA è stata valutata inizialmente mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1% in TAE 1X in presenza di 0,5  $\mu\text{l}/\text{ml}$  di bromuro di etidio (Fig. 9), in modo da essere certi di aver eliminato tutto l'RNA ed avere un DNA non degradato. Solo dopo il test su gel si è passati alla quantificazione allo spettrofotometro. Quantificato il DNA gli estratti sono stati diluiti in tampone TEA, portando la concentrazione del DNA di ogni campione a 20 ng/ $\mu\text{l}$ , e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

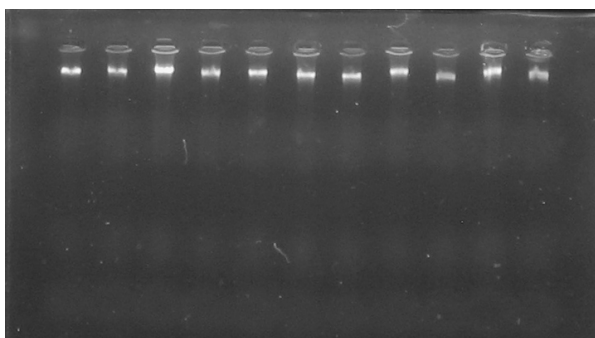


Fig. 9 Verifica dell'integrità del DNA di alcune accessioni di castagno su gel di agarosio all' 1%

### 3. Analisi SSR

Per l'amplificazione del DNA sono state usate 8 coppie di primer SSR già utilizzate in letteratura. I microsatelliti utilizzati CsCAT2, CsCAT4, CsCAT5 e CsCAT15 (Marinoni *et al.*, 2003), EMCs2, EMCs4, EMCs13 e EMCs17 (Buck *et al.*, 2003) hanno mostrato una buona capacità discriminante (Tab. 6).

La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume di 25  $\mu\text{l}$  contenente: 1x Tampone di Reazione (International PBI, Milano, IT), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  (International PBI, Milano, IT), 0.2 mM dNTPs (Amersham Biosciences), 0.2  $\mu\text{M}$  primer (MWG Biotech, Ebersberg), 20 ng DNA genomico e 0.6 U di Taq polimerasi (International PBI, Milano, IT).

La reazione di amplificazione è stata poi ottimizzata in thermal cycler MJ PCT 100 Research (Watertown, Mass.), programmando un primo passaggio a  $95^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti seguito da 30 cicli di 45 secondi a  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 secondi alla temperatura di annealing specifica per ogni coppia di primer, 45 secondi a  $72^{\circ}\text{C}$  rispettivamente per la denaturazione, l'annealing e l'estensione del primer ed infine al termine

dei cicli sono stati effettuati 8 minuti di incubazione a 72°C. Le temperature di annealing di tutti i primer sono state verificate attraverso PCR a gradiente.

Primer	For 5'→3'	Rev 5'→3'	Size	T (°C) (annealing)
CsCAT2	GTAACCTGAAGCAGTGTGAAC	CGCATCATAGTGAGTGACAG	206	55
CsCAT4	CGCATCATAGTGAGTGACAG	CTCATCTTTGTAGGGTATAATACC	243	55
CsCAT5	CATTTTCTCATTTGTGGCTGC	CACTTGCACATCCAATTAGG	242	55
CsCAT15	TTCTGCGACCTCGAAACCGA	GCTAGGGTTTTCATTTCTAG	136	50
EMCs2	GCTGATATGGCAATGCTTTTCCTC	GCCCTCCAGCCTCACCTTCATCAG	172-178	55
EMCs4	CGCCGAACACCGACCTC	GCCAAAACGACACCCAATCC	170-179	65
EMCs13	TAGTCGGAGTACGGGCACAG	TGATATGAGCATTTGACTTTGATT	158-178	55
EMCs17	CGCCACGATTAGTCTATTTCA	GAGGTAGGGTCTTCTTCGGTCAC	210-222	55

Tab. 6 Elenco degli oligonucleotidi utilizzati e delle rispettive temperature di annealing (Marinoni, Buck et al., 2003)

I primer utilizzati nell'analisi SSR sono marcati con fluorofori: alcuni primer vengono marcati con fluorofori ad emissione di luce blu (CY5), altri con fluorofori ad emissione di luce verde (IRD700); la scelta di utilizzare due marcatori dipende dalla possibilità che dà questa opzione di analizzare contemporaneamente al sequenziatore due prodotti di amplificazione ottenuti con primer diversi (analisi multiplex). I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante sequenziatore CEQ 2000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Inc.) su gel di acrilamide CEQ Separation Gel LPA-1 (Beckman Coulter, Inc.). I profili di corsa sono stati analizzati per confronto con un marker CEQ DNA Size Standard kit 400 (Beckman Coulter, Inc.). In Fig. 10 vengono riportati due esempi di ferogrammi: il primo è stato ottenuto dall'amplificazione di un primer marcato con fluoroforo IRD700 mentre il secondo è stato ottenuto dall'amplificazione di un primer marcato con fluoroforo CY5.

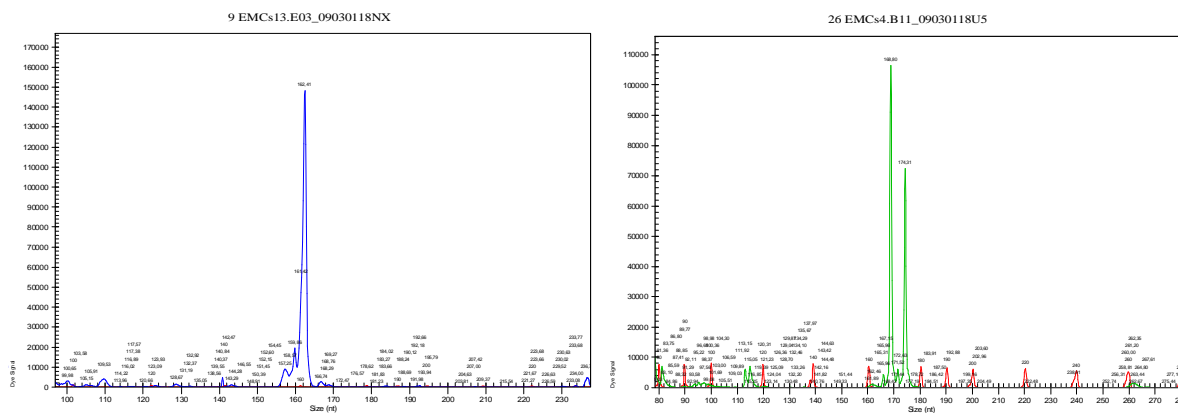


Fig. 10 Ferogrammi di due cultivar di castagno dopo amplificazione e lettura al sequenziatore con due diversi primer marcati con fluorofori differenti: a sinistra il primer EMCs13, a destra il primer EMCs4.

#### 4. *Analisi dei dati SSR*

*Sizing degli alleli:* la capacità discriminante dei microsattelliti è legata alle variazioni di dimensioni degli alleli o dei frammenti analizzati; tali dimensioni vengono espresse come numero di paia di basi (bp, base pair). Qualsiasi metodo di analisi soffre di un errore sperimentale che riduce più o meno la precisione della stima dei frammenti. L'errore sperimentale somma una serie di fattori di disturbo: la matrice usata per l'elettroforesi, il tipo e la composizione in basi degli standard di riferimento usati per la stima delle dimensioni degli alleli o dei frammenti, presenza nel DNA templatato di composti che interferiscono con la PCR o con la velocità di migrazione dei prodotti di PCR nella matrice usata per l'elettroforesi, errori della polimerasi (slippage, aggiunta di +A ecc.).

Per evitare questi errori è necessaria molta attenzione nella lettura dei dati. E' necessario, inoltre, ricorrere alla tecnica del binning. I valori rilevati non vengono presi in assoluto ma vengono attribuiti a intervalli (bins), la cui larghezza varia in funzione del tipo di microsatellite (di-nucleotidico, tri-nucleotidico ecc.), dall'intervallo delle bande di stuttering tipiche ad esempio degli SSR di-nucleotidici, della comparsa sistematica di bande +1 bp rispetto alla banda attesa, dovute all'aggiunta da parte della polimerasi di una A ai prodotti di amplificazione ecc. Il binning permette di fare una lettura "conservativa" dei risultati, che comporta da una parte una perdita di informazione (es. alleli con differenze di 1 bp non vengono generalmente considerati diversi tra loro) ma evita dall'altra i falsi positivi, cioè differenze legate all'errore del metodo di analisi e stima delle dimensioni. Nella popolazione in studio è stato usato il software R (R Development Core Team, 2005) per l'analisi dei binning.

*Elaborazione dei dati:* la biodiversità della popolazione in studio è valutata in base al numero di alleli per locus all'interno della popolazione, alla frequenza allelica e alla percentuale di eterozigosi (H), sia osservata ( $H_0$ ) che attesa ( $H_E$ ). In particolare, il valore dell'eterozigosi attesa ( $H_E$ ), in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg, è una misura per valutare la variabilità genetica di una popolazione, cioè la probabilità che, estraendo casualmente due alleli dalla popolazione, questi siano differenti.

Tali valori sono ottenuti utilizzando il software Identity 1.0 (Wagner e Sefc, 1999).

Il livello di similarità tra le cv in esame è ottenuto attraverso la matrice di similarità genetica utilizzando distanze euclidee.

L'analisi dei cluster e la costruzione del dendrogramma relativo alle distanze genetiche sono stati ottenuti mediante il metodo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method) mediante software Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., 2007).



## IV MATERIALI E METODI

### *Caratterizzazione chimica degli sfarinati*

#### *1. Origine del materiale*

Tra le 30 cultivar (Tab. 7) identificate grazie alle analisi molecolari ne sono state individuate 10 storicamente presenti sul territorio e maggiormente ivi diffuse. Da queste, nel periodo di maturazione dei frutti, sono stati prelevati circa 5 Kg di castagne per ciascuna cultivar da cui sono state ricavate le farine attraverso il processo di essiccazione tradizionale della durata di un mese (in un metato).

<b>Cultivar</b>	<b>Altitudine</b>	<b>Ubicazione</b>
<b>Luetta</b>	720-730 m.s.l.m.	Valle del Gotra, Albareto, loc.Folta
<b>Leccardina</b>	720-730 m.s.l.m.	Valle del Gotra, Albareto, loc.Folta
<b>Mondadi</b>	720-730 m.s.l.m.	Valle del Gotra, Albareto, loc.Folta
<b>Luetta</b>	680 m.s.l.m.	Valle del Ceno, Bedonia, Loc.Carniglia
<b>Preila</b>	680 m.s.l.m.	Valle del Ceno, Bedonia, Loc.Carniglia
<b>Lusetta</b>	680 m.s.l.m.	Valle del Ceno, Bedonia, Loc.Carniglia
<b>Massese</b>	625 m.s.l.m.	Valle del Ceno, Bardi, Loc. Castagneto di Gravago
<b>Gursona</b>	644 m.s.l.m.	Valle del Manubiola, Berceto Loc. Corchia
<b>Ampollana</b>	644 m.s.l.m.	Valle del Manubiola, Berceto Loc. Corchia
<b>Perticaccia</b>	644 m.s.l.m.	Valle del Manubiola, Berceto Loc. Corchia

*Tab. 7 – Elenco delle cv di castagno in analisi e loro localizzazione geografica.*

I metati (Fig.11) sono tipiche strutture in sasso a due piani, tutt'ora presenti all'interno nei castagneti dell'Appennino dove avveniva il processo di essiccazione delle castagne. Questi piccoli edifici erano dotati normalmente di due finestrelle che fungevano da prese d'aria ed allo stesso tempo permettevano di introdurre i frutti al piano superiore costituito da cannicci. Al piano terra si trovava il fuoco alimentato con legna di castagno e coperto con i ricci in modo tale che questo bruciasse lentamente e producesse fumo. Le castagne permanevano nel metato per una durata di un mese durante il quale venivano periodicamente rigirate affinché l'essiccazione fosse omogenea.

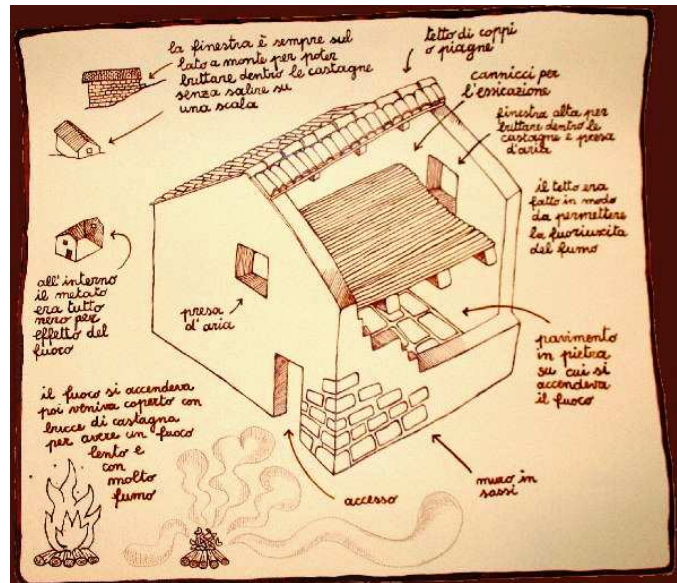


Fig. 11 Metato

Nel processo tradizionale la sgusciatura o “battitura” o “pistadura” è la fase che segue l’essiccazione e che permette di separare la buccia e l’episperma dall’endocarpo carnoso.

In mezzo all’*aia* veniva sistemato un ceppo di castagno con la parte superiore piana e poggiante a terra con tre piedi ricavati dal pieno oppure riportati mediante robuste chiodature. Le castagne ancora calde, venivano messe con la pala di legno in un sacco di canapa di forma stretta e lunga e riempiti per circa i due terzi. I “pistadori”, in numero di tre o quattro alla volta si disponevano intorno al ceppo e battevano in rapida successione e con ritmo cadenzato per una decina di volte i sacchetti sulla superficie piana del ceppo battendoli una volta da una parte e una volta dall’altra.

La fase successiva era la “ventilazione”, un operazione che veniva effettuata per eliminare dalle castagne secche “gusson” le residue parti di buccia e le sottili pellicole “scrufla” rimaste attaccate.

Via via che le castagne erano state battute, passavano alle donne le quali, in luoghi ventilati, procedevano alla ventilazione con il “capisteo”. Gli strumenti impiegati erano generalmente un vaglio di vimini di legno di faggio “*val*”. Due e tre palate di castagne secche venivano messe in questi contenitori e quindi “*valate*” facendole saltellare con rapidi movimenti dal basso verso l’alto, alla fine del processo venivano stoccate in contenitori di legno chiamate “*mine*” con capacità di circa 22 kg (Fig. 12).



Fig. 12 “*val*” per la “ventilazione” con “*mine*”

Attraverso la cernita si separano le castagne sane da quelle non adatte alla molitura: frutti bruciati, anneriti, attaccati da parassiti, con porzioni di episperma ancora attaccate all'endocarpo, frantumate durante la lavorazione (che conferirebbero alla farina una tonalità più scura e meno dolce, e rendendola quindi di seconda scelta). Le castagne vengono passate nella "bagna", che è un mezzo tronco d'albero tagliato longitudinalmente e svuotato internamente, della lunghezza di circa due metri, oppure su un'intelaiatura in legno che sostiene una rete a maglie sottili, per fare in modo che cadano le piccole porzioni di frutto, accelerando l'operazione (Fig. 13)

In entrambi i casi vengono le castagne secche vengono sistemate su appositi sostegni leggermente inclinate ed i cernitori fanno scorrere le castagne velocemente con le mani per individuare quelle sane da quelle di scarto, che vengono poi utilizzate come cibo, di alto valore nutrizionale, per gli animali.

La molitura è la fase finale che chiude il ciclo delle castagne da farina, importante e delicata come gli altri passaggi. Le castagne campionate sono state infine sottoposte a macinazione presso l'Istituto di cerealicoltura di Fiorenzuola utilizzando un mulino per cereali.

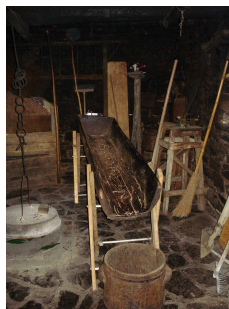


Fig. 13 "bagna"

## 2. Caratterizzazione chimica delle farine

### 2.1 Umidità

L'umidità è stata determinata con metodo gravimetrico (AOAC 1990): 1g di campione è stato posto in stufa a 110°C per 12 ore e la determinazione del contenuto di acqua si è ottenuta per differenza tra la pesata iniziale e la pesata finale.

### 2.2 Analisi della frazione lipidica

L'estrazione e la determinazione della frazione grassa è stata condotta in accordo con il metodo AOAC (1990) utilizzando un apparato Soxhlet con etere dietilico come solvente di estrazione.

Sono stati utilizzati 5g di campione e la determinazione è avvenuta in 3 fasi:

- Fase di estrazione, di durata di 30 minuti, nella quale il solvente a contatto con il campione estrae la frazione grassa;

- Fase di lavaggio, di durata di 30 minuti, in cui il campione è appunto lavato con il solvente puro proveniente dal condensatore;

- Fase di recupero del solvente, di durata di 10 minuti, nella quale il solvente viene allontanato.

Al termine dell'ultima fase si ottiene la frazione grassa, che viene quindi pesata e risospesa in 1 ml esano.

La percentuale di grasso nel campione è stata calcolata seguendo la seguente formula:

### *2.3 Determinazione del profilo in acidi grassi*

Il profilo in acidi grassi è stato determinato in accordo al regolamento europeo 2568/91 tramite conversione degli acidi grassi in esteri metilici. La conversione è avvenuta aggiungendo 1 ml di KOH/CH<sub>3</sub>OH, una base forte in grado di rompere i legami tra il glicerolo e gli acidi grassi, a 4 ml di esano contenente il grasso precedentemente estratto con il metodo Soxhlet. I metil esteri così ottenuti sono stati determinati usando un sistema gas-cromatografico Hewlett Packard 5890 (GMI Inc., Minneapolis, USA) equipaggiato con spettrometria di massa Hewlett Packard 5971 a singolo quadrupolo con una sorgente ESI (GMI Inc., Minneapolis, USA).

#### *Condizioni cromatografiche:*

- colonna Carbowax;
- volume di iniezione 1 µl;
- il gradiente di eluizione è stato condotto utilizzando He come gas carrier: temperature iniziale 30°C fino al 3° minuto, dal 3° al 16° gradiente lineare di temperatura fino a 210°C, dal 16° al 21° minuto temperatura costante di 210°C fino al termine dell'analisi (tempo di analisi totale 21 minuti);
- Temperatura di iniezione 220°C;
- Rivelazione con analizzatore di massa utilizzando la modalità full scan da 50 a 500.

### *2.4 Analisi della frazione proteica*

La frazione proteica delle farine di castagne è stata determinata utilizzando il metodo Kjeldahl. Il metodo prevede una prima fase di mineralizzazione della matrice organica a 420°C (il campione utilizzato è rappresentato dalla matrice sgrassata precedentemente con il metodo Soxhlet), in presenza di Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (antischiomogeno e con funzione di innalzamento della temperatura di ebollizione della soluzione), una pastiglia di selenio come catalizzatore, una punta di spatola di ossido rameoso indicatore della fine del processo di mineralizzazione, 7ml di acido solforico al 96% e 10 ml di acido fosfosolforico. Durante il processo di mineralizzazione si ha la disgregazione della matrice organica: dall'azoto proteico si sviluppa ammoniaca che viene separata durante la seconda fase di distillazione e

raccolta in presenza di acido bórico al 4% in eccesso e di due indicatori, rosso di metilene e verde di bromocresolo. La terza ed ultima fare prevede la titolazione della soluzione con HCl 0,1 N, con il viraggio dal verde, dovuto alla presenza del tampone borato, a rosa dovuto alla riduzione del pH.

La percentuale di azoto è stata ricavata utilizzando la seguente formula:

$$\% \text{ N} = \frac{14,007 \times \text{ml HCl} \times M_{\text{HCl}} \times 100}{\text{peso del campione (g)} \times 100}$$

Il contenuto proteico è stato calcolato utilizzando 5,3 come fattore di conversione, in accordo con quanto riportato da McCarty & Meredith, 1988.

## *2.5 Profilo degli amminoacidi liberi*

### Estrazione

Gli amminoacidi liberi sono stati ottenuti pesando 0,2 g di campione precedentemente sgrassato con etere dietilico. Il campione è stato posto per 20 minuti su agitatore magnetico in una soluzione di estrazione composta da 5ml di acqua bidistillata, 750 microlitri di acido trifluoroacetico (TFA) e 50 microlitri di D,L-normal leucina 50mM come standard interno. L'estratto è stato centrifugato a 4°C, 3500 rpm per 20 minuti, filtrato con filtro Büchner, tirato a secco tramite SPEEDVAC (Tmax 30°C) e ripreso con 1ml di acqua bidistillata.

### Purificazione dell'estratto

Gli amminoacidi sono stati recuperati tramite l'utilizzo di una estrazione su fase solida (SPE) posta su sistema "SUPELCO VISIPREP". Il sistema è un vacuometro che permette il veloce passaggio della fase mobile attraverso la fase stazionaria grazie al vuoto, utilizzando come fase stazionaria una resina (Amberlite GC 120) a scambio cationico forte di tipo solforico.

La colonna è stata condizionata con 11 mL di HCl 2N, successivamente portata a neutralità con acqua bidistillata e quindi vi è stato caricato il campione dopo che anch'esso era stato portato a pH neutro. Il campione è stato fatto percolare in colonna alla velocità di 1 ml al minuto, in modo che gli amminoacidi venissero trattenuti dalla resina; si è quindi lavata la resina con acqua bidistillata (l'eluato contenente zuccheri è stato scartato, come ulteriore conferma si è effettuata una prova con ninidrina). Gli amminoacidi sono stati eluiti prima con 6 mL di HCl 2N e poi con 2mL di HCl 6N recuperando l'eluato, successivamente il campione è stato tirato a secco tramite sistema SPEEDVAC (Tmax 30°C) e ripreso con 1 ml di acqua bidistillata.

### Derivatizzazione ed analisi HPLC-FLD

Dall'estratto amminoacidico sono stati prelevati 10 µl di campione e posti in una soluzione contenente 70 µl di tampone borato e 20 µl di derivatizzante. Dopo agitazione al vortex, il campione è stato posto a reagire in bagnetto termostato a 55°C per 10 minuti. Il campione derivatizzato è stato diluito con 100 µl di H<sub>2</sub>O bi distillato, trasferito in vial ed analizzato nel sistema HPLC-FLD.

Condizione cromatografiche:

Flusso. 1 ml/min

Colonna: WATERS AccQ-Tag C18 3,9\*150 mm

Temperatura colonna: 37°C

Eluente A: 100 ml di tampone fosfato AccQ\*Tag + 900 di acqua bidistillata secondo gradiente.

Eluente B: miscela CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O bidistillata in rapporto 60:40 (V/V) secondo gradiente

Volume di iniezione: 2 microlitri

Condizioni di rivelazione:

Assorbimento a 250 nm

Emissione a 395 nm

Gain: 1

Eufs 100

L'identificazione degli amminoacidi rilevati è stata effettuata comparando i tempi di ritenzione a quelli degli standard, mentre la quantificazione è avvenuta tramite interpolazione con la curva di calibrazione costruita per ogni amminoacido (Fig. 14) dove in ascissa sono riportati i rapporti tra la concentrazione dello standard dell'amminoacido e la concentrazione di isoleucina (std interno) e in ordinata il rapporto tra l'area del picco dello standard dell'amminoacido e l'area del picco dell'isoleucina.

## 2.6 Analisi degli zuccheri totali

### Determinazione del titolo del reattivo di Fehling

La determinazione del titolo del reattivo di Fehling è stata determinata utilizzando 593,75 mg di saccarosio in 50 ml di acqua bidistillata, a cui sono stati aggiunti 4 ml di HCl al 50%; la soluzione è stata quindi portata ad ebollizione per 20 minuti. Dopo aver raffreddato la soluzione sono state aggiunte 3 gocce dell'indicatore fenoftaleina (allo 0,1% in etanolo) e si è titolato con NaOH al 10% fino al viraggio da incolore a violetto. Si è quindi corretto il pH con acido acetico al 12% fino a scomparsa del colore ed infine si è portata la soluzione al volume finale di 50 ml. Il fattore di correzione è stato calcolato secondo la seguente formula:

$$\text{Fattore di correzione} = \frac{\text{saccarosio pesato (g)}}{0,59375 \text{ g}} \times \frac{\text{ml NaOH}}{20,4}$$

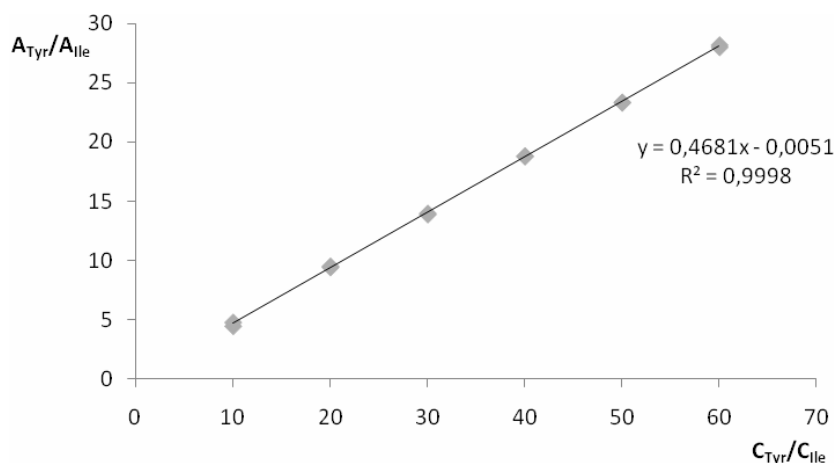


Fig. 14 – Esempio di retta di calibrazione utilizzata per quantificare l'aminoacido tirosina (Tyr).

### Quantificazione degli zuccheri totali

La determinazione degli zuccheri è stata condotta con il metodo Fehling (AOAC collection, 1990); 0,5 g di campione sono stati digeriti con 10 ml di HCl 6N per 17 minuti a 68°C. Quando la soluzione era a temperatura ambiente, sono state aggiunte 3 gocce dell'indicatore fenolftaleina allo 0,1% (in etanolo) ed è stata neutralizzata prima con NaOH al 10% fino al viraggio (colore rosa, che indica un pH prossimo alla neutralità) e poi con acido acetico al 12% fino a neutralità (soluzione incolore). La soluzione è stata filtrata con filtro Bukner e portata a volume di 150 ml. In una beuta sono stati aggiunti 5 ml di reattivo di Fehling A (69,3 g di  $CuSO_4$  in 1 L di  $H_2O$ ), 5 ml di reattivo di Fehling B (345 g di tartarato di Na e K + 100 g NaOH in 1 l di  $H_2O$ ), 10 ml di acqua bidistillata e una spatola di carborundum; una volta raggiunta l'ebollizione della soluzione sono state aggiunte 2-3 gocce dell'indicatore blu di metilene e si è titolato il reattivo di Fehling con la soluzione zuccherina fino a viraggio del colore al caratteristico rosso mattone.

La determinazione quantitativa è avvenuta tramite l'uso delle tabelle di Lane e Eynon i cui valori sono stati corretti prima con il titolo esatto del reattivo di Fehling:

$$\text{mg di zucchero in 150 ml di soluzione} = \frac{T \text{ (mg)} \times V \text{ soluzione}}{\text{ml sgocciolati}}$$

Dove T sono i mg di sostanze riducenti presenti nel volume sgocciolato

e poi con il peso del campione:

$$\% \text{ zuccheri totali} = \frac{\text{mg CHO in 150 ml di soluzione}}{\text{titolo del reattivo di Fehling}/\text{peso del campione}}$$

## 2.7 Analisi del potere antiossidante delle farine di castagne

### Estrazione degli antiossidanti

L'estrazione è stata condotta su 0,1g di farina con 5 ml di miscela metanolo/acqua (70:30) per 1 h su agitatore magnetico. La soluzione è stata quindi filtrata su filtro a pieghe, tirata a secco e ripresa con 1 ml della miscela precedentemente usata per l'estrazione.

### Preparazione della soluzione di DPPH

La soluzione di DPPH (1,1-Difenil-2-picril-idrazil) (PM 394,32 g/mol) è stata preparata ad una concentrazione di 0,2 mM in metanolo in accordo a quanto riportato da Moon et al (2009)

### Saggio del DPPH

- Preparazione bianco per analisi spettrofotometrica:
  - 200 µl di metanolo al 70% + 2,6 ml di metanolo + 2 ml di soluzione di DPPH;
  - Miscelazione vigorosa della soluzione al vortex ed analisi spettrofotometrica a 517 nm.
- Preparazione campioni per analisi allo spettrofotometro:
  - 200 µl di estratto + 2,6 ml di metanolo + 2 ml di soluzione di DPPH;
  - Miscelazione vigorosa della soluzione al vortex, incubazione al buio per 30 minuti ed analisi spettrofotometrica a 517 nm.

La % di spegnimento del DPPH è stata calcolata utilizzando l'equazione:

$$I \% = \frac{(A_{DPPH} - A_S) \times 100}{A_{DPPH}}$$

dove  $A_{DPPH}$  è l'assorbanza del bianco e  $A_S$  è l'assorbanza della soluzione di farina, entrambe a 517 nm.

La curva di calibrazione (Fig. 15) è stata costruita utilizzando il Trolox (PM 250,29).

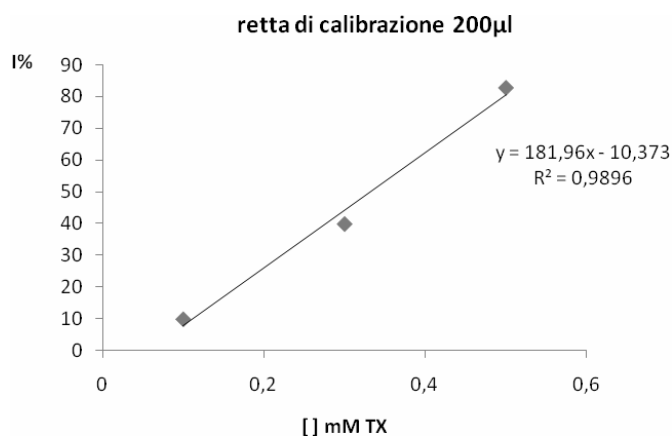


Fig. 15 - Retta di calibrazione utilizzata per quantificare il potere antiossidante delle farine.

### *3. Analisi dei dati*

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software XLSTAT (Addinsoft SARI, NY, USA). L'analisi della varianza (ANOVA) a due vie con test di Tukey è stata utilizzata per valutare l'effetto anno e l'effetto varietà sulla composizione chimica delle farine. Tutti i valori sono stati riportati utilizzando la media  $\pm$  SD (standard deviation), e per il test è stato considerato come intervallo di confidenza  $P \leq 0.05$ .

L'analisi della varianza (ANOVA) ad una via seguita da test di Tukey è stata invece utilizzata per determinare le differenze statisticamente significative ( $P \leq 0.05$ ) tra le cultivar per ogni anno di analisi.



## V MATERIALI E METODI

### *Valutazione morfologica e qualitativa di due cultivar a diverse altitudini*

#### *1. Origine del materiale*

La valutazione morfologica e qualitativa ha interessato questa volta soltanto le due cultivar Luetta e Leccardina. La notevole diffusione di queste due cultivar sul territorio ha permesso di individuare facilmente 4 piante di Luetta e 4 di Leccardina in due località dell'Appennino parmense chiamate Folta e Breda situate rispettivamente a 700 e 1000 m s.l.m. Da questi 16 individui è stato poi prelevato il materiale vegetale necessario per la compilazione di schede castanografiche e per le analisi chimico qualitative delle farine anche queste ottenute con metodo tradizionale.

#### *2. Valutazione morfologica*

Per la descrizione delle accessioni è stata utilizzata la scheda castanografica proposta da Breviglieri (1955) e ripresa da Baldini (1958), Eynard e Paglietta (1966), Fabbri *et al.* (1985), Ponchia *et al.* (1985) e Antognozzi (1986).

Questo lavoro è stato condotto secondo le seguenti fasi:

- Catalogazione dei materiali reperiti secondo la provenienza;
- Studi biometrici;
- Riproduzioni fotografiche di alberi e campioni.

Tra aprile e settembre 2008, 2009 e 2010, seguendo le fasi fenologiche delle piante, sono stati eseguiti i prelievi di materiale vegetale per la raccolta dei dati necessari alla stesura delle schede castanografiche. Per ogni individuo sono state inoltre raccolte informazioni relative alle piante e al sito di ritrovamento.

Per ogni pianta sono stati prelevati campioni di foglie in numero di 30, campioni di fiori maschili in numero di 10, campioni di fiori femminili in numero di 10, campioni di frutti in numero di 20. Tutti i campioni sono stati prelevati in modo randomizzato cercando di coprire tutti i lati della pianta. Per ogni pianta sono stati utilizzati i seguenti criteri di rilevamento:

foglie: il rilievo è stato eseguito staccando le foglie adulte dalla parte mediana di germogli esenti da problemi fitosanitari

frutto: sono stati prelevati dalla zona intermedia dei rami fruttiferi eliminando i frutti malformati o anormalmente piccoli e grossi rispetto all'insieme della popolazione presente.

I dati biometrici sono stati elaborati statisticamente mediante analisi descrittiva e della varianza. L'analisi biometrica ha permesso di ottenere una valutazione media dei caratteri morfologici delle accessioni in esame. I valori medi ottenuti sono stati poi utilizzati per la compilazione della scheda castanografica. Nella metodica di descrizione della scheda castanografica i caratteri morfologici vengono strutturati in base a descrittori “quantitativi” (grammi, centimetri...) e “qualitativi” (forme, espressioni di caratteristiche morfologiche...) (Tab. 8 e Fig. 16 e 17).

<p><b>Dati della cultivar:</b></p> <p>Nome della cultivar</p> <p>Nome dialettale della cultivar</p> <p>Zona di recupero</p> <p>Coordinate geografiche</p> <p>Uso del frutto</p>	<p><b>Caratteri dei fiori:</b></p> <p>Portamento amenti</p> <p>Numero medio amenti per germoglio</p> <p>Lunghezza media degli amenti</p> <p>Larghezza media degli amenti</p> <p>Numero medio di glomeruli per amento</p> <p>Numero medio fiori femminili per germoglio</p> <p>Diametro longitudinale fiori femminili</p> <p>Diametro trasversale fiori femminili</p> <p>Numero medio di stili per fiore femminile</p> <p>Lunghezza media degli stili del fiore femminile</p>
<p><b>Caratteri della foglia:</b></p> <p>Lunghezza media</p> <p>Larghezza media</p> <p>Lunghezza del picciolo</p> <p>Forma lembo</p> <p>Forma base lembo</p> <p>Sezione trasversale</p> <p>Incisione margine</p> <p>Simmetria</p> <p>Evidenza nervature</p>	<p><b>Caratteri della cupola o riccio:</b></p> <p>Peso</p> <p>Diametro longitudinale</p> <p>Diametro trasversale</p> <p>Lunghezza aculei</p> <p>Numero frutti</p> <p>Numero frutti vani</p> <p>Numero valve</p> <p>Consistenza aculei</p> <p><b>Caratteri del frutto (castagna):</b></p> <p>Diametro longitudinale</p> <p>Diametro trasversale</p> <p>Spessore</p> <p>Lunghezza torcia</p> <p>Numero stili della torcia</p> <p>Larghezza cicatrice ilare</p> <p>Altezza cicatrice ilare</p> <p>Peso singolo frutto con pericarpo</p> <p>Volume del frutto</p> <p>Solcatura del seme</p> <p>Descrizione cicatrice ilare</p> <p>Forma della base</p> <p>Persistenza della torcia</p> <p>Peso frutto secco</p>

Tab. 8– Caratteri utilizzati per la costituzione delle schede castano grafiche. Descrittori adottati da Breviglieri (1955) e ripresi da Baldini (1958), Eynard e Paglietta (1966), Fabbri et al. (1985), Ponchia et al. (1985) e Antognozzi (1986)

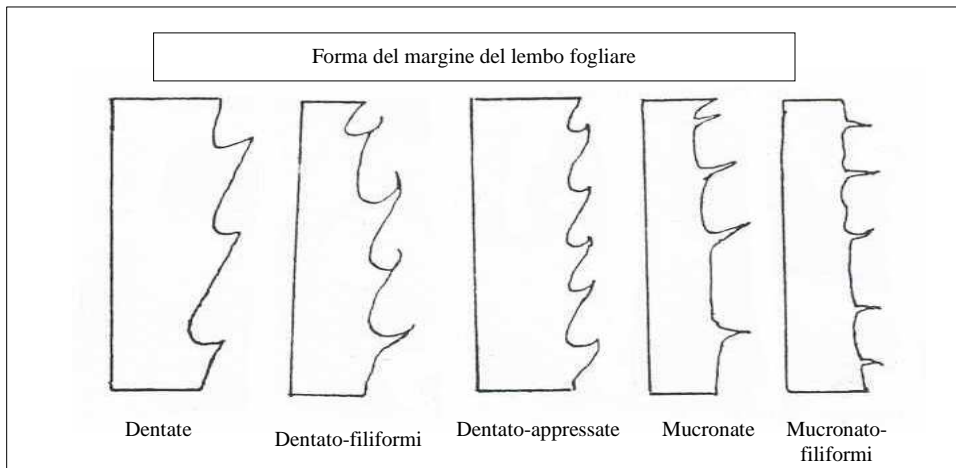
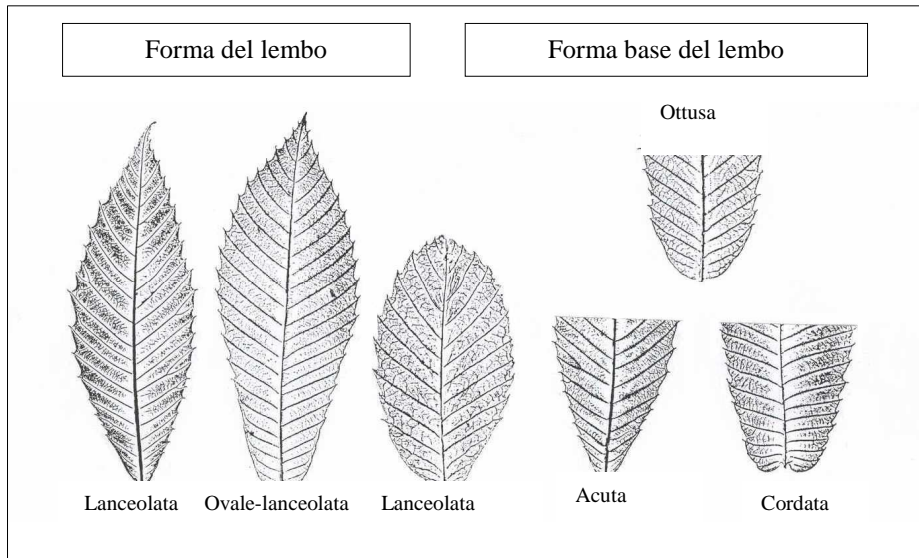


Fig. 16 Tavole descrittive: Foglie (Bellini et al. 2007)

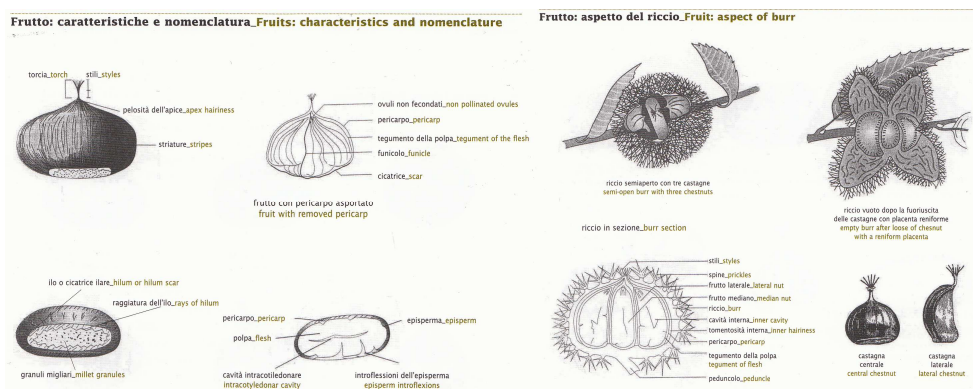


Fig. 17 Tavole descrittive: Frutti e Ricci (Bellini et al. 2007)

### 3. Valutazione chimica delle farine

Nel periodo di maturazione del frutto sono stati raccolti circa 5 Kg di castagne per ciascuna cultivar e da questi sono state ricavate le farine attraverso il processo di essiccazione tradizionale.

Il lavoro si è articolato nelle seguenti fasi:

- Determinazione dell'umidità
- Determinazione del contenuto zuccherino
- Determinazione qualitativa e quantitativa della frazione lipidica
- Determinazione della frazione proteica totale
- Determinazione qualitativa e quantitativa degli amminoacidi
- Determinazione quantitativa degli antiossidanti

Le metodologie utilizzate per le analisi sono quelle già precedentemente illustrate nella caratterizzazione chimica delle farine monovarietalì.

### 4. Analisi dei dati

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software XLSTAT (Addinsoft S.A.R.L., NY, USA). L'analisi della varianza (ANOVA) a due vie con test di Tukey è stata utilizzata per valutare l'effetto anno e l'effetto varietà sulla composizione chimica delle farine e sulle caratteristiche morfologiche delle cv in studio. Tutti i valori sono stati riportati utilizzando la media  $\pm$  SD (standard deviation), e per il test è stato considerato come intervallo di confidenza  $P \leq 0.05$ .

L'analisi della varianza (ANOVA) ad una via seguita da test di Tukey è stata invece utilizzata per determinare le differenze statisticamente significative ( $P \leq 0.05$ ) tra le cultivar per ogni anno di analisi.

#### 4.1 Test di correlazione di Mantel

I dati relativi alle due cultivar poste a differente altitudine sono stati utilizzati per verificare la correlazione tra la genetica e la composizione chimica delle farine, e quindi per individuare quelle variabili più legate al genotipo. È stata quindi effettuata un'analisi di correlazione statistica mediante Mantel test (Mantel, 1967) utilizzando il software statistico XLSTAT software (Addinsoft S.A.R.L., NY, USA). Per ogni gruppo di dati (centesimali, acidi grassi, nutrizionali, amminoacidi e genetici) sono state calcolate le matrici di distanza ottenute calcolando le distanze Euclidee. Il Mantel test è stato eseguito con 100000 permutazioni ( $\alpha=0.05$ ). Questo test è un test statistico che si propone di verificare l'esistenza di una correlazione tra due matrici di distanza; tale correlazione viene espressa come statistica

di Mantel, dove l'ipotesi nulla di non correlazione ( $H_0$ ) può essere rifiutata solo quando il valore derivato dall'analisi (p-value) è inferiore all'intervallo di confidenza (0,05). Dall'analisi si può definire anche la linearità della correlazione attraverso la valutazione del Pearson's r-value (Mantel's  $r(AB)$ ), tanto più questo valore è prossimo ad 1 tanto più la correlazione sarà lineare e quindi forte.



## VI RISULTATI E DISCUSSIONI

### *Caratterizzazione Molecolare*

La caratterizzazione molecolare del castagno è una necessità irrinunciabile se si vuole salvaguardare il ricco patrimonio genetico che nei millenni questa specie ha saputo esprimere. L'avvento dell'impiego delle tecniche di analisi del DNA alla fine degli anni '80 infatti ha notevolmente contribuito a risolvere i problemi di identificazione e riordino varietale di specie quali la *Castanea sativa* Mill. la cui coltura, per ragioni economiche e sociali, è stata quasi abbandonata. L'utilizzo dei marcatori molecolari ha infatti permesso di ovviare a quei limiti dati dalla caratterizzazione morfologica (influenza di fattori esterni che alterano il fenotipo ed tempi lunghi necessari per la raccolta dati) permettendo di confrontare solo la componente genetica ed ottenendo così risultati sicuramente più affidabili. La tecnica del "fingerprinting" consente di monitorare la variabilità genetica presente a livello del DNA attraverso l'utilizzo di uno o più marcatori che caratterizzano il genoma e ci consente quindi di distinguere genotipi diversi anche se molto simili. Tutte le specie viventi infatti sono caratterizzate dal possedere un più o meno elevato livello di variabilità genetica, che consente loro di evolvere sotto la spinta di influenze esterne, sia naturali che antropiche (Palmberg-Lerche, 1996). In questo lavoro grazie all'analisi molecolare è stato possibile mettere a confronto le diverse componenti genotipiche dei 30 individui identificati dai castanicoltori locali ed i marcatori SSR sono stati utilizzati proprio per valutare la variabilità genetica della popolazione di castagni nelle Valli del Ceno e del Taro.

Dalla letteratura ed in particolare dagli scritti di Bocchialini del 1913 sono emerse diverse corrispondenze con i nomi attribuiti alle cultivar prese in esame in questo studio, a volte con qualche piccola variazione nel nome; ritroviamo infatti Luvetta, Massese, Mondaiola, Pelladella, Ampollana, Peticaccio, Rossella, Garbella, Carpinese e Preila, mentre non vi è alcuna corrispondenza, fatta eccezione per il Marone, con l'elenco redatto da Filippo Re nel 1800.

Gli 8 oligonucleotidi appartenenti alle serie sssr CsCAT e EMCs hanno prodotto frammenti di amplificazione polimorfici e riproducibili. Il polimorfismo allelico ha permesso di discriminare i 30 individui in esame producendo un totale di 38 alleli. Il numero di alleli a ciascun locus è variato tra 2, per il marcatore EMCs13, a 11, per il marcatore CsCAT2, con un numero medio di alleli per loci indagati pari a 4,75 (Tab.9).

I valori di eterozigosità attesa ( $H_e$ ) ed osservata ( $H_o$ ), si sono mantenuti sempre maggiori di 0.5, ad eccezione dei loci EMCs13 e CsCAT4 per  $H_e$  e dei loci EMCs13 e EMCs4 per  $H_o$ , e concordano con i valori emersi sia dallo studio effettuato da Martin e collaboratori nel 2009 su cultivar spagnole sia con quelli indicati da Gobbin e collaboratori nello studio pubblicato nel 2007 sulle cultivar presenti nel sud

della Svizzera appartenenti alla specie *Castanea sativa* Mill. Questi valori evidenziano una buona variabilità genetica della popolazione in esame soprattutto se confrontati con i valori evidenziati da alcuni studi sulla variabilità genetica in *Pinus sylvestris* L. con una media di 0,24 - 0,25 sia per  $H_e$  che per  $H_o$  (Belletti *et al.* 2002). Secondo alcuni studiosi (Gregorius, 1991; Müller-Starck, 1991), al fine di definire le più opportune strategie di conservazione della biodiversità è indispensabile acquisire preliminarmente informazioni sulla struttura delle popolazioni in esame, nonché sull'entità e distribuzione della variabilità genetica presente. Tali dati rivestono anche una notevole importanza dal punto di vista applicativo: poiché elevati livelli di eterozigosi e variabilità genetica risultano strettamente correlati con l'adattabilità (e quindi con la capacità di sopravvivere in condizioni sub-ottimali), ne consegue che tanto più un bosco è geneticamente variabile, tanto migliori saranno i risultati utilizzando, in programmi di rimboschimento e ricostituzione di soprassuoli, semi prodotti dal bosco stesso.

Alle le	CsCat2		CsCat4		CsCat5		CsCat15		EMCs2		EMCs4		EMCs13		EMCs17	
	Size	f	Size	f	Size	f	Size	f	Size	f	Size	f	Size	f	Size	f
<i>a</i>	198	0,083	214	0,083	216	0,200	128	0,233	161	0,450	168	0,083	159	0,233	209	0,300
<i>b</i>	208	0,033	216	0,033	222	0,083	134	0,317	164	0,017	171	0,317	162	0,767	212	0,483
<i>c</i>	212	0,083	222	0,183	234	0,417	138	0,310	167	0,533	174	0,600			218	0,050
<i>d</i>	214	0,167	238	0,700	240	0,117	140	0,400							221	0,167
<i>e</i>	218	0,083			246	0,167	144	0,033								
<i>f</i>	224	0,117			252	0,017		0,017								
<i>g</i>	230	0,250														
<i>h</i>	232	0,100														
<i>i</i>	234	0,033														
<i>l</i>	243	0,017														
<i>m</i>	252	0,033														
<b>n</b>	11		4		6		5		3		3		2		4	
<b>H<sub>E</sub></b>	0,862		0,468		0,738		0,684		0,513		0,533		0,358		0,646	
<b>H<sub>O</sub></b>	0,967		0,600		0,833		0,667		0,500		0,467		0,467		0,633	

Tab. 9 - Dimensione degli alleli (bp) individuati nell'analisi della popolazione di cultivar di castagno, numero di alleli amplificati per locus (n), frequenza allelica (f), eterozigosi osservata ( $H_o$ ) e attesa ( $H_e$ ). Le lettere indicano gli alleli per ogni locus.

Le relazioni tra varietà sono state studiate mediante cluster analysis (UPGMA) e distanza di legame Manhattan, e attraverso l'analisi statistica è stato generato un dendrogramma da cui sono emerse delle differenze all'interno della popolazione in esame (fig. 18). Delle 30 accessioni esaminate i marcatori SSR hanno identificato 28 genotipi distinti. Tuttavia, dall'analisi del dendrogramma in figura 18 è stato possibile notare più cluster costituiti da individui che si trovano tra loro a una distanza di legame molto bassa; distanza genetica dovuta a profili allelici che differiscono per un allele (Tab. 11). Tali differenze genetiche possono essere considerate caratteristiche di una popolazione di cloni presumibilmente

differenziati per mutazioni somatiche (Cervera *et al.*, 1998) costituiti da individui che presentano o il medesimo profilo genetico o risultano vicini geneticamente in quanto differiscono per un massimo di cinque alleli (Cipriani *et al.*, 2001). Inoltre, in molti casi, la differenza tra questi individui è determinata da alleli che differiscono tra loro per poche bp (Tab. 10).

Dal sizing allelico (Tab. 10) si evince che nella popolazione in studio sono infatti presenti casi in cui si può parlare di “cloni”. A tal proposito ricordiamo che per clone intendiamo “un insieme di individui geneticamente uniformi (che può essere chimerico in natura), derivato in origine da un singolo individuo per propagazione asessuata, cioè per talea, divisione, innesto, o per apomissia obbligata” (Roselli e Scaramuzzi, 1974).

Tra le accessioni a distanza genetica bassa, evidenziate in figura 18, si possono distinguere: l'esemplare denominato “Secolare” e la varietà “Massese”, le varietà “Marrone di Vicenza” e “Marrone” ed infine, le varietà “Paiasca” e “Peladella”. Grazie a queste osservazioni è stato possibile identificare la pianta denominata “Secolare” (di denominazione locale incerta) come probabile clone della varietà “Massese” ed individuare un possibile rapporto di parentela tra la cultivar “Marrone di Vicenza” e la cultivar “Marrone”. Resta da chiarire la vicinanza genetica tra la varietà “Paiasca” e la varietà “Peladella” che potrebbe essere ricondotta a un possibile caso di sinonimia tra cloni di un medesimo genotipo; va sottolineato, tuttavia, che il limitato numero di loci indagati non ha permesso di stabilire con assoluta certezza tali relazioni.

L'analisi molecolare ha evidenziato, infine, un importante caso di omonimia tra tre accessioni denominate dai coltivatori locali come “Vignolese”; queste accessioni hanno presentato, infatti, profili genetici tra loro distinti (Fig.18) e rappresentano, quindi, genotipi differenti ai quali è stato attribuito erroneamente il medesimo nome di cultivar. Inoltre la pianta indicata come Vignolese 3 il cui profilo allelico è emerso essere il medesimo della cultivar Preila rientrerebbe così contemporaneamente in un caso di omonimi a e sinonimia.

L'incerta denominazione locale non ha permesso di identificare come cultivar “Vignolese” nessuno dei tre genotipi isolati; la loro erronea denominazione è, pertanto, riconducibile ad un probabile caso di “confusione varietale” che porta alla necessità di ulteriori indagini e confronti con altre accessioni presenti nel territorio non ancora prese in esame.

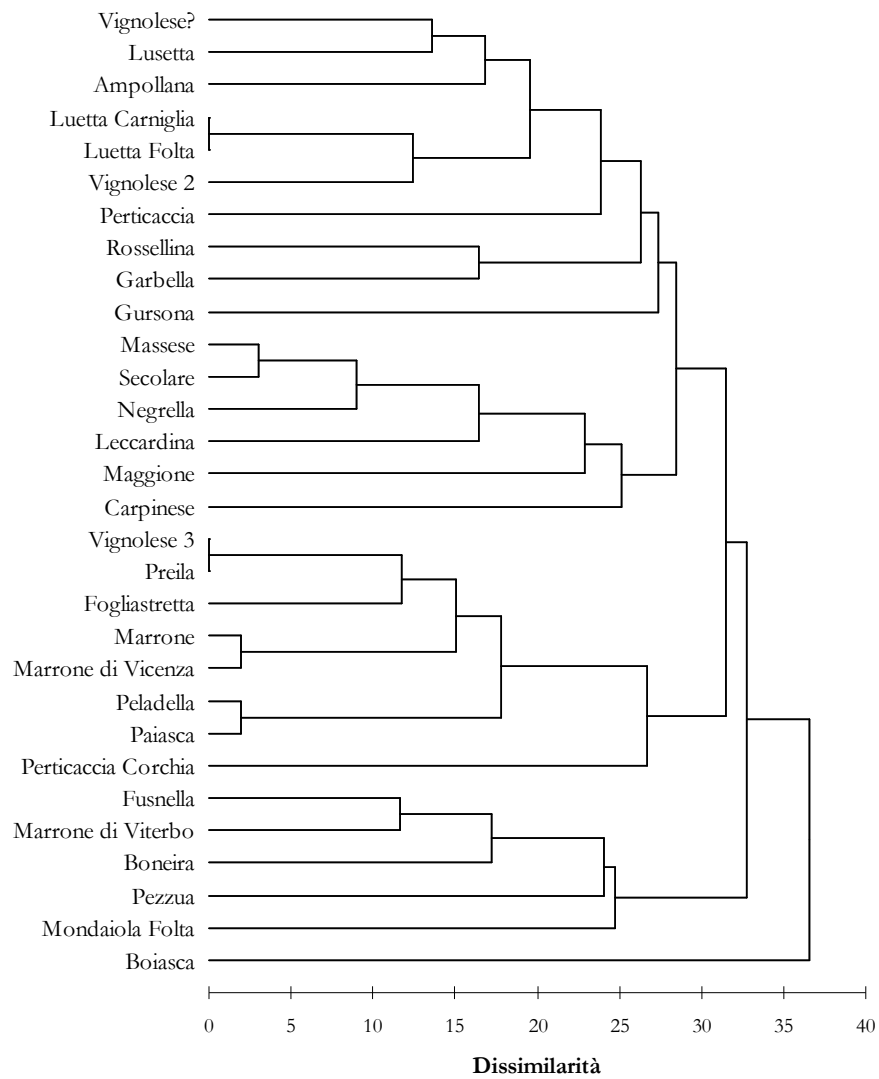


Fig. 18 Dendrogramma relativo alla cluster analysis (UPGMA) e distanza euclidea dei 30 individui analizzati con 8 coppie di primer SSR.

Tab. 10 - Sizing allelico dei genotipi delle cv derivanti dall'analisi con marcatori SSR del DNA estratto da farina e per gli otto locus indagati (CsCAT EMC)

CV	CsCAT2	CsCAT2	CsCAT4	CsCAT4	CsCAT5	CsCAT5	CsCAT15	CsCAT15	EMCs2	EMCs2	EMCs4	EMCs4	EMCs13	EMCs13	EMCs17	EMCs17
Vignolese?	214	232	238	238	234	240	134	134	161	161	168	174	162	162	209	209
Lusetta	212	230	238	238	234	246	128	138	167	167	168	174	159	162	209	212
Ampollana	212	234	238	238	234	234	138	138	167	167	171	174	162	162	212	218
Luetta Carniglia	218	230	238	238	222	234	134	134	167	167	171	171	162	162	212	212
Luetta Folta	218	230	238	238	222	234	134	134	167	167	171	171	162	162	212	212
Vignolese 2	214	232	238	238	216	234	134	134	161	161	168	174	162	162	212	209
Perticaccia	198	230	238	238	234	246	134	138	161	167	174	174	162	162	209	212
Rossellina	230	232	238	238	240	246	138	138	161	167	171	171	159	162	209	218
Garbella	224	230	238	238	234	252	128	140	161	161	171	174	159	162	212	218
Gursona	230	230	238	238	216	234	128	134	161	167	171	174	159	162	209	221
Massese	212	230	222	238	234	240	134	138	161	167	174	174	<b>159</b>	162	212	221
Secolare	212	230	222	238	234	240	134	138	161	167	174	174	<b>162</b>	162	212	221
Negrella	214	224	222	238	234	234	134	138	161	167	174	174	159	162	212	221
Leccardina	198	224	222	238	234	234	134	138	161	167	174	174	162	162	212	221
Maggione	214	243	222	238	240	246	128	140	161	161	171	174	159	162	212	221
Carpinese	214	232	222	238	246	246	128	128	167	167	171	174	159	162	209	209
Vignolese 3	214	230	214	238	216	234	134	138	161	167	168	174	162	162	209	212
Preila	214	230	214	238	216	234	134	138	161	167	168	174	162	162	209	212
Fogliastretta	218	234	214	238	222	234	128	134	161	167	171	174	162	162	212	212
Marrone	224	<b>230</b>	216	238	216	240	128	138	161	161	171	171	162	162	209	209
Marrone di Vicenza	224	<b>232</b>	216	238	216	240	128	138	161	161	171	171	162	162	209	209
Peladella	218	<b>232</b>	214	238	216	246	128	134	161	167	174	174	159	162	209	221
Paiasca	218	<b>230</b>	214	238	216	246	128	134	161	167	174	174	159	162	209	221
Perticaccia Corchia	224	252	222	238	216	234	128	138	161	167	171	174	162	162	212	221
Fusnella	198	214	222	238	222	234	138	138	167	167	171	174	159	162	212	212
Marrone di Viterbo	208	214	222	238	216	234	138	138	167	167	171	174	159	162	212	212
Boneira	208	212	222	238	222	246	138	144	161	167	174	174	159	162	212	212
Pezzua	198	230	222	238	216	234	128	138	161	164	174	174	162	162	209	212
Mondaiola	198	214	238	238	216	246	128	138	167	167	174	174	162	162	212	212
Boiasca	224	252	238	238	234	234	138	138	167	167	174	174	159	162	212	221



## VII RISULTATI E DISCUSSIONI

### *Analisi qualitativa delle farine*

I dati riportati in letteratura sulla composizione chimica della farina sono scarsi, mentre molto è stato scritto sulla composizione chimica dei frutti freschi.

La castagna fresca presenta un'umidità molto alta, più del 50% (Perreira Lorenzo *et al.*, 2006), questo, unito all'alta attività metabolica post raccolta ed alla presenza di epicarpo non lignificato, rende la castagna un frutto deperibile (Sacchetti *et al.*, 2005). La necessità di conservazione di questo alimento ha fatto sì che nei secoli si sviluppassero metodi di conservazione, tra i quali l'essiccazione e la successiva molitura, processo particolarmente utilizzato in Italia e Francia nella preparazione di tipici prodotti dolciari.

In questo studio sono state considerate 10 farine monovarietalì sulle quali sono state valutate alcune caratteristiche qualitative: analisi centesimali, percentuale in grasso, analisi di alcuni valori nutrizionali, composizione in amminoacidi e potere antiossidante totale (TEAC). I dati sono stati elaborati statisticamente per valutare sia l'influenza del fattore anno e del fattore varietà sulla composizione chimica delle farine (ANOVA a due vie e test di Tukey), sia la variabilità all'interno della popolazione in studio nel singolo anno (ANOVA e test di Tukey).

Nelle tabelle 12 e 13 è possibile valutare il fattore anno e il fattore varietà sui risultati ottenuti dalle analisi centesimali. Dalla tabella 12 si può notare che nei due anni in studio la composizione in zuccheri non varia in maniera significativa. Per quanto riguarda le altre 3 componenti si assiste ad un decremento significativo, dall'anno 2009 al 2010, della percentuale di umidità relativa e della percentuale delle proteine totali (Tab. 11). La percentuale di grasso totale invece è maggiore nel 2010 e questa differenza è significativa (Tab. 11).

<b>ANALISI CENTESIMALE</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>Pr&gt;Diff</b>
% UR	4,552 <sup>a</sup>	4,105 <sup>b</sup>	<b>0,011</b>
% CHO	77,385 <sup>a</sup>	78,458 <sup>a</sup>	<b>0,646</b>
% Grasso	3,921 <sup>b</sup>	4,523 <sup>a</sup>	<b>0,005</b>
% Proteine	4,441 <sup>a</sup>	3,869 <sup>b</sup>	<b>&lt; 0,0001</b>

Tab. 11 - Significatività relative all'analisi centesimale delle farine secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed la composizione centesimale delle farine. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

Analisi Centesimale	AMPOLLANA	GURSONA	LECCARDINA FOLTA	LUETTA CARNIGLIA	LUETTA FOLTA	LUETTA CARNIGLIA	MASSESE	MONDADI	PERTICACCIA	PREILA
% UR	3,815 <sup>c</sup>	4,177 <sup>bc</sup>	4,494 <sup>ab</sup>	4,397 <sup>ab</sup>	5,249 <sup>ab</sup>	3,978 <sup>ab</sup>	3,993 <sup>bc</sup>	5,477 <sup>a</sup>	3,641 <sup>c</sup>	4,063 <sup>bc</sup>
% CHO	68,997 <sup>a</sup>	73,523 <sup>a</sup>	83,174 <sup>a</sup>	79,804 <sup>a</sup>	80,399 <sup>a</sup>	78,831 <sup>a</sup>	77,912 <sup>a</sup>	79,163 <sup>a</sup>	79,891 <sup>a</sup>	77,521 <sup>a</sup>
% Grasso	4,640 <sup>a</sup>	3,725 <sup>a</sup>	4,869 <sup>a</sup>	3,864 <sup>a</sup>	4,797 <sup>a</sup>	3,864 <sup>a</sup>	4,344 <sup>a</sup>	4,273 <sup>a</sup>	4,245 <sup>a</sup>	3,799 <sup>a</sup>
% Proteine	4,762 <sup>ab</sup>	4,888 <sup>a</sup>	4,281 <sup>abcd</sup>	3,714 <sup>cd</sup>	4,439 <sup>abc</sup>	3,679 <sup>cd</sup>	3,578 <sup>d</sup>	3,974 <sup>bcd</sup>	4,281 <sup>abcd</sup>	4,115 <sup>abcd</sup>

*Tab. 12 - Significatività relative all'analisi centesimale delle farine secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità della composizione delle farine all'interno della popolazione (Luetta e Leccardina) alle due altitudini (fattore varietà). Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.*

In tabella 12 è possibile valutare il peso delle singole varietà sulle differenze evidenziate nei due anni in studio (Tab. 12). Analizzando complessivamente i dati dei due anni (Tab. 11) si osserva che l'umidità relativa delle farine mostra un minimo di 3,641 (Peticaccia) e un massimo di 5,477 (Mondadi); sono infatti questi due genotipi a pesare di più nella differenza significativa che si nota in tabella 13. Per quanto riguarda la percentuale di zuccheri totali e di grasso nessuna varietà pesa significativamente rispetto alle altre, quindi nel caso dell'aumento della % di grasso evidenziato nell'anno 2010 (Tab. 11) si può affermare con certezza che questo aumento è avvenuto uniformemente in tutte le cv in studio. Discorso a parte va fatto per il contenuto in proteine, infatti al decremento significativo che si ha nel 2010 concorrono la maggior parte delle varietà eccezion fatta per le cv Gursona, Ampollana, Leccardina Folta e Luetta Folta, le quali mostrano un contenuto percentuale complessivo di proteine uguale o sopra la media dell'anno 2009 (Tabb. 11 e 12).

La valutazione della variabilità all'interno di ogni anno è stata effettuata mediante ANOVA ad una via per verificare le differenze varietali sulla composizione chimica. Dall'analisi dei dati del 2009 si evince che le farine monovarietalì di castagne presentano valori di umidità compresi tra 3,24% dato emerso dall'analisi della farina ottenuta dalla cultivar Peticaccia ed il 6,07% della cv Luetta in località Folta; questi valori risultano essere inferiori a quelli ottenuti da Sacchetti e collaboratori nel 2004 per una cultivar denominata Pastinese e diffusa nel modenese, in cui l'Autore indica un'umidità relativa media per questa cv pari a 7,14%. Nell'anno successivo la percentuale di umidità relativa tende a diminuire, ma questa tendenza è cv dipendente, infatti le cultivar che presentano una forte diminuzione del contenuto di acqua sono Leccardina Folta, Luetta Folta e Mondadi (Fig. 19).

La farina di castagna risulta dunque, come prevedibile, caratterizzata da un basso contenuto in acqua.

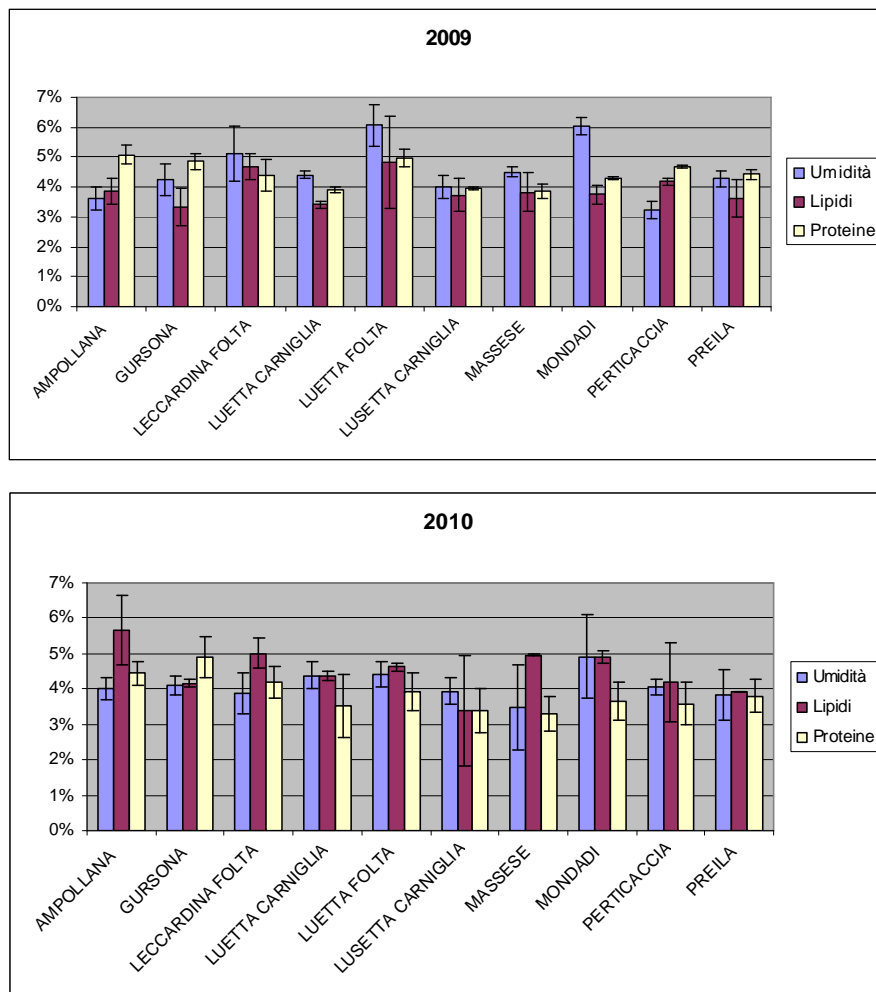


Fig.19- Analisi centesimale (Umidità, Grassi, Proteine totali) delle farine monovarietalì negli anni 2009(in alto) e 2010 (in basso). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P < 0,05$ ).

I risultati della percentuale di grasso nell'anno 2009 nelle cultivar in studio variano dal 3,3% della cultivar Gursona al 5% della cultivar Leccardina in località Folta; questi dati evidenziano una maggior percentuale di grasso rispetto ai dati presentati in letteratura sulla farina da Sacchetti e collaboratori nel 2004, corrispondenti al 3,6%, ma sono in accordo con quelli ottenuti da Neri *et al.* (2010) in uno studio condotto da su cv di castagni italiani su frutto fresco curato, dal quale emerge un contenuto in grassi che varia da un 3.27% nei marroni di Castel del Rio ad un 4.15% nei marroni di Marradi. Questi dati confermano quanto riportato da Bassi e Marangoni (1984), Salvini *et al.* (1998) e Sacchetti & Pinnavaia (2005) per quanto riguarda i castagni in Italia ma risultano superiori se confrontati con i dati riportati da Senter *et al.* (1994), De La Montaña Miguelez *et al.* (2004) e Borges *et al.* (2006), dati riferiti a varietà italiane, spagnole e portoghesi, considerazione questa che porterebbe ad ipotizzare un maggior contenuto in grassi nelle cultivar italiane. Confrontando i risultati della percentuale di grasso del 2009 e 2010, emerge un aumento significativo della frazione lipidica nel 2010 (Fig. 19) in particolare in

riferimento alle cultivar Ampollana, Massese e Mondadi. Nonostante ciò i dati ottenuti confermano il basso tenore in grassi totali nelle farine di castagna soprattutto se comparato ai valori di mandorle e nocciole (Borges *et al.*, 2007).

Il contenuto proteico di un alimento è un elemento importante per il raggiungimento di una dieta sana e bilanciata (De Vasconcellos *et al.*, 2010). In questi ultimi anni la ricerca si è orientata verso lo studio di farine alternative per lo sviluppo di nuovi prodotti privi di glutine, rivolti ai celiaci. In questo senso in Italia è stato condotto uno studio sul possibile impiego delle farine di castagna nella formulazione di snack. Tale studio (Sacchetti *et al.*, 2004) ha evidenziato alcune peculiari caratteristiche delle castagne: le globuline sono le principali proteine di riserva e il contenuto in albumine è relativamente alto (circa il 20%) inoltre è stato ricavato il contenuto proteico utilizzando un fattore moltiplicativo per l'azoto totale di 5,7 ed ottenendo un valore pari al 6,92% di proteine. Da un altro studio condotto sul possibile utilizzo della farina di castagne come ingrediente nella formulazione di pane per celiaci (Demirkesen *et al.*, 2010) è emerso un contenuto proteico del 3,80% in accordo con i valori da noi ottenuti nel 2009 che vanno dal 3,3% della Massese al 5,1% dell'Ampollana. Nell'anno 2010 il contenuto percentuale di proteine nelle farine analizzate è diminuito (Tab. 11) e tale diminuzione ha interessato tutte le cv fatta eccezione per la cv Gursona che ha mantenuto un contenuto simile nei due anni di studio (Fig.19).

La castagna può essere considerata un vero concentrato zuccherino ed amilaceo; i carboidrati totali rappresentano infatti circa l'80% del contenuto nutrizionale (Fig. 20) (dato medio ricavato dalle farine in studio), valore che risulta essere in accordo a quelli presenti in letteratura relativi però a castagne fresche (80-90%) (La Montaña *et al.* 2003). I carboidrati totali rappresentano la somma dell'amido, che nella castagna fresca è presente con un valore intorno al 71% e degli zuccheri liberi, principalmente saccarosio, fruttosio e glucosio, compresi in un intervallo tra 9,2-23% (Neri *et al.* 2010). Lo stesso Autore evidenzia un'alta variabilità del saccarosio nelle castagne curate, variabilità che imputa alle condizioni climatiche ed alle differenze genetiche tra gli ecotipi. Pinnavaia e collaboratori nel 1993 descrissero un'alta variabilità del saccarosio sia tra gli anni di raccolta sia tra i differenti cloni considerati. Dai dati delle 10 cv in studio emerge che l'andamento del contenuto zuccherino totale rimane costante nei due anni di analisi (Tab. 11), e dall'analisi ANOVA ad una via è possibile asserire che esistono differenze significative tra le cv solo nell'anno 2009, anno in cui le cv Luetta Folta e Mondadi hanno avuto la maggiore concentrazione di zuccheri rispetto alle altre cv, mentre la cv Gursona aveva il più basso contenuto di zuccheri totali (Fig. 20).

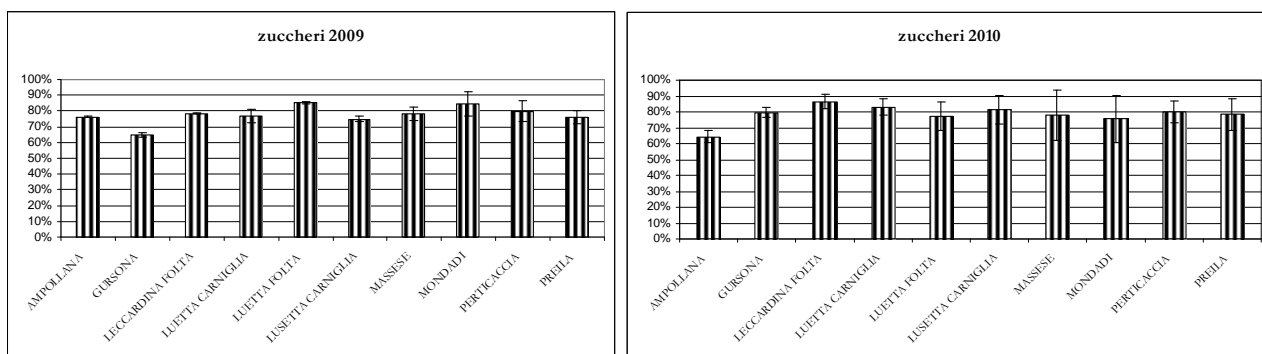


Fig.20 - Analisi centesimale del contenuto in zuccheri totali delle farine monovarietal negli anni 2009(sinistra) e 2010 (destra). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P < 0,05$ ).

Il profilo in acidi grassi risulta essere dominato dall'acido oleico, seguito dall'acido linoleico, palmitico, linolenico ed infine lo stearico. La somma dei tre maggiori acidi grassi (oleico, linoleico e palmitico) è risultata essere del 96% nel 2009 e del 97% nel 2010 (Tab. 14), un valore maggiore rispetto a quello trovato da Borges *et al.* (2007) (85%), ma simile al 90% pubblicato da Barreira *et al.* (2009); è però da sottolineare che entrambi gli studi indicati sono riferiti a castagne fresche e non a farine.

Sono presenti leggere differenze nella composizione in acidi grassi delle farine 2009 (Fig. 21), questo potrebbe essere dovuto alla stagionalità, come già evidenziato da Borges *et al.* (2007).

Nelle tabelle 13 e 14 sono riportati i dati relativi all'ANOVA a due vie; da questi dati emerge che per l'ac. Palmitico, l'acido Oleico e l'acido Linoleico non vi siano differenze significative nei tra i due anni di analisi. Dalla tabella 14 si nota che le cv che più si discostano dalla media nei due anni sono la cultivar Ampollana e la cv Gursona, la cv Perticaccia e la cv Ampollana, la cv Gursona e la cv Leccardina Folta, rispettivamente per l'ac. Palmitico, l'ac. Oleico e l'ac. Linoleico. Discorso diverso va fatto sui dati riguardo all'ac. Stearico e Linolenico che subiscono entrambi una diminuzione dall'anno 2009 al 2010 (Tab. 13); la diminuzione di questi due acidi grassi però riguarda tutte le cv come si può osservare dall'analisi dei dati riportati in tabella 14.

<b>ACIDI GRASSI</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>Pr&gt;Diff</b>
Palmitico	17,206 <sup>a</sup>	18,217 <sup>a</sup>	<b>0,065</b>
Stearico	0,635 <sup>a</sup>	0,224 <sup>b</sup>	<b>&lt; 0,0001</b>
Oleico	41,487 <sup>a</sup>	41,072 <sup>a</sup>	<b>0,515</b>
Linoleico	36,791 <sup>a</sup>	37,713 <sup>a</sup>	<b>0,098</b>
Linolenico	3,773 <sup>a</sup>	2,781 <sup>b</sup>	<b>&lt; 0,0001</b>

Tab. 13- Significatività relative all'analisi degli acidi grassi delle farine secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed la composizione in acidi grassi delle farine. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

ACIDI GRASSI	AMPOLLANA	GURSONA	LECCARDINA FOLTA	LUNETTA CARNIGLIA	LUNETTA FOLTA	LUSETTA CARNIGLIA	MASSESE	MONDADI	PERTICACCIA	PREILA
Palmitico	20,366 <sup>a</sup>	15,873 <sup>b</sup>	18,092 <sup>ab</sup>	17,746 <sup>ab</sup>	16,388 <sup>ab</sup>	18,746 <sup>ab</sup>	17,915 <sup>ab</sup>	17,898 <sup>ab</sup>	17,002 <sup>ab</sup>	17,092 <sup>ab</sup>
Stearico	0,624 <sup>a</sup>	0,407 <sup>a</sup>	0,444 <sup>a</sup>	0,409 <sup>a</sup>	0,687 <sup>a</sup>	0,471 <sup>a</sup>	0,308 <sup>a</sup>	0,440 <sup>a</sup>	0,400 <sup>a</sup>	0,467 <sup>a</sup>
Oleico	38,651 <sup>c</sup>	39,786 <sup>abc</sup>	42,108 <sup>abc</sup>	39,350 <sup>bc</sup>	41,338 <sup>abc</sup>	39,847 <sup>abc</sup>	41,652 <sup>abc</sup>	43,269 <sup>ab</sup>	44,232 <sup>a</sup>	42,563 <sup>abc</sup>
Linoleico	37,559 <sup>abc</sup>	40,042 <sup>a</sup>	34,678 <sup>c</sup>	39,301 <sup>ab</sup>	37,861 <sup>abc</sup>	37,501 <sup>abc</sup>	37,395 <sup>abc</sup>	35,883 <sup>abc</sup>	35,462 <sup>bc</sup>	36,838 <sup>abc</sup>
Linolenico	2,811 <sup>a</sup>	3,893 <sup>a</sup>	3,408 <sup>a</sup>	3,442 <sup>a</sup>	3,655 <sup>a</sup>	3,454 <sup>a</sup>	2,847 <sup>a</sup>	2,639 <sup>a</sup>	3,274 <sup>a</sup>	3,348 <sup>a</sup>

Tab. 14- Significatività relative all'analisi degli acidi grassi delle farine secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità della composizione in acidi grassi delle farine all'interno della popolazione (fattore varietà). Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

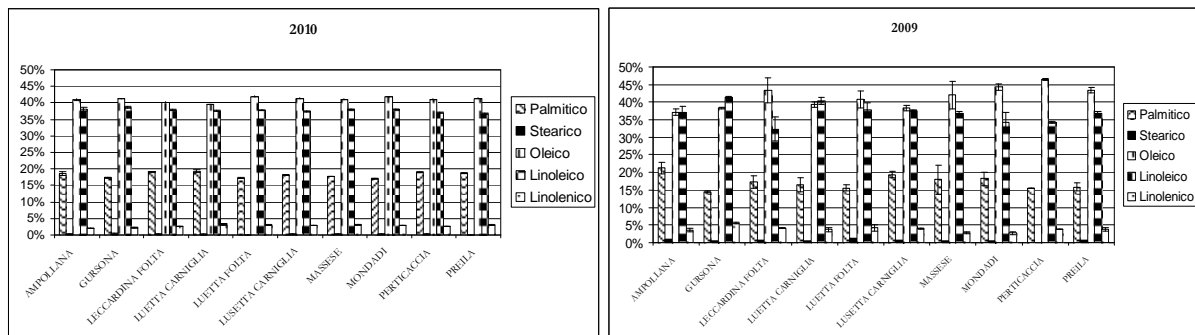


Fig. 21 – Profilo medio in acidi grassi delle farine negli anni negli anni 2009 (sinistra) e 2010 (destra). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P < 0,05$ ).

La composizione in ac. grassi saturi, monoinsaturi e poliinsaturi appare influenzata dall'anno (Tab. 17) così come avviene per quanto riguarda la variabilità all'interno della popolazione fatta eccezione per gli ac. grassi monoinsaturi che evidenziano una differenza, anche se poco significativa statisticamente, nella loro presenza all'interno della cultivar Peticaccia dove si trovano in maggiore quantità e nella Lusetta Carniglia dove si trovano in minor quantità (Tab. 18).

VALORI NUTRIZIONALI	2009	2010	Pr>Diff
SFA	17,923 <sup>a</sup>	18,441 <sup>a</sup>	<b>0,400</b>
MUFA	40,411 <sup>a</sup>	41,072 <sup>a</sup>	<b>0,609</b>
PUFA	41,666 <sup>a</sup>	40,494 <sup>a</sup>	<b>0,327</b>

Tab. 17 - Significatività relative all'analisi dei valori nutrizionali delle farine secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i valori nutrizionali delle farine. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

VALORI NUTRIZIONALI	AMPOLLANA	GURSONA	LECCARDINA FOLTA	LUETTA CARNIGLIA	LUETTA FOLTA	LUSETTA CARNIGLIA	MASSESE	MONDADI	PERTICACCIA	PREILA
SFA	20,9823 <sup>a</sup>	16,28 <sup>a</sup>	18,398 <sup>a</sup>	17,914 <sup>a</sup>	18,177 <sup>a</sup>	19,471 <sup>a</sup>	18,111 <sup>a</sup>	18,200 <sup>a</sup>	17,033 <sup>a</sup>	17,256 <sup>a</sup>
MUFA	38,759 <sup>ab</sup>	39,786 <sup>ab</sup>	42,216 <sup>ab</sup>	39,458 <sup>ab</sup>	40,418 <sup>ab</sup>	39,458 <sup>b</sup>	41,760 <sup>ab</sup>	43,377 <sup>ab</sup>	44,340 <sup>a</sup>	42,671 <sup>ab</sup>
PUFA	40,2601 <sup>a</sup>	43,935 <sup>a</sup>	39,404 <sup>a</sup>	42,633 <sup>a</sup>	41,406 <sup>a</sup>	45,914 <sup>a</sup>	40,132 <sup>a</sup>	38,412 <sup>a</sup>	38,626 <sup>a</sup>	40,076 <sup>a</sup>

Tab.17 - Significatività relative all'analisi dei valori nutrizionali delle farine secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità dei valori nutrizionali delle farine all'interno della popolazione (fattore varietà). Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

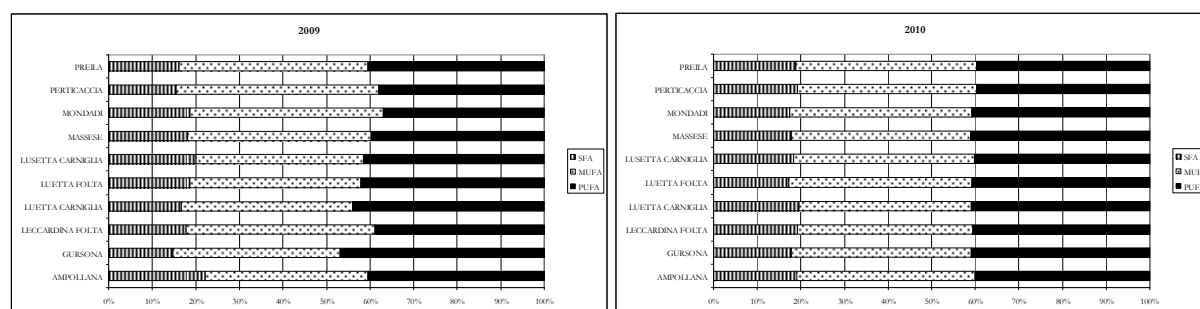


Fig. 22 – Composizione in acidi grassi saturi (SFA), moninsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA) nelle farine negli anni 2009(sinistra) e 2010 (destra). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P < 0,05$ ).

Inoltre dai dati relativi agli acidi grassi delle cv in studio è possibile ottenere un'importante indicazione dal punto di vista nutrizionale, data dal rapporto acidi grassi monoinsaturi su acidi grassi polinsaturi (MUFA/PUFA). Il valore del rapporto  $\omega_6/\omega_3$  intorno ad 1 è infatti associato alla prevenzione di malattie cardiovascolari ed ad alte malattie degenerative (Simopoulos, 2008). Le farine di castagne oggetto di studio presentano una media nel rapporto MUFA/PUFA che va da un minimo di 0,816 nel 2009 e 0,968 nel 2010 ad un massimo di 1,219 nel 2009 e 1,042 nel (Fig. 23).

Dall'analisi statistica emerge inoltre come non vi siano variazioni nel valore del rapporto MUFA/PUFA negli anni che però evidenzia un valore sempre superiore all' 1 nella Peticaccia e Mondadi che presentano quindi il maggior contenuto in ac. grassi monoinsaturi mentre la cultivar Lusetta Carniglia caratterizzata dal minor rapporto MUFA/PUFA presenta il maggior contenuto in ac. grassi polinsaturi (Tabb.19 e 20).

VALORI NUTRIZIONALI	2009	2010	Pr>Diff
MUFA/PUFA	0,995 <sup>a</sup>	1,014 <sup>a</sup>	<b>0,643</b>

Tab. 18 - Significatività relative all'analisi MUFA/PUFA delle farine secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i valori MUFA/PUFA delle farine. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

VALORI NUTRIZIONALI	AMPOLLANA	GURSONA	LECCARDINA FOLTA	LUETTA CARNIGLIA	LUETTA FOLTA	LUSETTA CARNIGLIA	MASSESE	MONDADI	PERTICACCIA	PREILA
MUFA/PUFA	0,961 <sup>ab</sup>	0,912 <sup>ab</sup>	1,071 <sup>ab</sup>	0,925 <sup>ab</sup>	0,976 <sup>ab</sup>	0,821 <sup>b</sup>	1,038 <sup>ab</sup>	1,134 <sup>a</sup>	1,147 <sup>a</sup>	1,062 <sup>ab</sup>

Tab. 20 - Significatività relative all'analisi dei valori MUFA/PUFA delle farine secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità dei valori nutrizionali MUFA/PUFA delle farine all'interno della popolazione (fattore varietà). Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

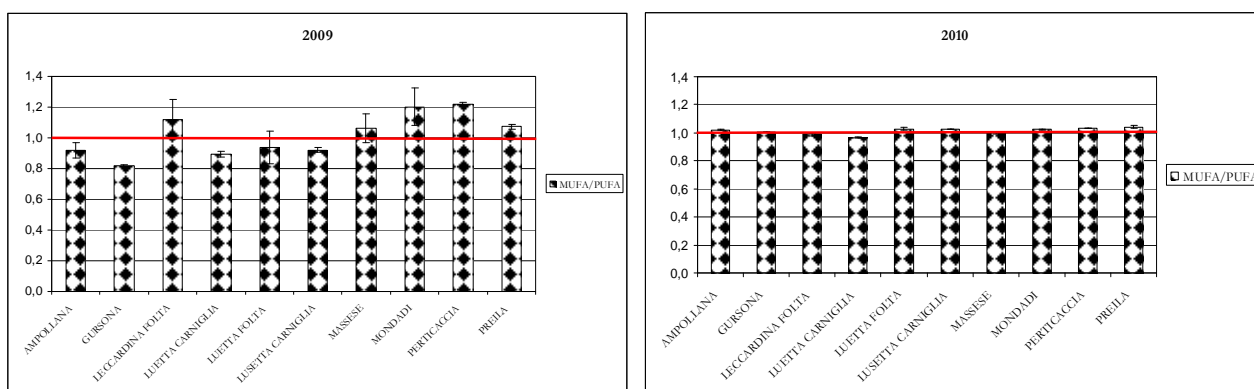


Fig. 23 – Rapporto MUFA/PUFA nella composizione nutrizionale delle farine negli anni 2009 (sinistra) e 2010 (destra). La linea rossa indica il rapporto ottimale, dal punto di vista nutrizionale, tra MUFA e PUFA.

Per quanto riguarda la composizione aminoacidica, il cui andamento risulta simile nei due anni, le analisi hanno evidenziato 16 dei 20 aminoacidi proteici, principalmente rappresentati da prolina (con una media del 6% nel 2009 e 8,9% nel 2010), serina (4,7% nel 2009 e 5,1% nel 2010) e alanina (4,5% nel 2009 e 5,1% nel 2010) (Fig. 24). Questi risultati non confermano quelli in letteratura secondo i quali il profilo aminoacidico della castagna sarebbe dominato dall'asparagina (1%), seguita dalla glucina (0,8%), da leucina ed alanina (0,6%) ed infine dall'arginina (0,5%) (Borges *et al.* 2007; Meredith *et al.* 1988). Come emerge dalla Fig. 24 la cultivar Massese presenta la maggior disponibilità in aminoacidi per entrambi gli anni di studio. La cultivar Massese insieme a Gursona e Preila rivela inoltre la maggior disponibilità in aminoacidi essenziali mentre si può osservare una singolare diminuzione del quantitativo di aminoacidi essenziali in particolare a carico di leucina e valina per la cultivar Ampollana (Fig 24).

Dall'analisi dei dati mediante ANOVA a due vie si evidenzia una generale tendenza, nei due anni ad una diminuzione del quantitativo in aminoacidi ad eccezione di arginina, leucina, lisina e valina, tre dei quali essenziali, il cui contenuto rimane invariato (Tab. 21).

Dalla stessa analisi è possibile evidenziare un differenza significativa nella composizione amminoacidica tra le cultivar che però anche in questo caso non mostra differenze dei tre amminoacidi essenziali leucina, lisina e valina.

<b>AA</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>Pr&gt;Diff</b>
Ala	4,508 <sup>b</sup>	5,096 <sup>a</sup>	<b>0,017</b>
Arg	0,466 <sup>a</sup>	0,467 <sup>a</sup>	<b>0,871</b>
Asp	1,807 <sup>a</sup>	1,586 <sup>b</sup>	<b>&lt; 0,0001</b>
Glu	1,703 <sup>a</sup>	1,571 <sup>b</sup>	<b>0,035</b>
Gly	0,180 <sup>a</sup>	0,368 <sup>b</sup>	<b>&lt; 0,0001</b>
His	0,439 <sup>a</sup>	0,263 <sup>b</sup>	<b>&lt; 0,0001</b>
Ile	0,385 <sup>a</sup>	0,310 <sup>b</sup>	<b>&lt; 0,0001</b>
Leu	0,384 <sup>a</sup>	0,302 <sup>a</sup>	<b>0,205</b>
Lys	0,057 <sup>a</sup>	0,031 <sup>a</sup>	<b>0,073</b>
Met	1,182 <sup>a</sup>	1,000 <sup>b</sup>	<b>0,000</b>
Phe	0,824 <sup>a</sup>	0,965 <sup>b</sup>	<b>&lt; 0,0001</b>
Pro	6,020 <sup>a</sup>	8,926 <sup>b</sup>	<b>0,001</b>
Ser	4,675 <sup>a</sup>	5,090 <sup>b</sup>	<b>0,002</b>
Thr	0,307 <sup>a</sup>	0,325 <sup>b</sup>	<b>0,031</b>
Tyr	0,344 <sup>a</sup>	0,274 <sup>b</sup>	<b>&lt; 0,0001</b>
Val	0,183 <sup>a</sup>	0,145 <sup>a</sup>	<b>0,426</b>
<b>Σ Aa essenziali</b>	<b>3,761<sup>a</sup></b>	<b>3,440<sup>b</sup></b>	<b>0,011</b>

Tab. 21 - Significatività relative all'analisi degli amminoacidi liberi delle farine secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i valori degli amminoacidi liberi delle farine. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

<b>AA</b>	<b>AMPELLANA</b>	<b>GURSONA</b>	<b>LECCARDINA FOLTA</b>	<b>LUETTA CARNIGLIA</b>	<b>LUETTA FOLTA</b>	<b>LUSETTA CARNIGLIA</b>	<b>MASSESE</b>	<b>MONDADI</b>	<b>PERTICACCIA</b>	<b>PREILA</b>
Ala	2,887 <sup>e</sup>	6,418 <sup>b</sup>	6,048 <sup>bc</sup>	5,010 <sup>bcd</sup>	4,128 <sup>de</sup>	4,332 <sup>cde</sup>	8,436 <sup>a</sup>	4,903 <sup>bcd</sup>	5,109 <sup>bcd</sup>	0,750 <sup>f</sup>
Arg	0,833 <sup>b</sup>	0,549 <sup>c</sup>	0,398 <sup>d</sup>	0,207 <sup>f</sup>	0,355 <sup>de</sup>	0,275 <sup>ef</sup>	0,346 <sup>de</sup>	0,257 <sup>f</sup>	0,389 <sup>d</sup>	1,053 <sup>a</sup>
Asp	1,696 <sup>cd</sup>	2,408 <sup>a</sup>	1,287 <sup>e</sup>	2,291 <sup>ab</sup>	1,533 <sup>de</sup>	2,028 <sup>b</sup>	1,979 <sup>bc</sup>	1,599 <sup>de</sup>	1,286 <sup>e</sup>	0,857 <sup>f</sup>
Glu	1,677 <sup>bcd</sup>	1,781 <sup>bc</sup>	0,955 <sup>e</sup>	1,445 <sup>cd</sup>	0,962 <sup>e</sup>	2,071 <sup>b</sup>	3,240 <sup>a</sup>	1,258 <sup>de</sup>	1,706 <sup>bcd</sup>	1,277 <sup>de</sup>
Gly	0,139 <sup>d</sup>	0,323 <sup>abc</sup>	0,432 <sup>a</sup>	0,242 <sup>bcd</sup>	0,155 <sup>d</sup>	0,335 <sup>ab</sup>	0,376 <sup>a</sup>	0,380 <sup>a</sup>	0,155 <sup>d</sup>	0,200 <sup>cd</sup>
His	0,518 <sup>ab</sup>	0,139 <sup>d</sup>	0,131 <sup>d</sup>	0,243 <sup>cd</sup>	0,381 <sup>bc</sup>	0,271 <sup>cd</sup>	0,642 <sup>a</sup>	0,133 <sup>d</sup>	0,435 <sup>abc</sup>	0,616 <sup>a</sup>
Ile	0,317 <sup>cde</sup>	0,538 <sup>a</sup>	0,325 <sup>cd</sup>	0,239 <sup>ef</sup>	0,177 <sup>f</sup>	0,350 <sup>c</sup>	0,440 <sup>b</sup>	0,300 <sup>cde</sup>	0,266 <sup>de</sup>	0,523 <sup>a</sup>
Leu	0,456 <sup>a</sup>	0,373 <sup>a</sup>	0,367 <sup>a</sup>	0,221 <sup>a</sup>	0,492 <sup>a</sup>	0,387 <sup>a</sup>	0,363 <sup>a</sup>	0,265 <sup>a</sup>	0,257 <sup>a</sup>	0,251 <sup>a</sup>
Lys	0,070 <sup>a</sup>	0,056 <sup>a</sup>	0,026 <sup>a</sup>	0,073 <sup>a</sup>	0,009 <sup>a</sup>	0,042 <sup>a</sup>	0,046 <sup>a</sup>	0,011 <sup>a</sup>	0,024 <sup>a</sup>	0,083 <sup>a</sup>
Met	1,181 <sup>bc</sup>	1,671 <sup>a</sup>	0,933 <sup>def</sup>	0,913 <sup>ef</sup>	0,817 <sup>fg</sup>	1,083 <sup>cd</sup>	1,757 <sup>a</sup>	1,043 <sup>cde</sup>	0,751 <sup>g</sup>	1,259 <sup>b</sup>
Phe	0,844 <sup>de</sup>	1,033 <sup>bc</sup>	0,857 <sup>cde</sup>	0,861 <sup>cde</sup>	0,603 <sup>f</sup>	0,872 <sup>cd</sup>	0,682 <sup>ef</sup>	0,690 <sup>ef</sup>	1,086 <sup>b</sup>	1,418 <sup>a</sup>
Pro	9,124 <sup>ab</sup>	6,846 <sup>ab</sup>	5,301 <sup>b</sup>	4,344 <sup>b</sup>	6,126 <sup>ab</sup>	9,055 <sup>ab</sup>	11,980 <sup>a</sup>	7,747 <sup>ab</sup>	8,996 <sup>ab</sup>	5,212 <sup>b</sup>
Ser	5,074 <sup>b</sup>	4,257 <sup>bc</sup>	4,389 <sup>bc</sup>	5,039 <sup>b</sup>	6,308 <sup>a</sup>	3,624 <sup>c</sup>	6,146 <sup>a</sup>	4,747 <sup>b</sup>	4,228 <sup>bc</sup>	5,013 <sup>b</sup>
Thr	0,253 <sup>de</sup>	0,468 <sup>a</sup>	0,346 <sup>bc</sup>	0,241 <sup>c</sup>	0,205 <sup>e</sup>	0,305 <sup>cd</sup>	0,451 <sup>a</sup>	0,300 <sup>cde</sup>	0,211 <sup>c</sup>	0,378 <sup>b</sup>
Tyr	0,207 <sup>de</sup>	0,423 <sup>b</sup>	0,304 <sup>cd</sup>	0,216 <sup>de</sup>	0,348 <sup>bc</sup>	0,236 <sup>cde</sup>	0,177 <sup>e</sup>	0,301 <sup>cd</sup>	0,219 <sup>de</sup>	0,661 <sup>a</sup>
Val	0,338 <sup>a</sup>	0,190 <sup>a</sup>	0,142 <sup>a</sup>	0,062 <sup>a</sup>	0,203 <sup>a</sup>	0,055 <sup>a</sup>	0,231 <sup>a</sup>	0,079 <sup>a</sup>	0,113 <sup>a</sup>	0,225 <sup>a</sup>
<b>Aa essenziali</b>	<b>3,977<sup>ab</sup></b>	<b>4,467<sup>a</sup></b>	<b>3,127<sup>bc</sup></b>	<b>2,852<sup>c</sup></b>	<b>2,887<sup>c</sup></b>	<b>3,365<sup>bc</sup></b>	<b>4,611<sup>a</sup></b>	<b>2,821<sup>c</sup></b>	<b>3,143<sup>bc</sup></b>	<b>4,753<sup>a</sup></b>

Tab. 22 - Significatività relative all'analisi dei valori degli amminoacidi liberi delle farine secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità degli amminoacidi liberi delle farine all'interno della popolazione (fattore varietà). Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

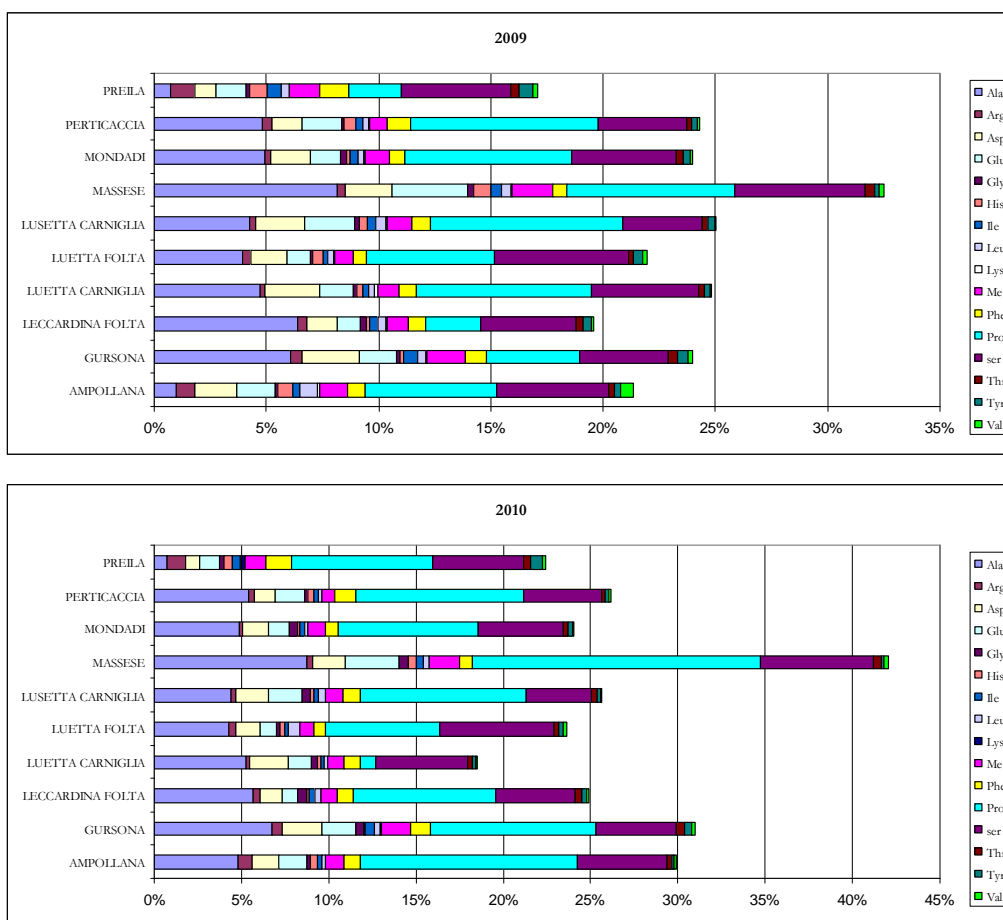


Fig. 24 – Profilo amminoacidico percentuale delle farine negli anni 2009(sopra) e 2010 (sotto). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P < 0,05$ ).

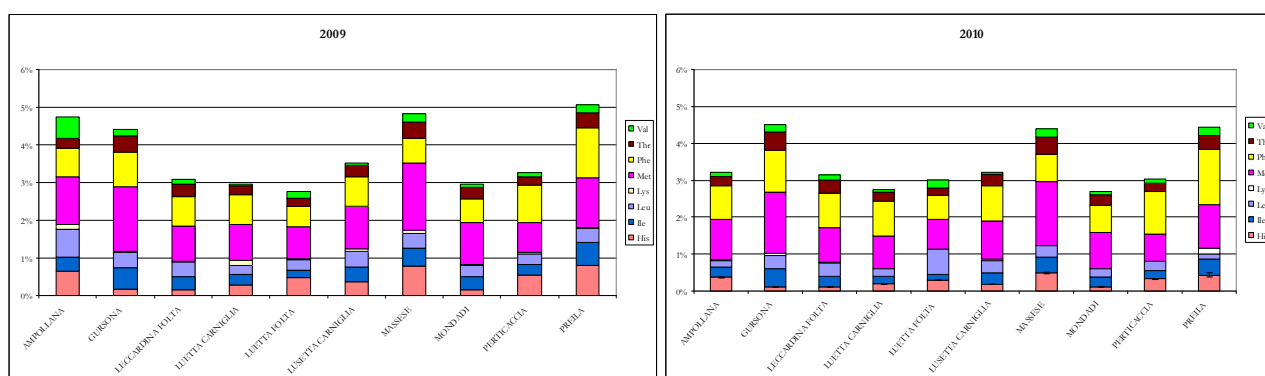


Fig. 25 – Profilo in amminoacidi essenziali delle farine negli anni 2009 (sinistra) e 2010 (destra). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P < 0,05$ ).

Dalla valutazione del potere antiossidante rilevato in mEq di TEAC (*Trolox* Equivalence Antioxidant Capacity) e dovuto in gran parte alla presenza dei polifenoli risulta un valore medio di 4,8 mEq nel 2009 e 3,1 mEq nel 2010.

I valori ottenuti risultano confrontabili con quelli indicati in letteratura da Neri e collaboratori nel 2010 in uno studio su castagne fresche ed in linea con quelli presenti in uno studio condotto da Pellegrini *et*

al. (2003) su altri frutti. I valori riportati da neri sono infatti compresi in un intervallo tra 2,03 e 3,11 mEq. Altri studi sono presenti in letteratura, tuttavia in questi viene valutata solo la frazione polifenolica espressa come GAE (Gallic Acid Equivalents), mentre in questo studio le analisi sono state volte alla valutazione del potere antiossidante totale.

Le analisi statistiche mostrano un significativo calo del potere antiossidante dal 2009 al 2010 (Tab. 23) mentre dall'osservazione della popolazione in studio emerge un significativa e maggiore capacità antiossidante della cultivar Massese ed un minor potere antiossidante per la Luetta Carniglia (Tab. 24).

<b>VALORI NUTRIZIONALI</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>Pr&gt;Diff</b>
TEAC	4,795 <sup>a</sup>	3,137 <sup>b</sup>	< 0,0001

Tab. 23 - Significatività relative all'analisi della capacità antiossidante delle farine secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i valori della capacità antiossidante delle farine. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

<b>VALORI NUTRIZIONALI</b>	<b>AMPOLLANA</b>	<b>GURSONA</b>	<b>LECCARDINA FOLIA</b>	<b>LUETTA CARNIGLIA</b>	<b>LUETTA FOLIA</b>	<b>LUSETTA CARNIGLIA</b>	<b>MASSESE</b>	<b>MONDADI</b>	<b>PERTICACCIA</b>	<b>PREILA</b>
TEAC	4,042 <sup>abc</sup>	4,171 <sup>abc</sup>	3,556 <sup>abc</sup>	2,957 <sup>c</sup>	3,047 <sup>c</sup>	5,149 <sup>ab</sup>	5,473 <sup>a</sup>	3,399 <sup>bc</sup>	4,259 <sup>abc</sup>	3,607 <sup>abc</sup>

Tab. 24 - Significatività relative all'analisi della capacità antiossidante delle farine secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità della capacità antiossidante delle farine all'interno della popolazione (fattore varietà). Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

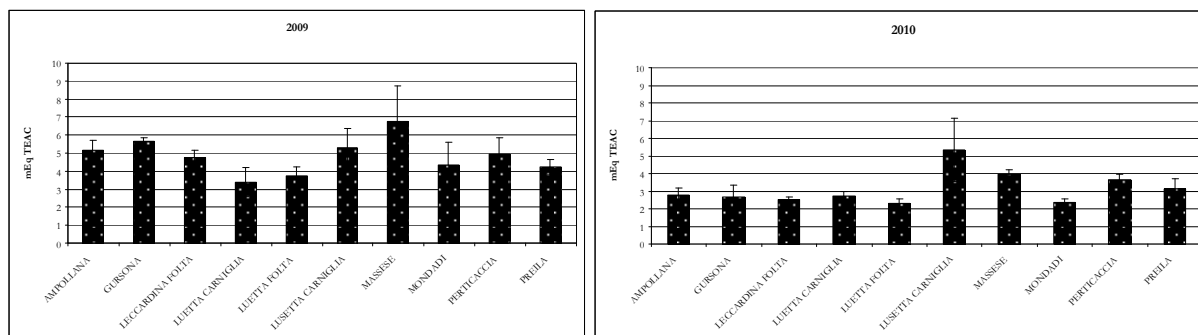


Fig. 26 – Potere antiossidante espresso in mEq di TEAC delle farine ottenute dalle cultivar analizzate negli anni 2009 (sinistra) e 2010 (destra). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P < 0,05$ ).



## VIII RISULTATI E DISCUSSIONI

### *Valutazione morfologica e qualitativa di due cultivar a diverse altitudini*

#### *1. Valutazione molecolare*

Al fine di verificare l'identità genetica delle due cultivar in esame (Luetta e Leccardina) è stata effettuata una analisi molecolare mediante l'utilizzo di marcatori molecolari SSR utilizzando le stesse otto coppie di primer utilizzate nella fase precedente (Marinoni, 2003; Buck *et al.*,2003). Dai risultati emerge la completa identità genetica tra gli otto alberi di Luetta (4 in località Folta e 4 in località Breda) e tra gli otto alberi di Leccardina (4 in località Folta e 4 in località Breda) (Fig. 27).

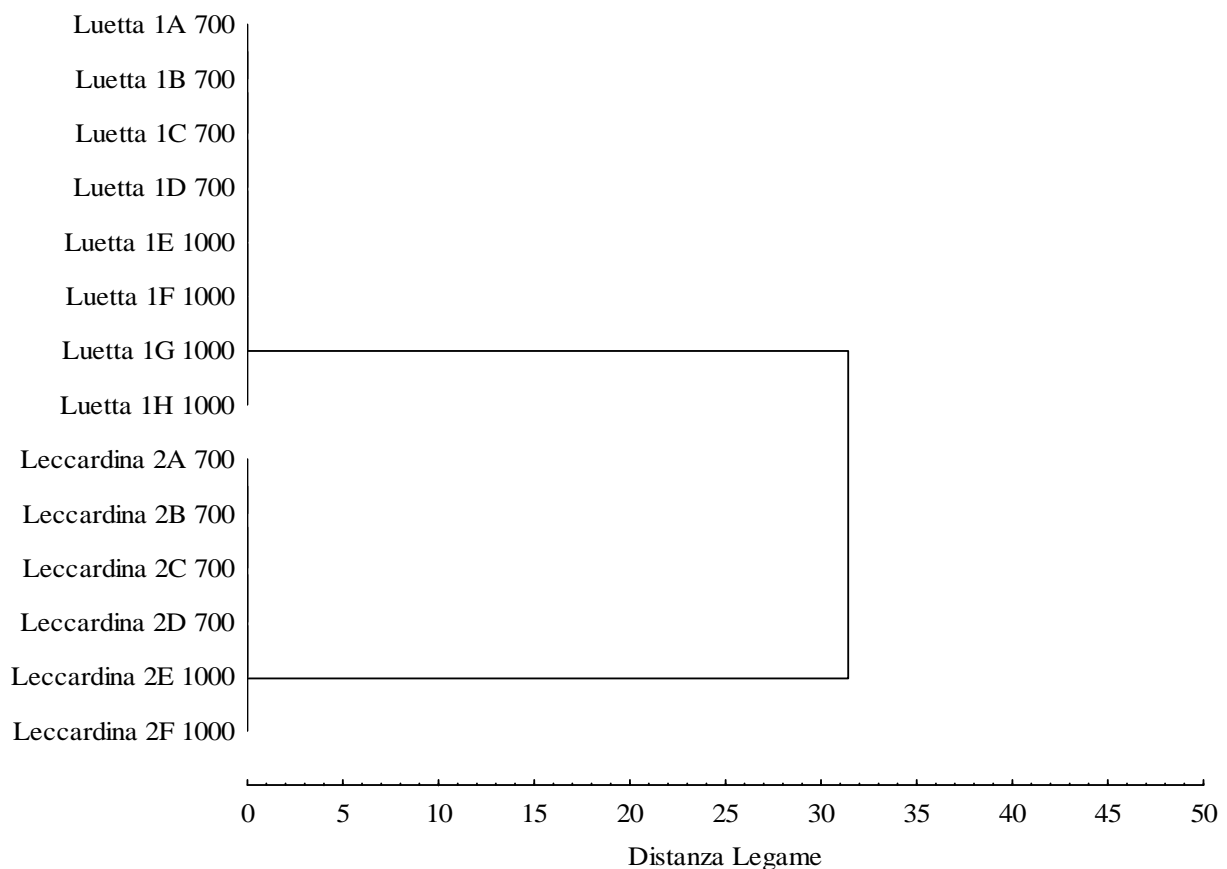


Fig. 27. Dendrogramma relativo alla cluster analysis (UPGMA) e distanza euclidea delle cultivar Luetta e Leccardina alle diverse altitudini (700 e 1000 m s.l.m.) utilizzando 8 coppie di primer SSR.

## 2. *Valutazione morfologica*

Le 2 cultivar reperite nelle valli del Taro e del Ceno (Luetta e Leccardina) sono state catalogate secondo la metodologia indicata da Breviglieri (1955) e ripresa da Baldini (1958), Eynard e Paglietta (1966), Fabbri *et al.* (1985), Ponchia *et al.* (1985) e Antognozzi (1986), contenente i caratteri da utilizzare per la costituzione di schede castanografiche. Inoltre per entrambi i genotipi descritti sono state fornite informazioni quali: coordinate geografiche (georeferenziazione, mediante l'utilizzo di un localizzatore GPS), zona di recupero, altitudine e uso del frutto.

Per la descrizione morfologica sono stati utilizzati descrittori relativi alle caratteristiche della foglia, dei fiori, della cupola (riccio) e del frutto (castagna); i dati biometrici ottenuti sono stati poi analizzati statisticamente per la stesura delle schede castanografiche. Inoltre le schede castanografiche relative ad ogni cultivar sono state corredate di una serie di illustrazioni relative alla pianta, alle foglie, ai fiori, alla cupola (riccio) e al frutto (castagna).

Di seguito sono riportate le quattro schede castanografiche elaborate, relative alle due cultivar di Luetta e Leccardina situate alle due altitudini (700 m s.l.m. e 1000 m s.l.m.).

# Luetta

**Nome dell'accessione:** Luetta 1C  
**Zona di recupero:** Località Folta di Albareto(PR)  
**Altitudine:** 720 m. s.l.m.  
**Coordinate geografiche:** N44°26'15.1"  
E09°40'28.8"  
**Uso del frutto:** farina



## CARATTERI DELLA PIANTA

**Densità lenticelle sul ramo:** elevata  
**Portamento delle foglie al ramo:** orizzontale



## CARATTERI DELLA FOGLIA

**Lunghezza lamina con picciolo (cm):** 17,492±2,914  
**Lunghezza lamina fogliare (cm):** 15,472±2,741  
**Lunghezza picciolo(cm):** 2,020±0,531  
**Larghezza massima (cm)** 5,324±0,985  
**Forma lembo:** ovale lanceolata  
**Forma base lembo:** ottusa  
**Sezione trasversale:** leggermente concava  
**Incisione margine :** dentato filiforme  
**Simmetria:** simmetrica  
**Evidenza nervature:** media



### CARATTERI DEI FIORI MASCHILI (AMENTI)

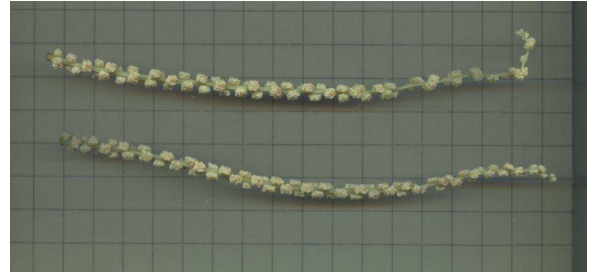
Portamento amenti: pendulo

Numero medio amenti per germoglio:  $9,747 \pm 3,823$

Lunghezza media degli amenti (cm):  $15,390 \pm 3,396$

Larghezza media degli amenti (mm):  $1,325 \pm 0,305$

Numero medio di glomeruli per amento:  $90,825 \pm 21,979$



### CARATTERI DEI FIORI FEMMINILI

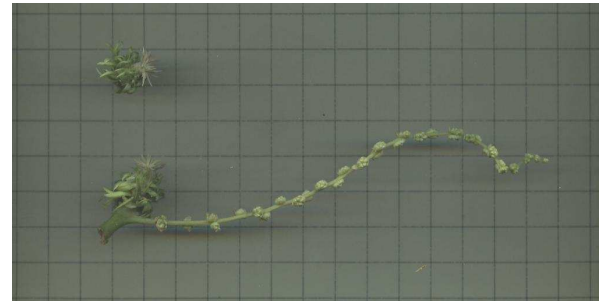
Numero medio per germoglio:  $2,115 \pm 1,044$

Numero medio di stili per fiore:  $25,295 \pm 10,447$

Lunghezza media degli stili (mm):  $3,035 \pm 0,713$

Altezza fiore (mm):  $6,880 \pm 0,992$

Larghezza fiore:  $6,920 \pm 1,364$



### CUPOLA (RICCIO)

Peso (g):  $35,350 \pm 10,453$

Larghezza minima (cm):  $4,492 \pm 0,370$

Larghezza massima (cm):  $5,107 \pm 0,610$

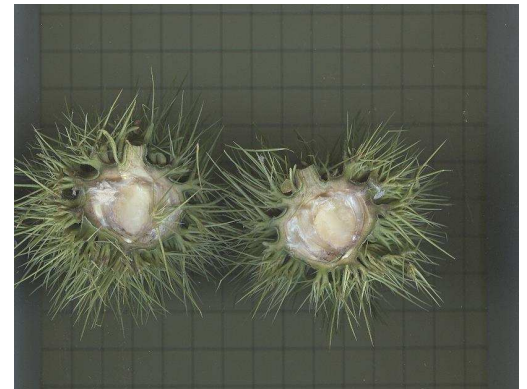
Lunghezza massima (cm):  $4,162 \pm 0,480$

Lunghezza aculei (cm):  $2,102 \pm 0,268$

Numero frutti:  $2,762 \pm 0,539$

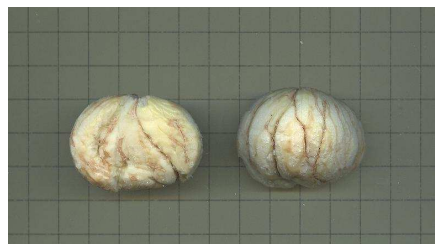
Numero valve:  $3,905 \pm 0,436$

Consistenza aculei: rigidi



**FRUTTO**  
**(ACHENIO, VOLGARMENTE DETTO CASTAGNA)**

**Altezza (cm):**  $2,861 \pm 0,312$   
**Larghezza (cm):**  $3,433 \pm 0,379$   
**Spessore (cm):**  $1,999 \pm 0,414$   
**Lunghezza torcia (mm):**  $3,023 \pm 2,455$   
**Numero stili della torcia:**  $8,750 \pm 1,401$   
**Larghezza cicatrice ilare (cm):**  $1,401 \pm 0,486$   
**Altezza cicatrice ilare (cm):**  $1,276 \pm 0,228$   
**Peso singolo frutto con pericarpo (g):**  $12,613 \pm 3,733$   
**Peso senza guscio di 20 castagne (g):**  $10,406 \pm 3,378$   
**Volume del frutto (cm<sup>3</sup>):**  $11,383 \pm 3,604$   
**Solcatura del seme:** elevata  
**Descrizione cicatrice ilare:** leggermente pelosa  
**Forma della base:** arrotondata  
**Persistenza della torcia:** persistente  
**Indice forma:**  $0,438 \pm 0,108$



*Castagne fresche*



*Castagne secche*

# Leccardina

**Nome dell'accessione:** Leccardina 2B  
**Zona di recupero:** Località Folta di Albareto(PR)  
**Altitudine:** 720 m. s.l.m.  
**Coordinate geografiche:** N44°26'15.6"  
E09°40'29.1"  
**Uso del frutto:** farina

## CARATTERI DELLA PIANTA

**Densità lenticelle sul ramo:** elevata  
**Portamento delle foglie al ramo:** orizzontale



## CARATTERI DELLA FOGLIA

**Lunghezza lamina con picciolo (cm):** 16,904±3,016  
**Lunghezza lamina fogliare (cm):** 14,902±2,797  
**Lunghezza picciolo(cm):** 2,002±0,486  
**Larghezza massima (cm)** 4,895±0,743  
**Forma lembo:** ovale lanceolata  
**Forma base lembo:** ottusa  
**Sezione trasversale:** leggermente concava  
**Incisione margine :** dentato filiforme  
**Simmetria:** simmetrica  
**Evidenza nervature:** media



## CARATTERI DEI FIORI MASCHILI (AMENTI)

Portamento amenti: pendulo

Numero medio amenti per germoglio:  $8,873 \pm 3,551$

Lunghezza media degli amenti (cm):  $14,592 \pm 3,840$

Larghezza media degli amenti (mm):  $1,414 \pm 0,315$

Numero medio di glomeruli per amento:  $78,311 \pm 13,593$



## CARATTERI DEI FIORI FEMMINILI

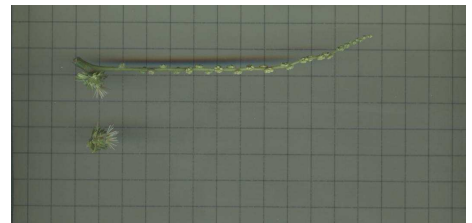
Numero medio per germoglio:  $2,350 \pm 1,022$

Numero medio di stili per fiore:  $17,184 \pm 6,125$

Lunghezza media degli stili (mm):  $2,873 \pm 0,822$

Altezza fiore (mm):  $5,133 \pm 0,692$

Larghezza fiore:  $5,313 \pm 0,619$



## CUPOLA (RICCIO)

Peso (g):  $35,350 \pm 10,453$

Larghezza minima (cm):  $4,492 \pm 0,370$

Larghezza massima (cm):  $5,107 \pm 0,610$

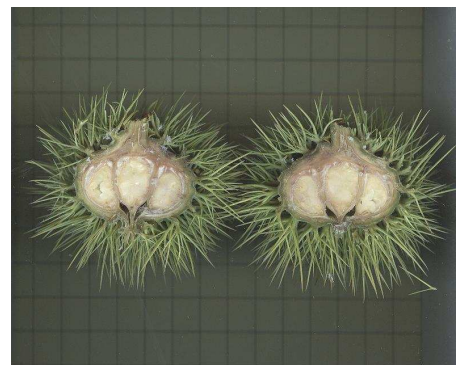
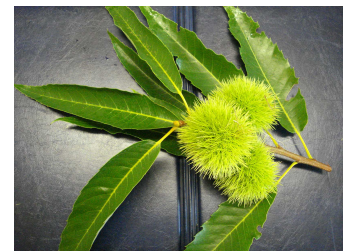
Lunghezza massima (cm):  $4,162 \pm 0,480$

Lunghezza aculei (cm):  $2,102 \pm 0,268$

Numero frutti:  $2,762 \pm 0,539$

Numero valve:  $3,905 \pm 0,436$

Consistenza aculei: rigidi



**FRUTTO  
(ACHENIO, VOLGARMENTE DETTO  
CASTAGNA)**

**Altezza (cm):**  $2,313 \pm 0,198$

**Larghezza (cm):**  $2,755 \pm 0,315$

**Spessore (cm):**  $1,653 \pm 0,287$

**Lunghezza torcia (mm):**  $2,972 \pm 0,447$

**Numero stili della torcia:**  $7,000 \pm 1,887$

**Larghezza cicatrice ilare (cm):**  $2,109 \pm 0,420$

**Altezza cicatrice ilare (cm):**  $1,297 \pm 1,323$

**Peso singolo frutto con pericarpo (g):**  $7,313 \pm 2,283$

**Peso senza guscio di 20 castagne (g):**  $5,880 \pm 1,954$

**Volume del frutto (cm<sup>3</sup>):**  $6,891 \pm 2,073$

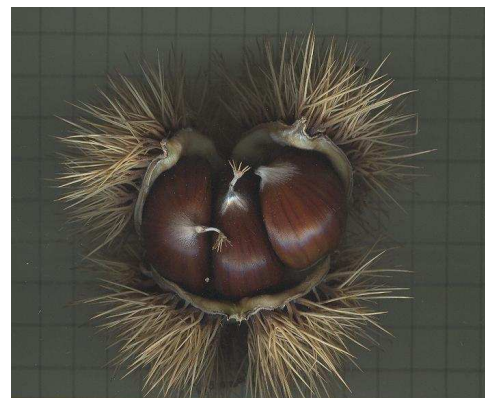
**Solcatura del seme:** elevata

**Descrizione cicatrice ilare:** leggermente pelosa

**Forma della base:** arrotondata

**Persistenza della torcia:** persistente

**Indice forma:**  $0,528 \pm 0,114$



*Castagne fresche*



*Castagne secche*

# Luetta

**Nome dell'accessione:** Luetta 1 H  
**Zona di recupero:** Località Breda di Albareto(PR)  
**Altitudine:** 1000 m. s.l.m.  
**Coordinate geografiche:** N44°25'42.9"  
E09°43'33.2"  
**Uso del frutto:** farina



## CARATTERI DELLA PIANTA

**Densità lenticelle sul ramo:** elevata  
**Portamento delle foglie al ramo:** orizzontale

## CARATTERI DELLA FOGLIA

**Lunghezza lamina con picciolo (cm):**  $17,24 \pm 2,457$   
**Lunghezza lamina fogliare (cm):**  $15,32 \pm 2,404$   
**Lunghezza picciolo(cm):**  $1,922 \pm 1,136$   
**Larghezza massima (cm)**  $5,664 \pm 0,837$   
**Forma lembo:** ovale lanceolata  
**Forma base lembo:** ottusa  
**Sezione trasversale:** leggermente concava  
**Incisione margine :** dentato filiforme  
**Simmetria:** simmetrica  
**Evidenza nervature:** media



## CARATTERI DEI FIORI MASCHILI (AMENTI)

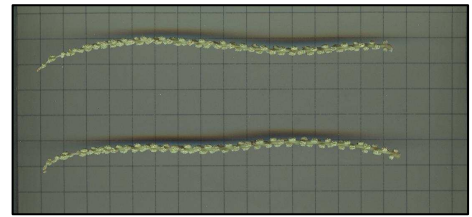
Portamento amenti: pendulo

Numero medio amenti per germoglio:  $7,801 \pm 2,731$

Lunghezza media degli amenti (cm):  $14,082 \pm 2,359$

Larghezza media degli amenti (mm):  $1,215 \pm 0,276$

Numero medio di glomeruli per amento:  $87,143 \pm 14,715$



## CARATTERI DEI FIORI FEMMINILI

Numero medio per germoglio:  $1,904 \pm 1,209$

Altezza fiore (mm):  $6,802 \pm 0,738$

Larghezza fiore (mm):  $6,386 \pm 0,465$

Numero medio di stili per fiore:  $32,383 \pm 7,638$

Lunghezza media degli stili (mm):  $2,857 \pm 0,996$



## CUPOLA (RICCIO)

Peso (g):  $17,363 \pm 4,381$

Larghezza minima (cm):  $3,251 \pm 0,509$

Larghezza massima (cm):  $3,543 \pm 0,563$

Lunghezza massima (cm):  $2,920 \pm 0,403$

Lunghezza aculei (cm):  $1,893 \pm 0,271$

Numero frutti:  $2,500 \pm 0,577$

Numero valve:  $3,725 \pm 0,171$

Consistenza aculei: rigidi



## FRUTTO

**(ACHENIO, VOLGARMENTE DETTO CASTAGNA)**

**Altezza (cm):**  $2,742 \pm 0,195$

**Larghezza (cm):**  $3,403 \pm 0,312$

**Spessore (cm):**  $1,917 \pm 0,340$

**Lunghezza torcia (mm):**  $3,305 \pm 2,724$

**Numero stili della torcia:**  $10,441 \pm 2,489$

**Larghezza cicatrice ilare (cm):**  $2,392 \pm 0,497$

**Altezza cicatrice ilare (cm):**  $1,236 \pm 0,313$

**Peso singolo frutto con pericarpo (g):**  $11,543 \pm 3,224$

**Peso senza guscio di 20 castagne (g):**  $9,698 \pm 3,275$

**Volume del frutto (cm<sup>3</sup>):**  $10,417 \pm 2,842$

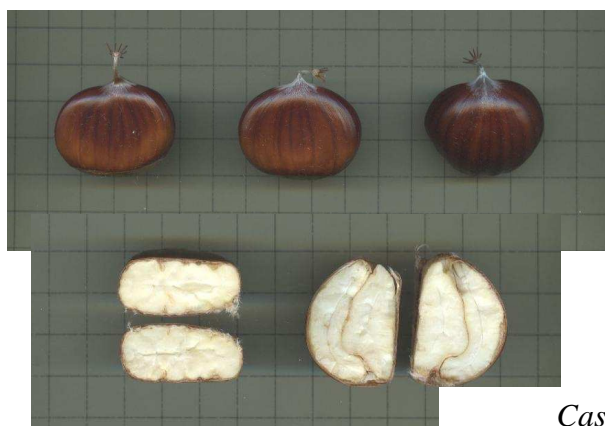
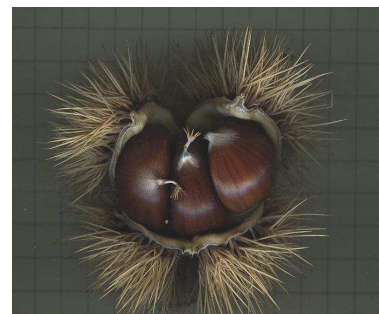
**Solcatura del seme:** elevata

**Descrizione cicatrice ilare:** leggermente pelosa

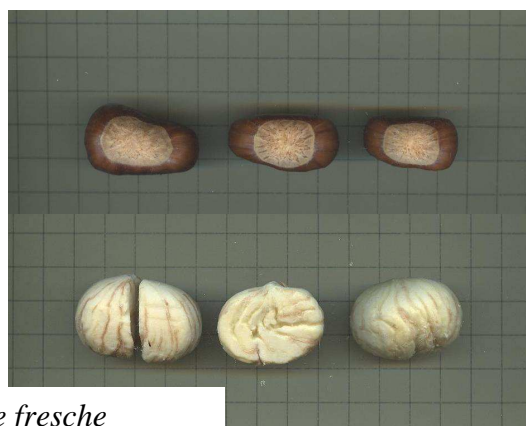
**Forma della base:** arrotondata

**Persistenza della torcia:** persistente

**Indice forma:**  $0,437 \pm 0,099$



*Castagne fresche*



*Castagne secche*

# Leccardina

**Nome dell'accessione:** Leccardina 2F  
**Zona di recupero:** Località Breda di Albareto(PR)  
**Altitudine:** 1000 m. s.l.m.  
**Coordinate geografiche:** N44°25'42.9"  
E09°43'33.2"  
**Uso del frutto:** farina



## CARATTERI DELLA PIANTA

**Densità lenticelle sul ramo:** elevata  
**Portamento delle foglie al ramo:** orizzontale

## CARATTERI DELLA FOGLIA

**Lunghezza lamina con picciolo (cm):** 17,236±3,278  
**Lunghezza lamina fogliare (cm):** 15,151±3,110  
**Lunghezza picciolo(cm):** 2,149±0,605  
**Larghezza massima (cm)** 5,342±1,494  
**Forma lembo:** ovale lanceolata  
**Forma base lembo:** ottusa  
**Sezione trasversale:** leggermente concava  
**Incisione margine :** dentato filiforme  
**Simmetria:** simmetrica  
**Evidenza nervature:** media



## CARATTERI DEI FIORI MASCHILI (AMENTI)

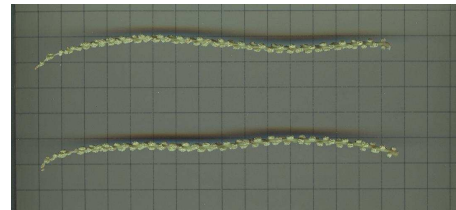
**Portamento amenti:** pendulo

**Numero medio amenti per germoglio:**  $8,275 \pm 2,860$

**Lunghezza media degli amenti (cm):**  $13,913 \pm 3,191$

**Larghezza media degli amenti (mm):**  $1,183 \pm 0,301$

**Numero medio di glomeruli per amento:**  $75,461 \pm 13,904$



## CARATTERI DEI FIORI FEMMINILI

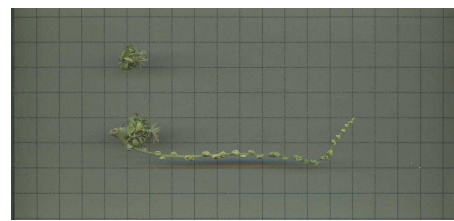
**Numero medio per germoglio:**  $2,066 \pm 1,063$

**Altezza fiore (mm):**  $5,569 \pm 0,848$

**Larghezza fiore (mm):**  $5,478 \pm 0,856$

**Numero medio di stili per fiore:**  $19,763 \pm 6,815$

**Lunghezza media degli stili (mm):**  $3,265 \pm 0,685$



## CUPOLA (RICCIO)

**Peso (g):**  $31,879 \pm 19,614$

**Larghezza minima (cm):**  $3,769 \pm 1,167$

**Larghezza massima (cm):**  $4,424 \pm 1,497$

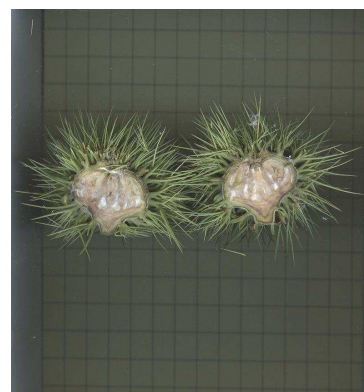
**Lunghezza massima (cm):**  $3,570 \pm 1,154$

**Lunghezza aculei (cm):**  $1,839 \pm 0,372$

**Numero frutti:**  $2,714 \pm 0,463$

**Numero valve:**  $2,000 \pm 0,000$

**Consistenza aculei:** rigidi



**FRUTTO  
(ACHENIO, VOLGARMENTE DETTO CASTAGNA)**

**Altezza (cm):**  $2,573 \pm 0,287$

**Larghezza (cm):**  $3,076 \pm 0,315$

**Spessore (cm):**  $1,781 \pm 0,323$

**Lunghezza torcia (mm):**  $3,410 \pm 2,839$

**Numero stili della torcia:**  $8,622 \pm 1,705$

**Larghezza cicatrice ilare (cm):**  $2,325 \pm 0,392$

**Altezza cicatrice ilare (cm):**  $1,197 \pm 0,239$

**Peso singolo frutto con pericarpo (g):**  $9,529 \pm 2,560$

**Peso senza guscio di 20 castagne (g):**  $7,844 \pm 2,315$

**Volume del frutto (cm<sup>3</sup>):**  $8,817 \pm 2,439$

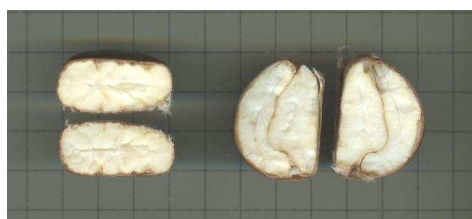
**Solcatura del seme:** elevata

**Descrizione cicatrice ilare:** leggermente pelosa

**Forma della base:** arrotondata

**Persistenza della torcia:** persistente

**Indice forma:**  $0,488 \pm 0,113$



*Castagne fresche*



*Castagne secche*

Per comprendere l'influenza dell'ambiente sulla morfologia e sulla qualità del frutto e degli sfarinati, è stato impostato un confronto sulle due varietà a differenti altitudini (700 e 1000 m s.l.m.).

Lo studio dei caratteri morfologici delle due varietà di castagno (Luetta e Leccardina) ha portato all'acquisizione di un considerevole numero di dati, i quali si sono rivelati utili descrittori del materiale in esame. Le schede castanografiche ambiscono a descrivere gli aspetti fenotipici dei genotipi analizzati, così da ottenere una sorta di "carta d'identità".

Dall'analisi statistica dei dati morfologici e dalla loro variabilità è stato possibile ottenere indici potenzialmente capaci di differenziare le due varietà (alla stessa altitudine e ad altitudini diverse). Infatti, una scheda pomologica, nonostante permetta di fissare la variabilità di ognuna delle piante considerate, consentendo di rielaborare con maggiore facilità e velocità una alta mole di valori altrimenti inutilizzabili, non può essere assunta come elemento diagnostico assoluto sul quale basare uno schema di identificazione (Baldini e Scaramuzzi, 1952). Tale considerazione è giustificata dal fatto che l'ambiente gioca un ruolo fondamentale sull'espressione fenotipica anche se la descrizione viene condotta in campi catalogo dove l'influenza della variabile ambientale è ridotta. Detto questo, prima di discutere i risultati morfologici è opportuno fare delle importanti considerazioni:

- Luetta e Leccardina sono due cultivar precoci;
- alle due altitudini le fasi fenologiche della fruttificazione sono risultate differenti, infatti a 700 m s.l.m. entrambe le varietà iniziano la fioritura nella terza decade di maggio e maturano i frutti nell'ultima decade di settembre, mentre a 1000 m s.l.m. si ha un ritardo di circa 10 giorni per entrambe le fasi e per entrambe le cultivar (Tab. 25).

<i>Cultivar</i>	<i>Epoca di fioritura</i>	<i>Fine accrescimento frutto</i>	<i>Maturazione frutto</i>
<i>Luetta 700 m s.l.m.</i>	Seconda decade di giugno	Seconda decade di agosto	Terza decade di settembre
<i>Luetta 1000 m s.l.m.</i>	Terza decade di giugno	Terza decade di agosto	Prima decade di ottobre

<i>Cultivar</i>	<i>Epoca di fioritura</i>	<i>Fine accrescimento frutto</i>	<i>Maturazione frutto</i>
<i>Luetta 700 m s.l.m.</i>	Seconda decade di giugno	Seconda decade di agosto	Terza decade di settembre
<i>Luetta 1000 m s.l.m.</i>	Terza decade di giugno	Terza decade di agosto	Prima decade di ottobre

*Tab. 25– Differenze tra alcune caratteristiche fenologiche (epoca di fioritura, fine accrescimento del frutto e maturazione del frutto) delle due cultivar alle due altitudini.*

Analizzando statisticamente i dati relativi ai caratteri della foglia emerge come nei tre anni di studio la lamina fogliare subisca un decremento delle dimensioni in lunghezza. La larghezza massima della foglia subisce un incremento nel 2009 per poi tornare a decrescere nel 2010 mentre la lunghezza del picciolo rimane invariata lungo il periodo di studio (Tab. 26). Osservando quanto risulta dal confronto tra le cultivar situate alle due differenti altitudini (Tab. 27) è possibile invece osservare come la lunghezza della foglia e della lamina fogliare non subiscano variazioni significative né per la Luetta né per la Leccardina, mentre si osserva un decremento della lunghezza del picciolo nella Luetta ed un incremento nella Leccardina per quanto statisticamente poco significativo. La caratteristica che sembra subire

maggiormente influenza nel cambio di altitudine sembra essere, per quanto riguarda quest'organo, la larghezza della foglia che per entrambe le cultivar subisce un significativo aumento a 1000 m. s.l.m.

<b>FOGLIA</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>
Lunghezza foglia	17,576 <sup>a</sup>	17,005 <sup>ab</sup>	16,535 <sup>b</sup>
Lunghezza lamina fogliare	15,518 <sup>a</sup>	15,083 <sup>ab</sup>	14,543 <sup>b</sup>
Lunghezza picciolo	2,065 <sup>a</sup>	1,919 <sup>a</sup>	2,066 <sup>a</sup>
Larghezza massima	5,251 <sup>b</sup>	5,721 <sup>a</sup>	4,823 <sup>c</sup>

Tab. 26 Significatività relative alle caratteristiche della foglia secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i tre anni di studio (2008, 2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i caratteri della foglia. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

<b>FOGLIA</b>	<b>Caratteri Misurati</b>	<b>Luetta Folta</b>		<b>Luetta Breda</b>		<b>Leccardina Folta</b>		<b>Leccardina Breda</b>	
		<b>DS</b>	<b>DS</b>	<b>DS</b>	<b>DS</b>	<b>DS</b>	<b>DS</b>		
	Lunghezza foglia	17,492 <sup>a</sup>	2,914	17,247 <sup>a</sup>	2,457	16,904 <sup>a</sup>	3,016	17,236 <sup>a</sup>	3,278
	Lunghezza lamina fogliare	15,472 <sup>a</sup>	2,741	15,325 <sup>a</sup>	2,404	14,902 <sup>a</sup>	2,797	15,151 <sup>a</sup>	3,110
	Lunghezza picciolo	2,020 <sup>ab</sup>	0,531	1,922 <sup>b</sup>	1,136	2,002 <sup>ab</sup>	0,486	2,149 <sup>a</sup>	0,605
	Larghezza massima	5,324 <sup>b</sup>	0,986	5,664 <sup>a</sup>	0,837	4,895 <sup>c</sup>	0,743	5,342 <sup>b</sup>	1,494

Tab. 27 Significatività relative alle caratteristiche della foglia secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i tre anni di studio (2008, 2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità all'interno della popolazione (Luetta e Leccardina) alle due altitudini. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

Per quanto riguarda i caratteri relativi ai fiori maschili o amenti dai dati si nota una generale diminuzione sia del numero degli amenti per germoglio sia della loro lunghezza mentre la larghezza ed il numero di glomeruli per amento subiscono entrambi un aumento nel 2009 per poi tornare a decrescere nel 2010 (Tab. 28). I dati relativi alle caratteristiche degli amenti per le cultivar in esame a 700 e 1000 m s.l.m. mostrano anche in questo caso una significativa diminuzione dei valori biometrici degli amenti per entrambe le cultivar, fatta eccezione per quanto riguarda il numero dei glomeruli per amento, dato che rimane invariato per entrambe le cultivar alle due differenti altitudini (Tab. 29).

<b>FIORI MASCHILI (amenti)</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>
N° Amenti/germoglio	10,676 <sup>a</sup>	8,419 <sup>b</sup>	6,986 <sup>c</sup>
N° glomeruli	79,091 <sup>b</sup>	90,405 <sup>a</sup>	82,460 <sup>b</sup>
Lunghezza amento	15,258 <sup>a</sup>	14,970 <sup>a</sup>	13,038 <sup>b</sup>
Larghezza amento	1,242 <sup>b</sup>	1,364 <sup>a</sup>	1,278 <sup>ab</sup>

Tab. 28 - Significatività relative alle caratteristiche degli amenti secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i tre anni di studio (2008, 2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i caratteri degli amenti. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

<b>AMENTI</b>	<b>Caratteri Misurati</b>	<b>Luetta Folta</b>		<b>Luetta Breda</b>		<b>Leccardina Folta</b>		<b>Leccardina Breda</b>	
		<b>DS</b>	<b>DS</b>	<b>DS</b>	<b>DS</b>	<b>DS</b>	<b>DS</b>		
	N° Amenti/germoglio	9,747 <sup>a</sup>	3,823	7,801 <sup>b</sup>	2,731	8,873 <sup>ab</sup>	3,551	8,275 <sup>ab</sup>	2,860
	N° glomeruli	90,825 <sup>a</sup>	21,979	87,143 <sup>a</sup>	14,715	78,311 <sup>b</sup>	13,593	75,461 <sup>b</sup>	13,904
	Lung amento	15,390 <sup>a</sup>	3,396	14,082 <sup>b</sup>	2,359	14,592 <sup>ab</sup>	3,840	13,913 <sup>b</sup>	3,191
	Larg amento	1,325 <sup>a</sup>	0,305	1,215 <sup>b</sup>	0,276	1,414 <sup>a</sup>	0,315	1,183 <sup>b</sup>	0,301

Tab. 29 Significatività relative alle caratteristiche degli amenti secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i tre anni di studio (2008, 2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità all'interno della popolazione (Luetta e Leccardina) alle due altitudini. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

Il numero dei fiori femminili per germoglio rimane il medesimo durante le tre annate di campionamento mentre la lunghezza ed il numero degli stili subiscono un decremento statisticamente significativo (Tab. 30). Le caratteristiche dei fiori femminili esaminate alle due altitudini mostrano due differenti andamenti in riferimento alle due cultivar. Infatti mentre per la Luetta si ha un aumento del numero degli stili, una diminuzione del diametro trasversale ed una diminuzione della lunghezza degli stili, per quanto quest'ultima poco significativa, per la Leccardina le variazioni si limitano ad un aumento, alla maggiore altitudine, della lunghezza degli stili (Tab. 30).

<b>FIORI FEMMINILI</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>
N° fiori fem/germoglio	2,169 <sup>a</sup>	2,007 <sup>a</sup>	2,062 <sup>a</sup>
N° stili	28,338 <sup>a</sup>	23,287 <sup>b</sup>	15,603 <sup>c</sup>
Lung stili	3,355 <sup>a</sup>	2,676 <sup>b</sup>	2,597 <sup>b</sup>

Tab. 30 - Significatività relative alle caratteristiche dei fiori femminili secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i tre anni di studio (2008, 2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i caratteri dei fiori femminili. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere

<b>FIORI FEMMINILI</b>	<b>Caratteri Misurati</b>	<b>Luetta Folta</b>	<b>DS</b>	<b>Luetta Breda</b>	<b>DS</b>	<b>Leccardina Folta</b>	<b>DS</b>	<b>Leccardina Breda</b>	<b>DS</b>
	N° fiori fem/germoglio	2,115 <sup>a</sup>	1,044	1,904 <sup>a</sup>	1,209	2,350 <sup>a</sup>	1,022	2,066 <sup>a</sup>	1,063
N° stili	25,295 <sup>b</sup>	10,447	32,383 <sup>a</sup>	7,638	17,184 <sup>c</sup>	6,125	19,763 <sup>c</sup>	6,815	
Lunghezza stili	3,035 <sup>ab</sup>	0,713	2,857 <sup>b</sup>	0,996	2,873 <sup>b</sup>	0,822	3,265 <sup>a</sup>	0,685	
Diametro longitudinale	6,880 <sup>a</sup>	0,992	6,802 <sup>a</sup>	0,738	5,133 <sup>b</sup>	0,692	5,569 <sup>b</sup>	0,848	
Diametro trasversale	6,920 <sup>a</sup>	1,364	6,386 <sup>b</sup>	0,465	5,313 <sup>c</sup>	0,619	5,478 <sup>c</sup>	0,856	

Tab. 31 Significatività relative alle caratteristiche dei fiori femminili secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i tre anni di studio (2008, 2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità all'interno della popolazione (Luetta e Leccardina) alle due altitudini. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

La cupola o riccio che protegge il frutto ha subito, nel corso dei due anni di osservazione, un generale incremento delle dimensioni fatta eccezione per la larghezza massima, che è diminuita, e per la lunghezza degli aculei è rimasta la medesima (Tab.32). Diverso è quanto emerso dal confronto tra le cultivar a 700 e 1000 m. s.l.m.; infatti, mentre nella Luetta il riccio subisce una diminuzione in tutte le sue dimensioni mantenendo inalterato il numero di valve e di castagne per riccio, nella Leccardina si ha un aumento, anche se statisticamente poco significativo, di tutte le misure, mentre il numero di valve diminuisce ed il numero di castagne per riccio rimane invariato. (Tab. 33).

<b>CUPOLA o RICCIO</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>
Riccio Dimensione	19,829 <sup>b</sup>	36,602 <sup>a</sup>	n.d.
Riccio Larghezza minima	3,523 <sup>b</sup>	4,068 <sup>a</sup>	n.d.
Riccio Larghezza massima	5,040 <sup>a</sup>	3,828 <sup>b</sup>	n.d.
Lunghezza Massima	3,108 <sup>b</sup>	4,040 <sup>a</sup>	n.d.
Lunghezza aculei	1,878 <sup>a</sup>	1,879 <sup>a</sup>	n.d.

Tab. 32 - Significatività relative alle caratteristiche della cupola (o riccio) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i tre anni di studio (2008, 2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i caratteri della cupola. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

CUPOLA o RICCIO	Caratteri Misurati	Luetta Folta	DS	Luetta Breda	DS	Leccardina Folta	DS	Leccardina Breda	DS
	Riccio Dimensione	35,350 <sup>a</sup>	10,453	17,363 <sup>b</sup>	4,381	21,760 <sup>b</sup>	4,464	31,879 <sup>a</sup>	19,614
Riccio Larghezza minima	4,492 <sup>a</sup>	0,370	3,251 <sup>c</sup>	0,509	3,458 <sup>bc</sup>	0,590	3,769 <sup>b</sup>	1,167	
Riccio Larghezza massima	5,107 <sup>a</sup>	0,610	3,543 <sup>c</sup>	0,563	4,191 <sup>b</sup>	0,370	4,424 <sup>b</sup>	1,497	
Lunghezza Massima	4,162 <sup>a</sup>	0,480	2,920 <sup>c</sup>	0,403	3,283 <sup>bc</sup>	0,292	3,570 <sup>b</sup>	1,154	
Lunghezza aculei	2,102 <sup>a</sup>	0,268	1,893 <sup>b</sup>	0,271	1,681 <sup>c</sup>	0,271	1,839 <sup>bc</sup>	0,372	
Numero valve	3,905 <sup>a</sup>	0,436	3,725 <sup>a</sup>	0,171	4,000 <sup>a</sup>	0,000	2,000 <sup>b</sup>	0,000	
Numero castagne per riccio	2,762 <sup>a</sup>	0,539	2,500 <sup>a</sup>	0,577	2,476 <sup>a</sup>	0,750	2,714 <sup>a</sup>	0,463	

Tab. 33 Significatività relative alle caratteristiche della cupola secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i tre anni di studio (2008, 2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità all'interno della popolazione (Luetta e Leccardina) alle due altitudini. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

Infine per quel che concerne i dati biometrici ottenuti dalle osservazioni sui frutti è possibile osservare la medesima tendenza per la quasi totalità dei caratteri, ovvero il valore massimo si ha nell'anno 2008, si assiste ad un decremento nel 2009 e nell'anno successivo si ha ad un nuovo incremento dei valori (Tab. 34). Dalle osservazioni relative alle due cultivar a 700 e 1000m. s.l.m. emerge come i caratteri della Luetta rimangano invariati, fatta eccezione per lo spessore che subisce un decremento anche se statisticamente poco significativo ed il numero di stili della torcia che aumentano all'aumentare dell'altitudine. I dati relativi alla cultivar Leccardina evidenziano invece un aumento di quasi tutti i caratteri a 1000m. s.l.m. ad esclusione dell'altezza della cicatrice ilare che rimane inalterata (Tab. 35).

FRUTTO	2008	2009	2010
Castagna altezza	2,771 <sup>a</sup>	2,495 <sup>c</sup>	2,600 <sup>b</sup>
Castagna larghezza	3,368 <sup>a</sup>	2,964 <sup>c</sup>	3,169 <sup>b</sup>
Spessore	1,862 <sup>ab</sup>	1,753 <sup>b</sup>	1,898 <sup>a</sup>
N° stili torcia	9,076 <sup>a</sup>	n.d.	8,425 <sup>b</sup>
Cicatrice ilare larghezza	2,464 <sup>a</sup>	2,124 <sup>b</sup>	2,431 <sup>a</sup>
Cicatrice ilare altezza	1,232 <sup>a</sup>	1,183 <sup>a</sup>	1,340 <sup>a</sup>
Peso singola castagna con guscio	11,783 <sup>a</sup>	8,457 <sup>c</sup>	10,509 <sup>b</sup>
Peso senza guscio di 20 castagne	9,430 <sup>a</sup>	6,416 <sup>b</sup>	9,500 <sup>a</sup>
Volume singola castagna	10,725 <sup>a</sup>	8,018 <sup>c</sup>	9,388 <sup>b</sup>
Indice Forma	0,450 <sup>b</sup>	0,501 <sup>a</sup>	0,468 <sup>ab</sup>

Tab. 34 - Significatività relative alle caratteristiche del frutto secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i tre anni di studio (2008, 2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i caratteri del frutto. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere

FRUTTO	Caratteri Misurati	Luetta Folta	DS	Luetta Breda	DS	Leccardina Folta	DS	Leccardina Breda	DS
	Castagna altezza	2,861 <sup>a</sup>	0,312	2,742 <sup>a</sup>	0,195	2,313 <sup>c</sup>	0,198	2,573 <sup>b</sup>	0,287
Castagna larghezza	3,433 <sup>a</sup>	0,379	3,403 <sup>a</sup>	0,312	2,755 <sup>c</sup>	0,315	3,076 <sup>b</sup>	0,315	
Spessore	1,999 <sup>a</sup>	0,414	1,917 <sup>ab</sup>	0,340	1,653 <sup>c</sup>	0,287	1,781 <sup>bc</sup>	0,323	
N° stili torcia	8,750 <sup>b</sup>	1,402	10,441 <sup>a</sup>	2,489	7,000 <sup>c</sup>	1,887	8,622 <sup>b</sup>	1,705	
Cicatrice ilare larghezza	1,401 <sup>a</sup>	0,487	2,392 <sup>a</sup>	0,497	2,109 <sup>b</sup>	0,420	2,325 <sup>a</sup>	0,392	
Cicatrice ilare altezza	1,276 <sup>a</sup>	0,228	1,236 <sup>a</sup>	0,313	1,297 <sup>a</sup>	1,323	1,197 <sup>a</sup>	0,239	
Peso singola castagna con guscio	12,613 <sup>a</sup>	3,734	11,543 <sup>a</sup>	3,224	7,313 <sup>c</sup>	2,283	9,529 <sup>b</sup>	2,560	
Peso senza guscio	10,406 <sup>a</sup>	3,378	9,698 <sup>a</sup>	3,275	5,880 <sup>c</sup>	1,954	7,844 <sup>b</sup>	2,315	
Volume singola castagna	11,383 <sup>a</sup>	3,604	10,417 <sup>a</sup>	2,842	6,891 <sup>c</sup>	2,073	8,817 <sup>b</sup>	2,439	
Indice Forma	0,438 <sup>b</sup>	0,108	0,4378 <sup>b</sup>	0,099	0,528 <sup>a</sup>	0,114	0,488 <sup>ab</sup>	0,113	

Tab. 35 Significatività relative alle caratteristiche del frutto secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i tre anni di studio (2008, 2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità all'interno della popolazione (Luetta e Leccardina) alle due altitudini. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

### 3. Valutazione qualitativa

Le analisi centesimali delle farine prodotte dalle cultivar Luetta e Leccardina in località Folta e Breda rispettivamente a 700 e 1000m. s.l.m. ed i dati ricavati dall'elaborazione statistica ANOVA a due vie evidenziano come non vi siano significative variazioni nell'andamento della composizione chimica delle farine nei due anni di analisi (Tab. 35) fatta eccezione per l'umidità relativa che subisce un decremento dal 2009 al 2010 fatto che potrebbe essere attribuito alla stagionalità, infatti da studi condotti da Borges e collaboratori (2007) risulta che l'umidità relativa del frutto è fortemente dipendente dalle condizioni climatiche.

L'analisi della variabilità dovuta al fattore varietà all'interno della popolazione in esame (Tab. 37) evidenzia come il calo dell'umidità relativa della cultivar Leccardina abbia pesato maggiormente sull'andamento negativo dell'umidità negli anni 2009 e 2010. La composizione in carboidrati totali e grassi nelle due cultivar invece non presenta variazioni come confermato anche dall'analisi ANOVA ad una via (Figg. 28 e 29), mentre per quanto riguarda le proteine è la cultivar Luetta ad altitudine maggiore ad averne un più alto contenuto (Tab. 37), tuttavia questo non influenza la significatività del fattore anno, come precedentemente detto (Tab. 36).

ANALISI CENTESIMALE	2009	2010	Pr>Diff
% UR	5,663 <sup>a</sup>	3,949 <sup>b</sup>	< <b>0,0001</b>
% CHO	79,711 <sup>a</sup>	79,068 <sup>a</sup>	0,876
% Grasso	4,689 <sup>a</sup>	4,668 <sup>a</sup>	0,946
% Proteine	5,133 <sup>a</sup>	4,0124 <sup>a</sup>	<b>0,000</b>

Tab. 36- Significatività relative all'analisi centesimale delle farine delle due cv (Luetta e Leccardina) in località Folta (700 m s.l.m.) e località Breda (1000 m s.l.m.) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed la composizione centesimale delle farine. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

ANALISI CENTESIMALE	Luetta	Luetta	Leccardina	Leccardina
	Folta	Breda	Folta	Breda
% UR	5,249 <sup>a</sup>	5,310 <sup>a</sup>	4,494 <sup>ab</sup>	4,170 <sup>b</sup>
% CHO	80,506 <sup>a</sup>	75,784 <sup>a</sup>	83,282 <sup>a</sup>	75,784 <sup>a</sup>
% Grasso	4,737 <sup>a</sup>	4,552 <sup>a</sup>	4,808 <sup>a</sup>	4,626 <sup>a</sup>
% Proteine	4,439 <sup>b</sup>	5,453 <sup>a</sup>	4,281 <sup>b</sup>	4,116 <sup>b</sup>

Tab. 37- Significatività relative all'analisi centesimale delle farine delle due cv (Luetta e Leccardina) in località Folta (700 m s.l.m.) e località Breda (1000 m s.l.m.) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità della composizione delle farine all'interno della popolazione (Luetta e Leccardina) alle due altitudini (fattore varietà). Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

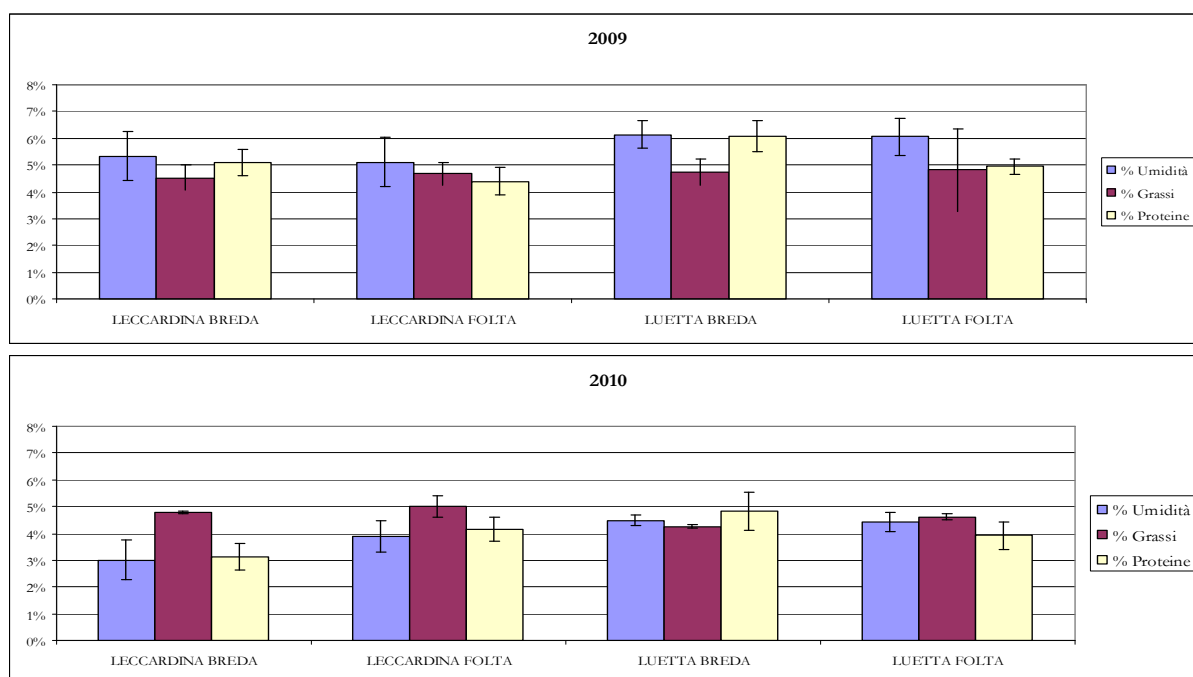


Fig. 28- Analisi centesimale (Umidità, Grassi, Proteine totali) delle farine monovarietalì ottenute dalle cv Luetta e Leccardina in località Folta (700m. s.l.m.) e Breda (1000m. s.l.m) negli anni 2009(in alto) e 2010 (in basso). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P<0,05$ ).

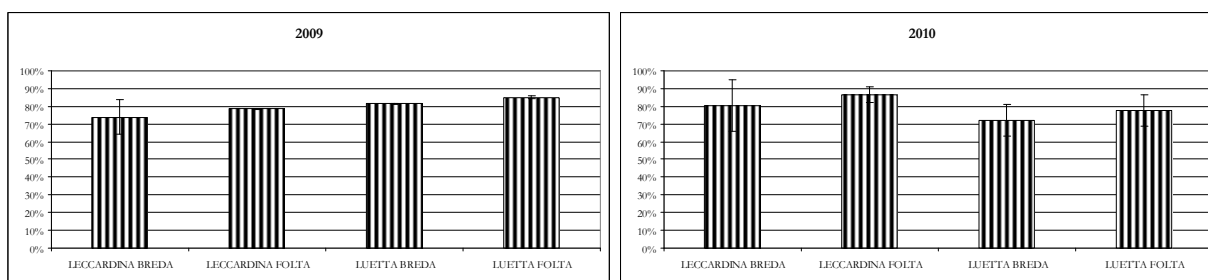


Fig. 29 - Analisi centesimale del contenuto in zuccheri totali delle farine monovarietalì ottenute dalle cv Luetta e Leccardina in località Folta (700m. s.l.m.) e Breda (1000m. s.l.m) negli anni 2009(sinistra) e 2010 (destra). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P<0,05$ ).

La composizione in acidi grassi sembra non essere influenzata dalla stagionalità, infatti l'analisi statistica ANOVA a due vie non ha evidenziato differenze significative tra il profilo in acidi grassi del 2009 rispetto a quello del 2010, ad esclusione dell'andamento dell'acido grasso linolenico (polinsaturo) il cui contenuto, nel 2010, subisce una diminuzione significativa di circa la metà rispetto all'anno precedente (Tab. 38).

Dall'analisi della variabilità sul fattore cultivar (Tab. 39) emerge come entrambe le cultivar pesino statisticamente allo stesso modo sull'andamento del profilo degli acidi grassi nei due anni di studio, quindi il calo del contenuto in acido linolenico, dal 2009 al 2010, risulta essere omogeneo sulle due cv alle due altitudini.

<b>ACIDI GRASSI</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>Pr&gt;Diff</b>
Palmitico	17,610a	17,747a	0,881
Stearico	0,850a	0,166a	0,012
Oleico	39,561a	41,412a	0,252
Linoleico	36,390a	37,687a	0,320
Linolenico	5,659a	3,000b	0,028

Tab. 38 - Significatività relative all'analisi degli acidi grassi delle farine delle due cv (Luetta e Leccardina) in località Folta (700 m s.l.m.) e località Breda (1000 m s.l.m.) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed la composizione in acidi grassi delle farine. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

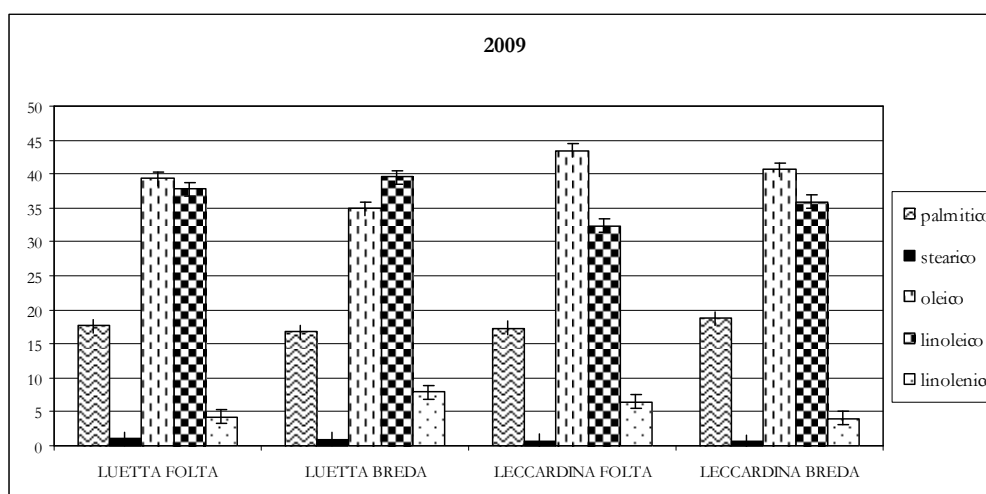
<b>ACIDI GRASSI</b>	<b>Luetta Folta</b>	<b>Luetta Breda</b>	<b>Leccardina Folta</b>	<b>Leccardina Breda</b>
Palmitico	17,462a	16,706a	17,990a	18,502a
Stearico	0,664a	0,624a	0,444a	0,494a
Oleico	40,351a	38,156a	42,149a	40,549a
Linoleico	37,769a	38,349a	34,586a	36,930a
Linolenico	3,755a	6,171a	4,935a	3,522a

Tab. 39 - Significatività relative all'analisi degli acidi grassi delle farine delle due cv (Luetta e Leccardina) in località Folta (700 m s.l.m.) e località Breda (1000 m s.l.m.) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità della composizione in acidi grassi delle farine all'interno della popolazione (Luetta e Leccardina) alle due altitudini (fattore varietà). Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

Dall' ANOVA a una via si nota come l'acido oleico subisca una diminuzione significativa per entrambe le cultivar ad altitudine maggiore nel 2009 mentre non si evidenziano particolari variazioni né per Luetta né per Leccardina nel 2010.

Al contrario l'acido linoleico, nel 2009, presenta un aumento, anche se poco significativo, per entrambe le cultivar e si mantiene invariato per le due cultivar nel 2010.

L'acido linolenico subisce un significativo aumento, nell'anno 2009 nella cv Luetta ed al contrario decresce nella Leccardina; si mantiene invece costante in entrambe le cultivar nel 2010. Infine è possibile osservare una generale diminuzione dell'acido stearico per tutte e due le cultivar ad entrambe le altitudini. (Fig. 30)



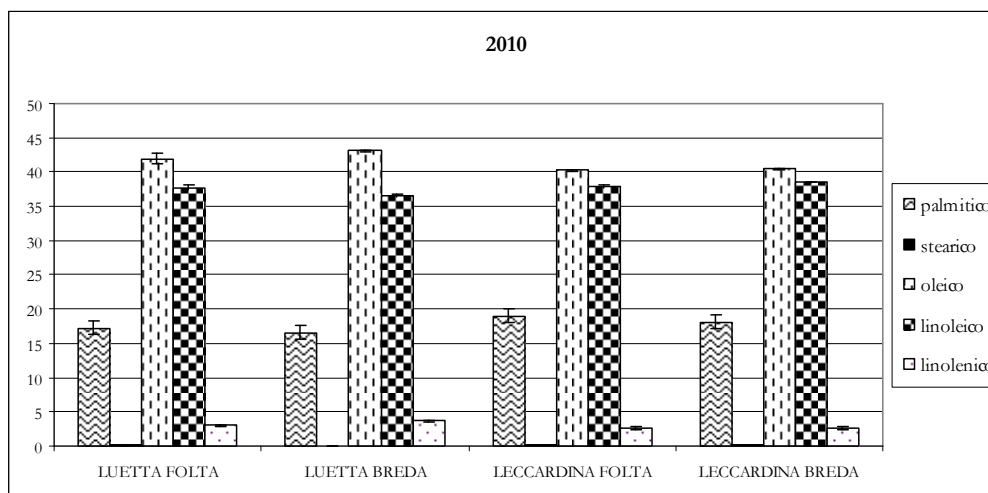


Fig. 30 - Profilo medio in acidi grassi delle farine ottenute dalle varietà Luetta e Leccardina in località Folta (700m. s.l.m.) e Breda (1000m. s.l.m.) negli anni negli anni 2009(in alto) e 2010 (in basso). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P < 0,05$ ).

L'ANOVA a due vie sui dati emersi dallo studio della composizione in SFA, MUFA e PUFA evidenzia una medesima composizione nei due anni di analisi (Tab. 40). Osservando la Tab. 41, che evidenzia le variazioni relative al fattore cultivar, emerge come le varietà in esame pesino staticamente allo stesso modo sulla composizione in acidi grassi saturi (SFA) e monoinsaturi (MUFA) mentre vi sia un leggero aumento degli acidi grassi polinsaturi (PUFA) nella cultivar Luetta così come nella Leccardina ad altitudine maggiore.

VALORI NUTRIZIONALI	2009	2010	Pr>Diff
SFA	18,390 <sup>a</sup>	17,913 <sup>a</sup>	0,640
MUFA	39,561 <sup>a</sup>	41,412 <sup>a</sup>	0,252
PUFA	42,048 <sup>a</sup>	40,687 <sup>a</sup>	0,265

Tab. 40 - Significatività relative all'analisi dei valori nutrizionali delle farine delle due cv (Luetta e Leccardina) in località Folta (700 m s.l.m.) e località Breda (1000 m s.l.m.) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i valori nutrizionali delle farine. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

VALORI NUTRIZIONALI	Luetta Folta	Luetta Breda	Leccardina Folta	Leccardina Breda
SFA	18,126 <sup>a</sup>	17,329 <sup>a</sup>	18,346 <sup>a</sup>	18,996 <sup>a</sup>
MUFA	40,351 <sup>a</sup>	38,156 <sup>a</sup>	42,149 <sup>a</sup>	40,549 <sup>a</sup>
PUFA	41,523 <sup>ab</sup>	44,520 <sup>a</sup>	39,521 <sup>b</sup>	40,452 <sup>ab</sup>

Tab. 41 - Significatività relative all'analisi dei valori nutrizionali delle farine delle due cv (Luetta e Leccardina) in località Folta (700 m s.l.m.) e località Breda (1000 m s.l.m.) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità dei valori nutrizionali delle farine all'interno della popolazione (Luetta e Leccardina) alle due altitudini (fattore varietà). Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

Dall'analisi ANOVA ad una via in Fig. 31 non si osservano variazioni significative nella composizione per entrambi gli anni ad eccezione di un aumento dei PUFA nel 2009 nella farina ottenuta dalla cultivar Luetta a 1000 m di altitudine.

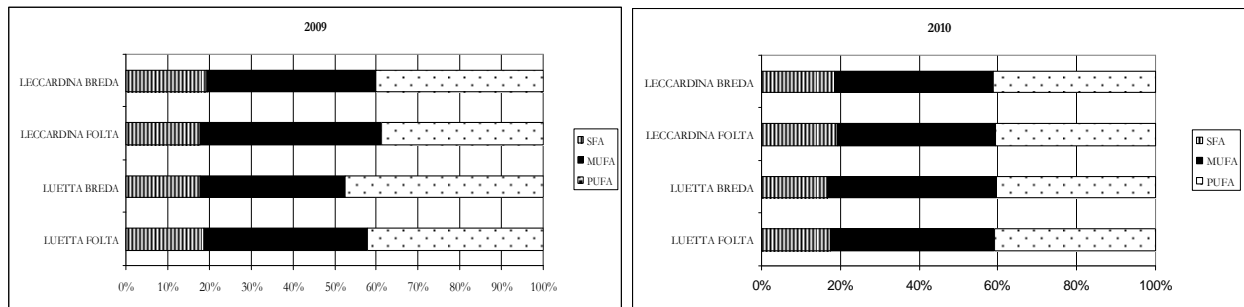


Fig. 31 Composizione in acidi grassi saturi (SFA), moninsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA) nelle farine ottenute dalle varietà Luetta e Leccardina in località Folta (700m. s.l.m.) e Breda (1000m. s.l.m) negli anni 2009(sinistra) e 2010 (destra). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P < 0,05$ ).

L' ANOVA a due vie sui dati in merito al rapporto MUFA/PUFA non ha evidenziato significative differenze tra il 2009 ed il 2010 (Tab. 42) ed anche nell'analisi relativa al fattore varietà non si riscontra alcuna significatività (Tab. 43).

<b>VALORI NUTRIZIONALI</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>Pr&gt;Diff</b>
MUFA/PUFA	0,955a	1,018a	0,307

Tab. 42 - Significatività relative all'analisi MUFA/PUFA delle farine delle due cv (Luetta e Leccardina) in località Folta (700 m s.l.m.) e località Breda (1000 m s.l.m.) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i valori MUFA/PUFA delle farine. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

<b>VALORI NUTRIZIONALI</b>	<b>Luetta Folta</b>	<b>Luetta Breda</b>	<b>Leccardina Folta</b>	<b>Leccardina Breda</b>
MUFA/PUFA	0,974 <sup>a</sup>	0,871 <sup>a</sup>	1,070 <sup>a</sup>	1,006 <sup>a</sup>

Tab. 43 - Significatività relative all'analisi dei valori MUFA/PUFA delle farine delle due cv (Luetta e Leccardina) in località Folta (700 m s.l.m.) e località Breda (1000 m s.l.m.) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità dei valori nutrizionali MUFA/PUFA delle farine all'interno della popolazione (Luetta e Leccardina) alle due altitudini (fattore varietà). Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

Tuttavia dai dati emersi dall'ANOVA a una via possiamo osservare come il rapporto MUFA/PUFA subisca una diminuzione sia nella Luetta che nella Leccardina nell'anno 2009 a 1000m rispetto ai 700m, mentre nel 2010 si mantenga omogeneo per tutte le cultivar ad entrambe le altitudini (Fig. 32). Inoltre osservando i valori in figura 32, si può notare che le farine di queste due cv nell'anno 2009 hanno un rapporto MUFA/PUFA vicino all'1 (valore considerato ottimale dal punto di vista nutrizionale) eccetto per la farina della cv Luetta in località Breda; invece nell'anno 2010 entrambe le varietà alle due altitudini mantengono un valore per questo rapporto interno all'uno.

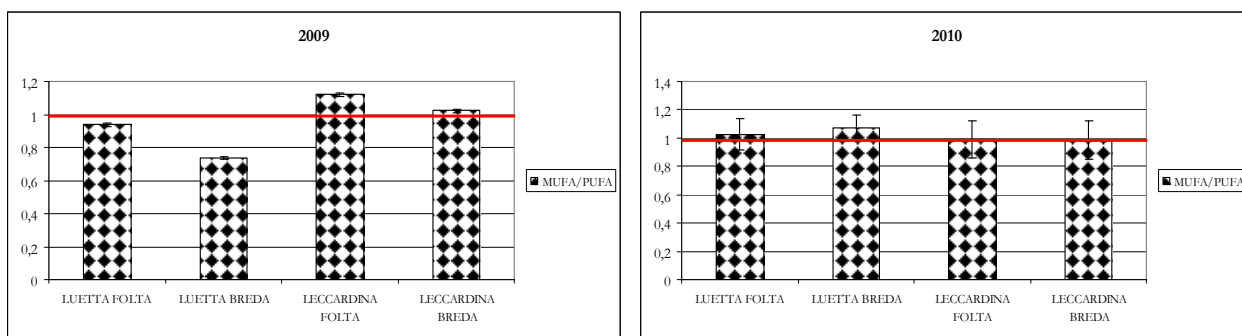


Fig. 32 - Rapporto MUFA/PUFA nella composizione nutrizionale delle farine ottenute dalle varietà Luetta e Leccardina in località Folta (700m. s.l.m.) e Breda (1000m. s.l.m.) negli anni 2009 (sinistra) e 2010 (destra). La linea rossa indica il rapporto ottimale, dal punto di vista nutrizionale, tra MUFA e PUFA.

Per ciò che riguarda gli amminoacidi l'ANOVA a due non evidenzia differenze significative nei due anni di analisi nel contenuto in Ala, Arg, Glu, Leu, Met, Thr, Tyr, e Val, mentre si ha una diminuzione nel contenuto in Asp, His, Ile, Lys ed un aumento Phe, Pro, Ser (Tab. 44).

AA	2009	2010	Pr>Diff
Ala	4,131a	4,656a	0,150
Arg	0,801a	0,976a	0,584
Asp	1,828a	1,588b	0,001
Glu	1,408a	1,223a	0,080
Gly	0,145b	0,306a	< 0,0001
His	0,579a	0,265b	0,005
Ile	0,328a	0,267b	0,001
Leu	0,422a	0,382a	0,795
Lys	0,056a	0,016b	0,011
Met	0,993a	0,9389a	0,064
Phe	0,858b	0,998a	0,001
Pro	5,671b	7,695a	0,022
Ser	5,315b	6,750a	0,016
Thr	0,272a	0,284a	0,311
Tyr	0,341a	0,280a	0,120
Val	0,132a	0,145a	0,143
Σ Aa essenziali	3,641a	3,2967a	0,157

Tab. 44 - Significatività relative all'analisi degli amminoacidi liberi delle farine delle due cv (Luetta e Leccardina) in località Folta (700 m s.l.m.) e località Breda (1000 m s.l.m.) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i valori degli amminoacidi liberi delle farine. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

In Tab. 45 è possibile osservare il peso del fattore cultivar sulle differenze riscontrate nei due anni in Tab. 44.

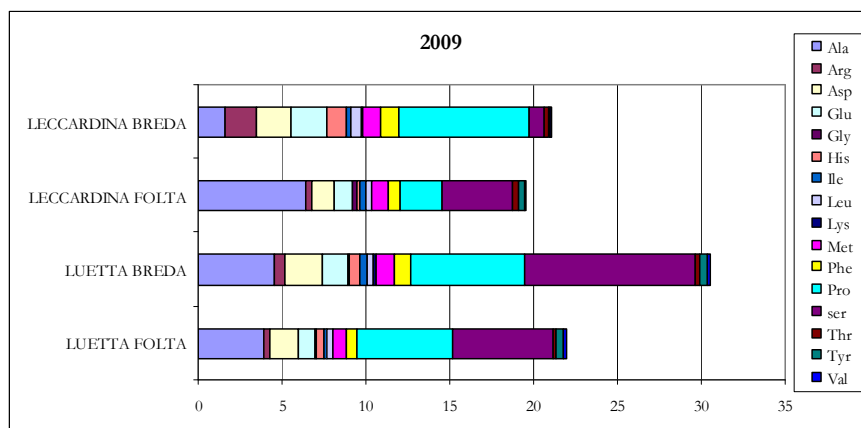
AA	Luetta Folta	Luetta Breda	Leccardina Folta	Leccardina Breda
Ala	4,128 <sup>bc</sup>	4,653 <sup>ab</sup>	6,048 <sup>a</sup>	4,653 <sup>ab</sup>
Arg	0,355 <sup>a</sup>	1,534 <sup>a</sup>	0,398 <sup>a</sup>	1,267 <sup>a</sup>
Asp	1,533 <sup>b</sup>	2,106 <sup>a</sup>	1,287 <sup>c</sup>	1,907 <sup>a</sup>
Glu	0,962 <sup>c</sup>	1,391 <sup>b</sup>	0,955 <sup>c</sup>	1,953 <sup>a</sup>
Gly	0,155 <sup>b</sup>	0,199 <sup>b</sup>	0,432 <sup>a</sup>	0,116 <sup>b</sup>
His	0,381 <sup>ab</sup>	0,447 <sup>ab</sup>	0,131 <sup>b</sup>	0,729 <sup>a</sup>
Ile	0,177 <sup>c</sup>	0,406 <sup>a</sup>	0,325 <sup>b</sup>	0,285 <sup>b</sup>
Leu	0,492 <sup>a</sup>	0,349 <sup>a</sup>	0,367 <sup>a</sup>	0,401 <sup>a</sup>
Lys	0,009 <sup>b</sup>	0,085 <sup>a</sup>	0,026 <sup>b</sup>	0,025 <sup>b</sup>
Met	0,817 <sup>c</sup>	1,061 <sup>a</sup>	0,933 <sup>b</sup>	1,053 <sup>a</sup>
Phe	0,603 <sup>c</sup>	1,084 <sup>a</sup>	0,857 <sup>b</sup>	1,169 <sup>a</sup>
Pro	6,126 <sup>a</sup>	7,150 <sup>a</sup>	5,301 <sup>a</sup>	8,154 <sup>a</sup>
Ser	6,308 <sup>b</sup>	10,510 <sup>a</sup>	4,389 <sup>bc</sup>	2,923 <sup>c</sup>
Thr	0,205 <sup>c</sup>	0,303 <sup>ab</sup>	0,346 <sup>a</sup>	0,257 <sup>b</sup>
Tyr	0,348 <sup>a</sup>	0,411 <sup>a</sup>	0,304 <sup>ab</sup>	0,180 <sup>b</sup>
Val	0,203 <sup>a</sup>	0,157 <sup>b</sup>	0,142 <sup>b</sup>	0,051 <sup>c</sup>
Σ Aa essenziali	2,887 <sup>b</sup>	3,891 <sup>a</sup>	3,12 <sup>ab</sup>	3,971 <sup>a</sup>

Tab. 45 - Significatività relative all'analisi dei valori degli amminoacidi liberi delle farine delle due cv (Luetta e Leccardina) in località Folta (700 m s.l.m.) e località Breda (1000 m s.l.m.) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità degli amminoacidi liberi delle farine all'interno della popolazione (Luetta e Leccardina) alle due altitudini (fattore varietà). Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

Dall' ANOVA ad una via è possibile osservare nel 2009 una leggera variazione in positivo nel contenuto in amminoacidi totali per la cultivar Leccardina all'altitudine maggiore (Fig. 33). Più in dettaglio si evidenzia una diminuzione a carico della prolina ed un aumento a favore di alanina e serina che come emerso dalle analisi, rappresentano i tre principali amminoacidi nella farina di castagna.

La Luetta subisce un deciso e significativo aumento del contenuto in amminoacidi a 1000m s.l.m. rispetto ai 700 senza però subire particolari variazioni nella composizione (Fig. 33).

Nel 2010 il contenuto in amminoacidi della cultivar Leccardina si mantiene invariato tra le due altitudini mentre si osserva ancora una deciso significativo aumento nella Luetta a 1000m s.l.m. che quindi presenta lo stesso profilo amminoacidico nel 2009 e nel 2010 (Fig. 33).



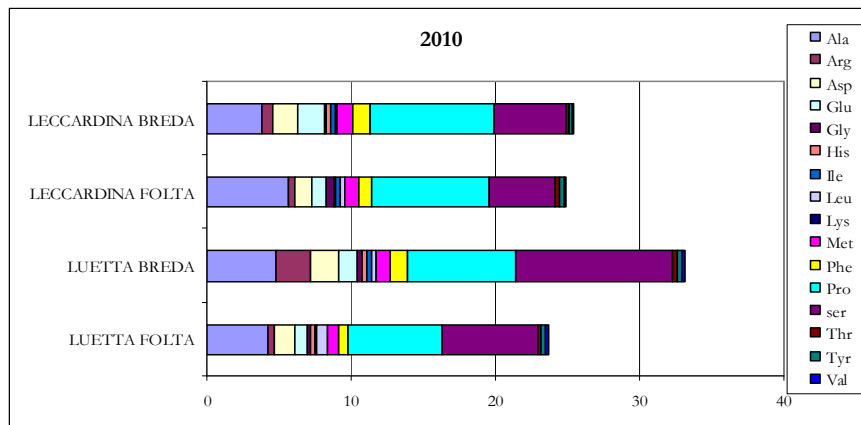


Fig. 33 - Profilo amminoacidico delle farine ottenute dalle varietà Luetta e Leccardina in località Folta (700m. s.l.m.) e Breda (1000m. s.l.m) negli anni 2009(sopra) e 2010 (sotto). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P < 0,05$ ).

Per quanto riguarda la sommatoria degli amminoacidi essenziali, dall'ANOVA a due vie non si evidenziano particolari cambiamenti nel loro contenuto nei due anni di sperimentazione (Tab 43), mentre nell'analisi della variabilità sul fattore varietà si ha un aumento significativo del loro contenuto ad altitudine maggiore per la cultivar Luetta così come per la cv Leccardina anche se statisticamente poco significativo (Tab. 44).

In figura 34 si può osservare come il contenuto in amminoacidi essenziali sia aumentato per entrambe le cultivar nel 2009 a 1000 m s.l.m., in particolare con un sostanziale aumento a carico dell'istidina (His) nella Leccardina. Al contrario nel 2010 non si sono evidenziate particolari variazioni.

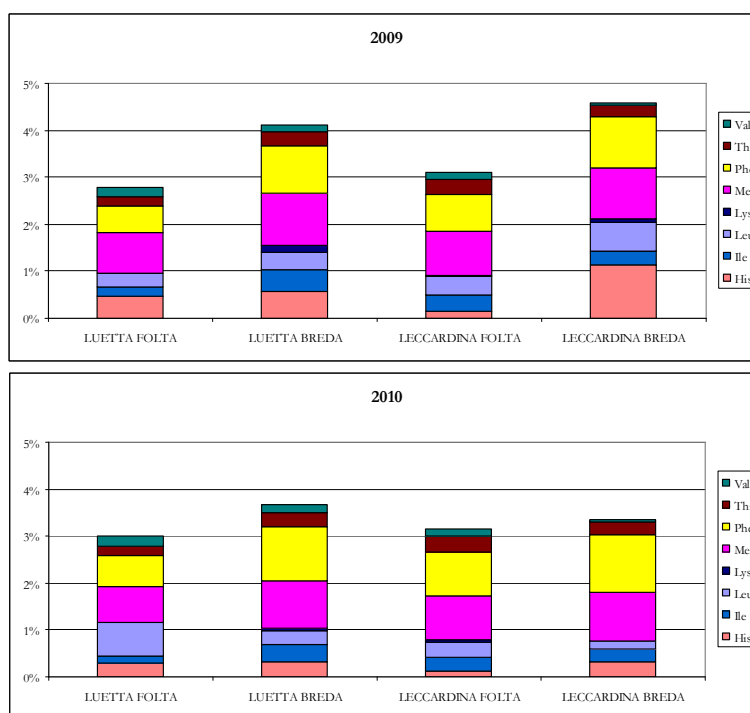


Fig. 34 - Profilo in amminoacidi essenziali delle farine ottenute dalle cultivar analizzate negli anni 2009 (sinistra) e 2010 (destra). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P < 0,05$ ).

I valori ottenuti per la capacità antiossidante delle farine in esame ed elaborati statisticamente con l'ANOVA a due vie, hanno evidenziato una generale diminuzione di questi dal 2009 al 2010 (Tab. 46). Inoltre l'analisi del fattore varietale evidenzia come sia Luetta sia Leccardina abbiano contribuito nella diminuzione del potere antiossidante (Tab. 47).

<b>VALORI NUTRIZIONALI</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>Pr&gt;Diff</b>
TEAC	4,243 <sup>a</sup>	2,678 <sup>b</sup>	< 0,0001

Tab. 46 - Significatività relative all'analisi della capacità antiossidante delle farine delle due cv (Luetta e Leccardina) in località Folta (700 m s.l.m.) e località Breda (1000 m s.l.m.) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata l'interazione tra il fattore anno ed i valori della capacità antiossidante delle farine. Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

<b>VALORI NUTRIZIONALI</b>	<b>Luetta Folta</b>	<b>Luetta Breda</b>	<b>Leccardina Folta</b>	<b>Leccardina Breda</b>
TEAC	2,881 <sup>a</sup>	3,318 <sup>a</sup>	3,390 <sup>a</sup>	3,626 <sup>a</sup>

Tab. 47 - Significatività relative all'analisi della capacità antiossidante delle farine delle due cv (Luetta e Leccardina) in località Folta (700 m s.l.m.) e località Breda (1000 m s.l.m.) secondo il test statistico ANOVA a due vie e test di Tukey per i due anni di studio (2009 e 2010). In tabella viene valutata la variabilità della capacità antiossidante delle farine all'interno della popolazione (Luetta e Leccardina) alle due altitudini (fattore varietale). Sulla riga viene espressa la significatività tramite l'utilizzo di lettere.

In figura 35 vengono espressi i risultati dell'analisi sul potere antiossidante (TEAC): la cv Luetta mostra, nel 2009, un aumento significativo del potere antiossidante all'altitudine maggiore (Breda), al contrario di quello della cv Leccardina che a Breda mostra nello stesso anno una diminuzione del TEAC. Nel 2010, mentre la cv Luetta non subisce particolari variazioni, la cv Leccardina mostra un incremento significativo quando la pianta si trova in località Breda (Fig. 35).

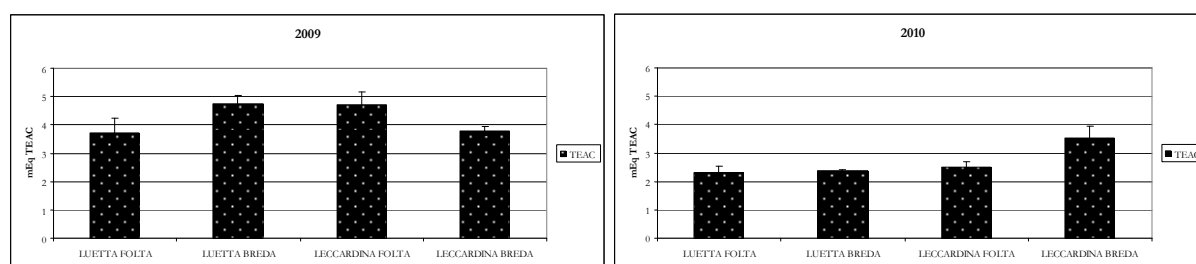


Fig. 35 – Potere antiossidante espresso in mEq di TEAC delle farine ottenute dalle cultivar analizzate negli anni 2009 (sinistra) e 2010 (destra). La significatività è stata valutata mediante test di Tukey ( $P < 0,05$ ).

#### 4. Correlazione e analisi discriminante

I dati ottenuti dalle analisi chimiche sono stati analizzati statisticamente al fine di comprendere le relazioni tra le cultivar in esame. Dalle analisi delle componenti principali (PCA) sia per i dati ottenuti nel 2009 sia per quelli del 2010 è stato possibile discriminare i profili chimici di tutte le farine analizzate. In figura 36 sono riportati i risultati relativi alle analisi 2009, l'analisi spiega il 42,84% della variabilità totale dei campioni analizzati, mentre la PCA dei dati 2010 spiega il 44,36% (Fig. 36). Dai risultati relativi ad entrambi gli anni emerge l'unicità delle farine analizzate, segno evidente che ognuna delle produzioni monovarietalì ha delle evidenti peculiarità compositive dovute in parte alla componente genetica ed in parte alla componente ambientale.

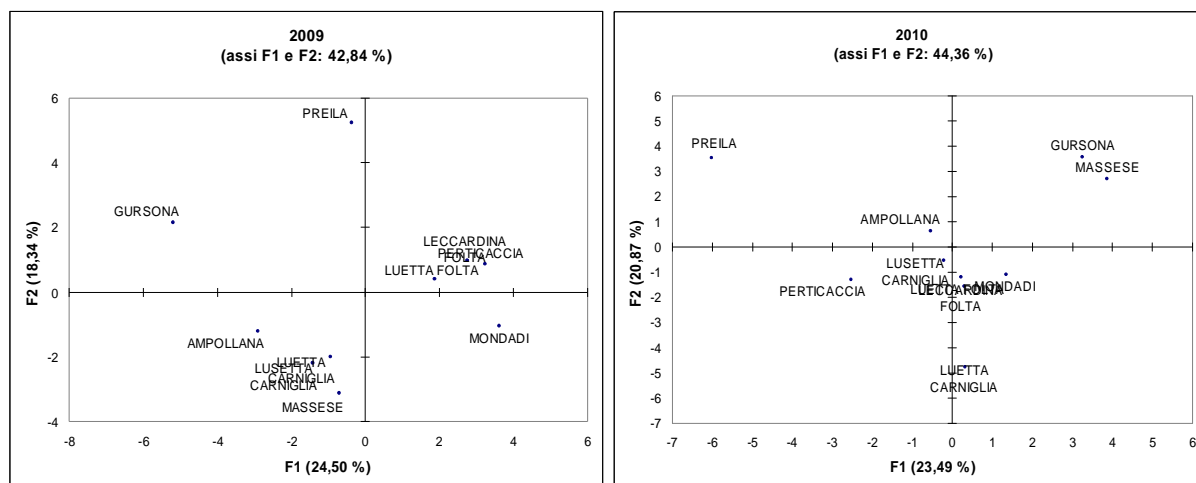


Figura 36 - PCA (Principal Component Analysis) applicata a dati medi di aminoacidi, acidi grassi, analisi centesimali, caratteri nutrizionali relative a farine monovarietalì di castagno; a sinistra sono riportati i risultati dell'elaborazione dei dati dell'anno 2009, e a destra quelli del 2010.

La serie di dati 2009 e 2010 sono quindi risultate indispensabili per la caratterizzazione delle farine in studio. Per avvalorare le analisi effettuate, le due serie di dati sono state poste a confronto al fine di verificare l'esistenza di una correlazione. A tal proposito le matrici di distanza, ottenute separatamente per ogni anno, sono state confrontate statisticamente attraverso il test di Mantel (Mantel, 1967). Le matrici 2009 e 2010 sono risultate non correlate ( $P=0.114$ ) (Tab. 48), questo indica che nonostante ci siano delle differenze negli anni nei due diversi periodi vegetativi le farine delle diverse cv mantengono comunque delle caratteristiche peculiari ascrivibili non solo all'ambiente ma anche al genotipo. Questo dato è confermato dai confronti tra le annate (2009 e 2010) precedentemente descritti (Figg. 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35), da cui emergono leggere differenze tra le farine nei due anni, in cui ad un cambiamento dell'ambiente è corrisposto un lieve aumento o una lieve diminuzione solo di alcuni parametri dei campioni analizzati.

Da quanto detto appare chiaro che il fenotipo (F) è influenzato sia dalla componente genetica (G) sia dalla componente ambientale (A). Per comprendere quali variabili sono strettamente legate all'ambiente

e quali al genotipo è stata impostata un'analisi su 2 ecotipi della cv Luetta (Folta e Breda) e 2 ecotipi della cv Leccardina (Folta e Breda). In questo confronto sono stati usati i profili genetici delle stesse cv. Sono stati quindi posti a confronto le matrici di distanza genetiche (SSR) e quelle delle componenti chimiche totali del 2009 e del 2010 e tra la distanza genetica e i gruppi di componenti chimici quantificati in questo lavoro (Tab. 48). Per semplificare le analisi statistiche si è preferito utilizzare solo la serie di dati relativi alle due cv dell'anno 2010. Dalle analisi è risultato significativo il confronto tra la matrice genetica e la matrice degli Acidi Grassi ( $P=0.033$ , matrice fortemente correlata in quanto il valore de Mantel's  $r(AB)$  è pari a 0,701), inoltre è stato possibile evidenziare una correlazione debolmente significativa ( $P=0.058$ , al limite dell'intervallo di confidenza imposto nell'analisi  $P \leq 0,05$ ) tra la matrice genetica e la matrice delle Caratteristiche Nutrizionali ( $P=0.058$ , matrice fortemente correlata in quanto il valore de Mantel's  $r(AB)$  è pari a 0,771) (Tab. 48). In base a questi dati sono state successivamente scelte alcune variabili che potessero caratterizzare i genotipi indipendentemente dall'ambiente; dopo ripetute analisi statistiche, sono state selezionate alcune variabili (Acido Palmitico, Acido Oleico, Acido Linoleico, Acido Linolenico, MUFA/PUFA, %Umidità, %Grasso, Prolina e Tirosina) denominate “variabili scelte”, strettamente correlate al genotipo ed è stato effettuato il confronto con la matrice genetica (Tab. 48); in questo caso la correlazione è risultata significativa ( $P=0,032$ ) e le matrici sono risultate fortemente correlate (Mantel's  $r(AB)=0,867$ ). Le variabili sono state scelte sia in base alla significatività dei test (Acido Palmitico, Acido Oleico, Acido Linoleico, Acido Linolenico), sia poiché ritenute interessanti dal punto di vista della variabilità tra le cv utilizzate come modello (%Umidità, %Grasso, Prolina e Tirosina).

Prima matrice	Seconda matrice	Mantel's $r(AB)$	p – value
Dati chimici 2009	Dati chimici 2010	-0,230	0,114
Genetica (SSR) Luetta vs Leccardina	Dati chimici Luetta vs Leccardina 2009	0,654	0,126
Genetica (SSR) Luetta vs Leccardina	Dati chimici Luetta vs Leccardina 2010	0,445	0,321
Dati chimici Luetta vs Leccardina 2009	Dati chimici Luetta vs Leccardina 2010	0,805	0,085
Genetica (SSR) Luetta vs Leccardina	Aminoacidi 2010	0,311	0,431
Genetica (SSR) Luetta vs Leccardina	Acidi Grassi 2010	0,701	<b>0,033*</b>
Genetica (SSR) Luetta vs Leccardina	Analisi Centesimali 2010	0,377	0,435
Genetica (SSR) Luetta vs Leccardina	Caratteri Nutrizionali 2010	0,771	<b>0,058</b>
Genetica (SSR) Luetta vs Leccardina	Variabili scelte	0,867	<b>0,032*</b>

Tabella 48 - Risultati della correlazione tra matrici di similarità attraverso il Mantel's test tra i dati totali dei due anni, tra i dati delle cv Luetta e Leccardina. La matrice di similarità è stata ottenuta calcolando le distanze euclidee. L'ipotesi nulla ( $H_0$ ) di non correlazione è rifiutata quando la p – value è < a 0,05 ed è evidenziata con l'asterisco (\*).

Utilizzando le “variabili scelte” sulle cv Luetta e Leccardina, e solo per l'anno 2010, è stata effettuata una PCA di controllo; questa analisi spiega il 93.96% della variabilità totale (solo la F1 spiega l'83.88%) (Fig. 37) e mostra come i 4 individui possano essere raggruppati in due classi: la classe Luetta comprendente tutti gli ecotipi di Luetta, e la classe Leccardina comprendente gli ecotipi di Leccardina (Fig. 37).

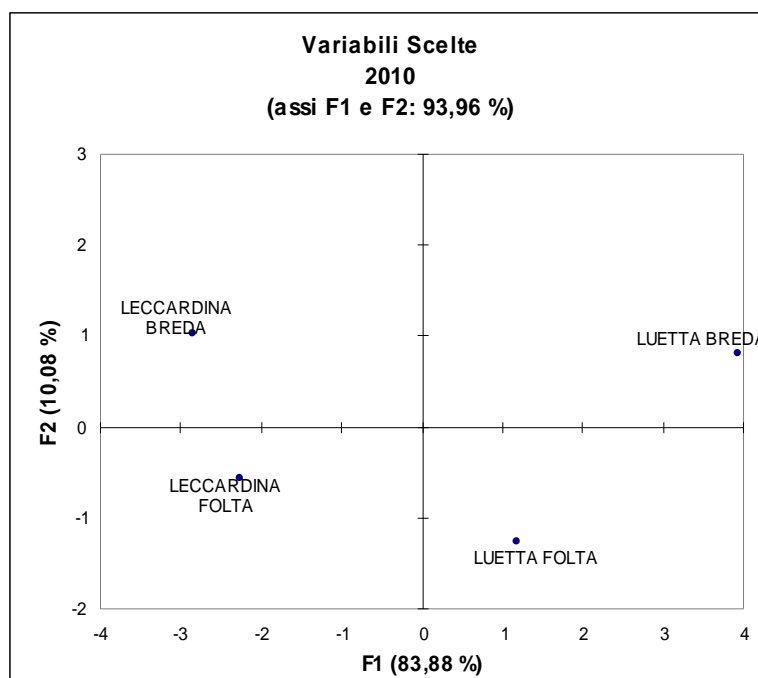


Figura 37 - PCA (Principal Component Analysis) applicata a dati medi scelti in base alla capacità di caratterizzare farine delle cultivar Luetta e Leccardina indipendentemente dall'influenza dell'ambiente. I caratteri selezionati sono: Acido Palmitico, Acido Oleico, Acido Linoleico, Acido Linolenico, MUFA/PUFA, %Umidità, %Grasso, Prolina e Tirosina.

Una volta isolate le variabili chimiche capaci di discriminare i genotipi, l'analisi di correlazione è stata testata sulle 12 farine in analisi nei due anni, sempre in comparazione con le matrici di distanza genetica delle stesse cv (Tab. 49). Dai confronti è emerso che la matrice genetica mostra correlazione con le matrici delle "variabili scelte" relativa sia ai dati del 2009 ( $P < 0.004$ ) sia ai dati del 2010 ( $P < 0.008$ ). Un ulteriore controllo è stato effettuato comparando le matrici di distanza delle variabili scelte 2009 con quelle del 2010, anche in questo caso la correlazione tra le matrici confrontate è risultata significativa (Tab. 49). Questo risultato conferma l'ipotesi secondo la quale le variabili scelte possano essere utilizzate come variabili discriminanti e quindi come marcatori chimici di identificazione varietale.

Prima matrice	Seconda matrice	Mantel's $r(AB)$	p - value
Genetica (SSR)	Variabili scelte cv totali 2009	0,412	<b>0,004*</b>
Genetica (SSR)	Variabili scelte cv totali 2010	-0,403	<b>0,008*</b>
Variabili scelte cv totali 2009	Variabili scelte cv totali 2010	-0,346	<b>0,018*</b>

Tabella 49 - Risultati della correlazione tra matrici di similarità attraverso il Mantel's test tra i dati delle 12 cv. La matrice di similarità è stata ottenuta calcolando le distanze euclidee. L'ipotesi nulla ( $H_0$ ) di non correlazione è rifiutata quando la p - value è  $< 0.05$  ed è evidenziata con l'asterisco (\*).

## VIII CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dallo studio molecolare, fenotipico e chimico presentati in questo lavoro ci permettono di trarre alcune conclusioni riguardo al germoplasma castanicolo presente nelle Valli del Ceno e del Taro.

- **Analisi molecolari :**
  - sono state individuate e georeferenziate 30 cultivar di castagno nelle Valli del Ceno e del Taro.
  - i marcatori SSR si sono rivelati un ottimo metodo di analisi. Con l'utilizzo di soli 8 coppie di primer sono stati caratterizzati 25 genotipi ed individuati 3 casi di sinonimia e 1 di omonimia.
  
- Tra i genotipi caratterizzati sono state selezionate le 10 cultivar maggiormente diffuse sul territorio e di queste è stata effettuata la caratterizzazione chimica delle farine monovarietalì. Le analisi chimiche hanno messo in evidenza alcuni aspetti del contenuto nutrizionale:
  - basso contenuto in umidità relativa con valori compresi in un intervallo tra 4,105 e 4,552%;
  - basso tenore di grassi, con un valore compreso tra 3,921 e 4,523%;
  - buon profilo lipidico dominato dall'acido oleico, linoleico e palmitico, ricco in acidi grassi essenziali (acido linoleico e linolenico), con un' elevata quantità di acidi grassi insaturi e con un rapporto MUFA/PUFA il cui valore oscilla tra 0,995 e 1,014 ;
  - tenore proteico non elevato, compreso tra 3,869 e 4,441%
  - buon profilo di amminoacidi liberi nel quale sono presenti anche diversi amminoacidi essenziali (istidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina e valina);
  - alto contenuto in carboidrati totali compreso tra il 77,358 e il 78,458%
  - potere antiossidante compreso in un intervallo tra 3,173 e 4,795 mEq TROLOX.

I risultati ottenuti offrono una maggiore conoscenza sulla composizione chimica della farina di castagne, mettendone in risalto i numerosi pregi.

I dati chimici raccolti sono stati quindi analizzati su base statistica tramite Mantel test (Tabb. 48 e 49) e analisi delle componenti principali (Fig. 37); questa rielaborazione ha permesso la discriminazione delle 10 cultivar in esame tramite l'utilizzo di 9 caratteri scelti (Palmitico, Acido Oleico, Acido Linoleico, Acido Linolenico, MUFA/PUFA, %Umidità, %Grasso, Prolina e Tirosina) correlati con la matrice

genetica, quindi questi caratteri possono essere considerati marcatori chimici per l'identificazione varietale.

- Al fine di valutare come l'altitudine possa influenzare la composizione chimica delle farine e ed i caratteri morfologici della pianta, sono state infine individuate due cultivar (Luetta e Leccardina) estesamente coltivate nell'Appennino parmense e con caratteristiche carpologiche differenti.

Da questi risultati possiamo concludere che le due cultivar alle diverse altitudini possiedono caratteri cultivar dipendenti e caratteri influenzati dalle variabili ambientali.

Al fine di semplificare la comprensione degli effetti dell'altitudine sulle due cultivar le conclusioni riguardanti questo aspetto sono riportate per tipologia di carattere (fenologico, morfologico, e chimico).

Dal punto di vista fenologico si assiste ad un ritardo nelle fasi fenologiche considerate per entrambe le cultivar (epoca di fioritura, fine accrescimento e maturazione del frutto) di 10 giorni all'altitudine maggiore (Tab. 25).

Dal punto di vista morfologico:

- FOGLIA (comportamento a 1000 m. s.l.m. rispetto a 700 m. s.l.m. )

- Luetta: diminuzione lunghezza picciolo, aumento larghezza massima lamina fogliare
- Leccardina: aumento lunghezza del picciolo, aumento della lamina fogliare

- FIORI MASCHILI o AMENTI (comportamento a 1000 m. s.l.m. rispetto a 700 m. s.l.m. )

- Luetta: diminuzione numero amenti per germoglio, diminuzione lunghezza amento, diminuzione larghezza amento.
- Leccardina: diminuzione lunghezza amento, diminuzione larghezza amento.

- FIORI FEMMINILI (comportamento a 1000 m. s.l.m. rispetto a 700 m. s.l.m. )

- Luetta: diminuzione numero stili, diminuzione lunghezza stili, diminuzione diametro trasversale.
- Leccardina: aumento lunghezza stili.

- CUPOLA o RICCIO (comportamento a 1000 m. s.l.m. rispetto a 700 m. s.l.m. )

- Luetta: diminuzione dimensione riccio, diminuzione larghezza minima riccio, diminuzione larghezza massima riccio, diminuzione lunghezza massima, diminuzione lunghezza aculei.
- Leccardina: aumento dimensione riccio, aumento larghezza minima riccio, aumento larghezza massima riccio, aumento lunghezza massima, aumento lunghezza aculei, diminuzione numero valve.

- FRUTTO (comportamento a 1000 m. s.l.m. rispetto a 700 m. s.l.m. )

- Luetta: aumento numero stili per torcia.

- Leccardina: aumento altezza castagna, aumento larghezza castagna, aumento spessore, aumento numero stili per torcia, aumento larghezza cicatrice ilare, aumento peso della castagna, aumento volume castagna.

Per quanto riguarda i caratteri cultivar dipendenti è possibile concludere che il numero di glomeruli, il numero degli stili, il diametro longitudinale del fiore femminile e le dimensioni del frutto possono essere considerati come marker morfologici per la classificazione varietale.

Dal punto di vista chimico:

- ANALISI CENTESIMALE (comportamento a 1000 m. s.l.m. rispetto a 700 m. s.l.m. )
  - Luetta: aumento percentuale proteine
  - Leccardina: leggera diminuzione percentuale umidità relativa
- VALORI NUTRIZIONALI (comportamento a 1000 m. s.l.m. rispetto a 700 m. s.l.m. )
  - Luetta: leggero aumento acidi grassi polinsaturi (PUFA)
  - Leccardina: leggero aumento acidi grassi polinsaturi (PUFA)
- AMMINOACIDI (comportamento a 1000 m. s.l.m. rispetto a 700 m. s.l.m. )
  - Luetta: aumento Ala, Asp, Glu, Ile, Lys, Met, Phe, Ser, Thr,  $\Sigma$  aa essenziali, diminuzione Val.
  - Leccardina: aumento Ala, Asp, Glu, His, Met, Phe,  $\Sigma$  aa essenziali, diminuzione Gly, Ser, Thr, Tyr, Val.



## IX BIBLIOGRAFIA

- ABDALLAH, A., AHUMADA, M.H., GRADZIEL, T.M., 1998. Oil content and fatty acid composition of almond kernels from different genotypes and California production regions. *Journal of American Society and Horticulture* 123: 1029–1033.
- AKKAK A., MARINONI D., BOTTA R., EDWARDS K., BOUNOUS G. 2002. Isolation and characterisation of micro satellite sequenze in *Castanea sativa* mill. VI GIORNATE SCIENTIFICHE SOI Spoleto 23-25 Aprile. 13-14.
- ALLARD J. P., AGHDASSI E., CHAU J., TAM C., KOVACS C. M., SALIT I. E., WALMSLEY S.L. 1998. Effects of vitamin E and C supplementation on oxidative stress and viral load in HIV-infected subjects. *AIDS*(London, U.K.) 12: 1653–1659.
- AMSLER M. 1900 Flore interglaciaire de Piànico, *Compte Rendu des travaux de la Societé Helvétique de Sciences Naturelles réunie à Thusis.* 44–46.
- ANTOGNOZZI E., 1986. Osservazioni sulle cultivar di castagno da frutto in Umbria. Giornata di studio sul castagno, SOI, 6–7 novembre, Caprarola, Viterbo.
- AOAC (1990) *Official methods of analysis* (15th ed) Washington, D.C.: associational of official analytical chemists.
- ATTANASIO G., CINQUANTA L., ALBANESE D., MATTEO M., 2004. Effects of drying temperature on physico-chemical properties of dried and rehydrated chestnuts (*Castanea sativa*). *Food Chem.* 88: 583-590
- AVOLIO S., BASSI D., BOUNOUS G. C., CASINI E., DE BENI F., GRASSI G., SANSAVINI S. 1979. *Aspetti produttivi.*
- BAGLIONI A., 1907. *Di alcune varietà di castagno* (Atti Acc. Georg.), Firenze.
- BAGNARESI U., BASSI D., CASINI E., CONTICINI L., MAGNANI G.P. 1977. Contributo alla individuazione delle cultivar di castagno Tosco-Emiliane. In *Giornata del Castagno*, 3 dicembre, Caprese Michelangelo (Arezzo).
- BALDINI E., 1958. Contributo allo studio delle cultivar di Castagno della provincia di Arezzo. Pubblicazione N. 5 “Centro di studio sul castagno”. Supplemento a “La ricerca scientifica”
- BALDINI E., MARANGONI B. 1993. *Coltivazioni Arboree.* Ed. Cooperativa Libreria Universitaria, 278 e sgg. Bologna.
- BALDINI E., SCARAMUZZI F. 1952. Sul valore dei dati biometrici nella descrizione e classificazione delle razze di olivo in coltura. Estratto dagli *Annali della Sperimentazione Agraria* (nuova serie), 1 – 40. Roma.

- BALKWILL, F., MANTOVANI, A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357: 539–545.
- BALTA F., BATTALP., BALTA M.F., YORUK H.I. 2009. Free sugar compositions based on kernel taste in almond genotypes *Prunus dulcis* from Eastern Turkey. *Chem Nat Compd* 45:221–224.
- BARCACCIA G., ALBERTINI E., ROSELLINI D., TAVOLETTI S., VERONESI F. 2000. Inheritance and mapping of 2n egg production in diploid alfalfa. *Genome* 43: 528–537.
- BARONI E. Guida Botanica d'Italia. Cappelletti editore. Bologna, p. 360.
- BARREIRA J.C.M., FERREIRA I.C.F.R., OLIVEIRA M.B.P.P., PEREIRA J.A. (2008). Antioxidant activities of extracts from chestnut flower, leaf, skin and fruit. *Food chem.* 107: 1106-1113.
- BARREIRA J.C.M, ALVES R.C., CASAL S., FERREIRA I.C.F.R, OLIVEIRA M.B.P.P AND PEREIRA J.A. 2009a. Vitamin E profile as a reliable authenticity discrimination factor between chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars. *J Agric Food Chem* 57: 5524–5528
- BARREIRA JCM, ALVES RC, CASAL S, FERREIRA ICFR, OLIVEIRA MBPP AND PEREIRA JA, 2009b. Nutritional, fatty acid and triacylglycerol profiles of *Castanea sativa* Mill. cultivars: a compositional and chemometric approach. *J Agric Food Chem* 57: 2836–2842.
- BASSI D., MARANGONI B. 1984. Contributo allo studio varietale del castagno da frutto (*Castanea sativa* Mill.): caratteri biometrici e analisi chimico-fisiche dei frutti. *Rivista di Frutticoltura*, 6: 43–46.
- BELL C.J., ECKER J.R. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics*. 19: 137-144.
- BELLETTI P., MONTELEONE I., TERZUOLO P.G., BRENTA P.P., 2002. Variabilità genetica e differenziazione tra popolazioni alpine e collinari di pino silvestre in Piemonte. *Monti e Boschi* 2: 25-30.
- BELLINI E., GIORDANI E., GIANNELLI G., PICARDI E., 2007. Le Specie Legnose da Frutto. Liste dei caratteri descrittivi. *The Fruit Woody Species. Descriptor List. ARSIA. Firenze.* 417-437.
- BOCCHIALINI F. 1913. I marroni di Campora. A. Pelati. Parma.
- 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.
- BORGES O., GONÇALVES B., CARVALHO J.L.S., CORREIA P. SILVA A.P. 2008. Nutritional quality of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Food Chem* 106: 976–984
- BORGES O.P.; CARVALHO J.S., CORREIA P.R., SILVA A.P. 2007. Lipid and fatty acid profiles of *Castanea sativa* Mill. chestnuts of 17 native Portuguese cultivars. *J. Food Comp. Anal.* 20: 80– 89.
- 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. 2005. Sulle orme del castagno (*Castanea* spp.) p. 74.

- BOUNOUS G., GIACALONE, G. 1992. Chestnut storage, processing and usage in Italy. In Paper presented at the world chestnut industry conference, Morgantown, WV, July 8–10.
- BOUNOUS G., TORELLO MARINONI D. 2005. Chestnut: Botany, Horticulture, and Utilization. Edit. J. Janick; Wiley & Sons Inc., New Jersey. Horticultural Reviews, vol 31: 291-347.
- BREISCH H. 1995. Châtaigne et Marrons. Centre technique interprofessionnel des fruits et legume. Pp 64-65.
- BREISCH, H. (1993). Harvesting storage and processing of chestnuts in France and Italy. In Proceedings of the 1st international congress on chestnut, Spoleto, Italy, October 20–23. Perugia: University of Perugia Press.
- BREVIGLIERI N., 1955. Indagini ed osservazioni sulle migliori varietà italiane di castagno. *Castanea sativa* Mill. Supplemento a la ricerca scientifica. Anno 25°. Centro di studi sul castagno. Pubblicazione N. 2
- BUCK E.J, HADONOU M., JAMES C.J., BLAKESLEY D. AND RUSSEL K.L., 2003 Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Molecular Ecology Notes*, 3:239-241.
- BUTLER, L. G. 1989. Effects of condensed tannin on animal nutrition. In *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*, eds. R. W. Hemingway & J. J. Karchesy. Plenum Press, New York, USA, pp 391-402.
- CANTINI C., AUTINI A., RIZZELLO R., NITTI D. 2009. Caratterizzazione molecolare e recupero del germoplasma castanico delle colline Metallifere. In Atti del 5° Convegno Nazionale Castagno 13-16 Ottobre. Cuneo. 54-55.
- CERVERA M.T., CABEZAS J.A., SANCHA J.A., MARTINEZ DE TODA F., MARTINEZ-ZAPATER JM., 1998. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis Vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 51-59.
- CHAKRABORTY R., KIMMEL M., STIVERS D.N., DAVISON L.J., DEKA R., 1997. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceedings of the National Academy of Science*, 94, 1041–104
- CIPRIANI G., MARRAZZO M.T., MARCONI R., CIMATO A., TESTOLIN R. (2002) Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet*, 104:223-228.
- CLAUSEN T. P., PROVENZA, F. D., BURRITT, E. A., REICHARDT P. B. & BRYANT J. P. 1990. Ecological implication of condensed tannin structure: a case study. *J. Chem. Ecol.*, 16, 2381-92.
- 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.

- 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.
- COOK S.I., SELLIN J.H. 1998. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther* 12:499–507.
- DE LA MONTAÑA MÍGUELEZ J., MÍGUEZ BRNÁNDEZ M., GARCÍA QUEIJEIRO J.M., 2003. Composition of varieties of chestnuts from Galicia (Spain). *Food Chemistry* 84: 401–404.
- DE VASCONCELOS M.C.B.M., BENNETT R.N., ROSA E.A.S., FERREIRA-CARDOSO J.V. 2010a. Composition of european chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: fresh and processing products. *J Sci Food Agric*; 90: 1578–1589
- DE VASCONCELOS M.C.B.M., NUNES F., GARCIA VIGUERA C., BENNETT R.N., ROSA E.A.S., FERREIRA-CARDOSO J. V. 2010c Industrial processing effects on chestnut fruits (*Castanea sativa* Mill.) 3. Minerals, free sugars, carotenoids and antioxidant vitamins. *International Journal of Food Science and Technology*. 45: 496–505
- DEMIRKESEN I., MERT B., SUMNU S. 2010. Utilization of chestnut in gluten-free bread formulations. *Journal of food engineering*, 329-336.
- DESMAYSON A. M., & ADRIAN J., 1986. La palce de la chatâigne en alimentacion. *Medicine et Nutrition*. 22(3): 174-180.
- DESMAYSON A.M., MARCHER M.H., TIXIER M. 1984. Changes in the free and total amino acid composition of ripening chestnut seeds. *Phytochemistry*. 11(23): 2453-2456.
- ELORRIETA, J., 1949. El castaño en España. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Ministerio de Agricultura. Dirección General de Montes, Caza y Pesca Fluvial. Madrid, Ediciones Ares. 303.
- 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 del IV Convegno Nazionale Castagno 2005. Montella (AV) 20-22 ottobre: 167-170.
- ERTAN E., 2007. Variability in leaf and fruit morphology and in fruit composition of chestnut (*Castanea sativa* Mill) in the Nazilli region of Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 54: 691-699.
- EYNARD I., PAGLIETTA R., 1966. Contributo allo studio di cultivar di castagno della Provincia di Torino. Atti Conv. Inter. I castagneti oggi e domani, Cuneo, C.C.I.A.A.
- FABBRI A., PONCHIA G., SCAREL A., 1985. Osservazioni pomologiche su alcune cultivar di castagno delle Valli del Natisone. *L'informatore Agrario*. Verona.
- FAO Corporate Document Repository. Regional Office for Europe Interregional Cooperative Research Network on Nuts.
- FENAROLI L., GAMBI G., 1976. Alberi. Museo Tridentino di Scienze Naturali. Trento.

- FERNAROLI L., 1945 Trattati di Agricoltura Vol.1 Il Castagno. Roma.
- FERREIRA-CARDOSO, J. V. 2000. Caracterizaco e valorizaco do fruto de *Castanea sativa* Mill. Composico qumica, valor nutritivo e efeito da sua utilizaco na engorda de porcos Duroc. PhD Tesis, UTAD, Portugal.
- FINESCHI S., MALVOLTI M.E., MORGANTE M., VENDRAMIN G.G. 1994. Allozyme variation within and among cultivated varieties of sweet chestnut (*Castanea sativa*). Canadian Journal of 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 Ecology 9, 1495–1503.
- FINESCHI S., TAURCHINI D., VILLANI F., VENDRAMIN G. G., 2001 Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries.
- FISCHER IN A. BALTZER, 1893 Glazialgeologisches von der Sdseite der Alpen (1. Pinico-Sllere), *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. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 73(2):259-263.
- GEROLA M. & GEROLA D. 1986. Botanica per I corsi di medicina e veterinaria e di Scienze della Produzione animale. Ed. Unione Tipografica Editrice Torinese, 61-69.
- 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.
- GONÇALVES B., BORGES O., SOARES COSTA H., BENNETT R., SANTOS M., SILVA A.P. 2010. Metabolite of chestnut (*Castanea sativa* Mill) upon coking: proximate analysis, fibre, organic acids and phenolics. Food Chemistry 122: 154–160
- GOULO 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.
- GREGORIUS H.R., 1991. Gene conservation and the preservation of adaptability. In: Seitz A., Loeschke V. (Ed.), Species conservation: a population-biological approach. Birkhuser Verlag, Basel. 31-47.
- HARPER, J. M. 1981. Extrusion of foods (Vol. II). Boca Raton: CRC Press.
- HASLAM E., LILKY T. H. 1988. Natural astringency of foodstuffs: molecular interpretation foodsluRs: a mokcular interpretation. CRC Rev. Food Sci. Nutr. 27: I-40.
- IMPELLUSO L. 2003. La Natura e I suoi simboli. Mondadori Electra S.p.a. 187.

- ITALIAN FOOD COMPOSITION TABLE. 1997. Chapter I. Carnovale, E., Marletta, L., Eds.; Istituto Nazionale della Nutrizione: Milano
- ITOH, N., MASUO, Y., YOSHIDA, Y., CYNISHI, O., JISHAGE, K., NIKI E. 2006.  $\gamma$ -Tocopherol attenuates MPTP-induced dopamine loss more efficiently than R-tocopherol in mouse brain. *Neurosci. Lett.* 403: 136–140.
- JAYNES R. A. 1975. “Chestnut” In: *Advances in fruit breeding*. Janick J., Moor J. (eds); Purdue Univ. Press, West Lafayette (IN), USA: 490-503.
- KAZANTZIS I, NANOS GD, STAVROULAKIS GG ., 2003. Effect of harvest time and storage conditions on almond kernel oil and sugar composition. *J Sci Food Agric* 83:354–359
- KÖHLER, F.E. 1890. *Medizinal Pflanzen*, vol. 3: t. 70
- KONTUSH, A., FINCKH, B., KARTEN, B., KOHLSCHUTTER, A., BEISIEGEL, U. 1996 Antioxidant and prooxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J. Lipid Res.*, 37: 1436–1448.
- KOTOBUKI K. 1996. Evaluation of characteristics of chestnut genetic resources. In: *Cultivation and Evaluation of Fruit Tree PGR*, Ref. N° 9. Japan International Cooperation Agency. 91-101.
- KREBS P., CONDERA M., PRADELLA M., TORRIONI D., FELBER M., TINNER W. 2004. Quaternary refugia of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): an extended palynological approach. *Vegetation History and Archeobotany* 13:145-160
- KÜNSCH U., SHÄRER H., PATRIAN B., HÖHN E., CONEDERA M., SASSELLA A., JERMINI M., JELMINI G. 2001. Effects of roasting on chemical composition and quality of different chestnut (*Castanea sativa* Mill.) varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 1106–1112.
- LAMPIRE O., MILA I., RAMINOSO V., HERVE DU PHENOAT C., FAUCHEUR N., LAPREVOTE O. 1998. Polyphenols isolated from the bark of *Castanea sativa* Mill. Chemical structures and autoassociation in honour of Pr G.H. Neil Towers 75th birthday. *Phytochemistry*, 49, 623–631.
- LAVIALLE G.B. 1911. *Essai de la classification du genre Castanea* Ed Arn. Pomp.
- LEE C.Y. J., WAN J.M.F. 2000. Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women. *J. Nutr.*, 130: 2932–2937.
- LIBBY P., RIDKER P. M., MASERI A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135–1143.
- MANTEL N., 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research*, 27, 209-220.
- MARINONI D., AKKAK A., BOUNOUS G., EDWARDS K.J. AND BOTTA R., 2003. Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* Mill. *Molecular Breeding*. 11: 127-136.

- MARINONI D., AKKAK A., G BOUNOUS, EDWARDS K. J., BOTTA R. 2003. Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.) *Molecular Breeding* 11: 127–136.
- MARTIN C., SMITH A. M., 1995. Starch Biosynthesis. UK. *The Plant cell*, Vol. 7: 971-985.
- 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.
- MCCARTY M.A. AND MEREDITH F.I. 1988. Nutrient data on chestnuts consumed in the United States. *Econ.Bot.*, 42: 29-36.
- MCCARTY M.A. AND MEREDITH F.I. 1988. Nutrient data on chestnuts consumed in the United States. *Econ.Bot.*. 42: 29-36
- MCGEER P. L., MCGEER E.G. 2001. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging*. 22: 799–809.
- MENDES DE VASCONCELOS, M., & DO, C. B. (2007). Primary and secondary.
- MENEGHETTI S., BARCACCIA G., PONCHIA G., LUCCHINI 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.
- MEREDITH, F. I., MCCARTHY, M. A., & LEFFLER, R. 1988. Amino acid concentrations and comparison of different hydrolysis procedures for American and foreign chestnuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(6): 1172–1175.
- MERENDI A. 1954. *Enciclopedia Agraria Italiana*. Ramo editoriale degli agricoltori. 307-319. Roma
- MEYER K. H., BERNFELD P. 1940. Recherches sur l'amidon V. L'amylopectine. *Helv Chim. Acta* 23:875.
- MICHELI P.A. 1723. *Rariorum plantarum*. Musei Micheliani. Conservato presso: 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 characteristics of chestnut *Castanea sativa* from the area of una-sana canton.
- MÜLLER-STARCK G. 1991. Survey of genetic variation as inferred from enzyme gene markers. In: Müller-Starck G., Ziehe M. (Ed.), *Genetic variation in European populations of forest trees*, Sauerländer's Verlag, Frankfurt a.M. 20-37.
- MULLIS K., FALOONA B., SHARF S., SAIKI R., HORN G., ERLICH H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol* 51: 263-273.

- NERI L., DIMITRI G., SACCHETTI G. 2010. Chemical composition and antioxidant activity of cured chestnuts from three sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) ecotypes from Italy. *Journal of food composition and analysis* 23: 23-29.
- NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). 1989B. RDA (RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES) Subcommittee on the 10th edition of the RDAs 1989 Recommended Dietary Allowances 10th ed., national Academy Press, Washington. 1989.
- PALMBERG-LERCHE C. 1996. Conservazione della diversità biologica e delle risorse genetiche forestali. *Sherwood*, 16: 29-33.
- PARCERISA, J., BOATELLA, J., CODONY, R., FARRA` N, A., GARCIA, J., LOPEZ, A., RAFECAS, M., ROMERO, A. 1993. Influence of variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from Spain: I. Fatty acid composition. *Food Chemistry* 48: 411–414.
- PASSERINI C. 1908. Sulle varietà del castagno. *Atti Acc. Georg.*, Firenze.
- PATRA R. C., SWARUP D., DWIVEDI S. K. 2001. Antioxidant effects of R-tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology*, 162: 81–88.
- PELLEGRINI, N., SERAFINI, M., COLOMBI, C., DEL RIO, D., SALVATORE, S., BIANCHI, M., BRIGHENTI, F., 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assay. *Journal of Nutrition* 133: 2812–2819.
- PEREIRA - LORENZO S. 1996. Variability and Grouping of Northwestern Spanish Chestnut Cultivars. I. Morphological Traits. *Journal of American Society for Horticultural Science*. 121(2): 183-189.
- 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. *Journal of the American Society for the Horticultural Science* 131(6): 770-779.
- PEREIRA-LORENZO S., MARIA LOURENÇO COSTA R., MARÍA RAMOS-CABRER A., ALEXANDRA MARQUES RIBEIRO C., FILIPA SERRA DA SILVA M., MANZANO G., BARRENECHE T. 2010. *Tree Genetics & Genomes* 6: 701–715.
- PEREIRA-LORENZO S., RAMOS-CABRER, A.M., DÍAZ-HERNANDEZ, M.B., CIORDIA-ARA, M. 2005. Características morfológicas e isoenzimáticas de los cultivares de castaño (*Castanea sativa* Mill.) de Asturias, vol. 16. *Monografías INIA, Serie Agrícola*. 541.
- PEREIRA-LORENZO, S., RAMOS-CABRER, A. M., DI´AZ-HERNA´NDEZ, M. B., CIORDIA-ARA, M., & RIOS-MESA, D. 2005. Chemical composition of chestnut cultivars from Spain. *Scientia Horticulturae*, 107(3): 306–314.

- PICCIOLI L., 1902. Monografia del castagno. Suoi caratteri varietà, coltivazione, prodotti e nemici. 25-28. Tipografia Salvatore Landi. Firenze.
- PINNAVAIA G.G., PIZZIRANI S., SEVERINI C., BASSI D. 1993. Chemical and functional characterization of some chestnut varieties Proceedings of the 1st International Congress on Chestnut University of Perugia, Perugia.
- PINNAVAIA, G. G., LERICI, C. R., & MOSCATTI, P. (1984). Proprietà funzionali della farina di castagne in relazione ai processi di cottura-estrazione. *Tecnica Molitoria*, 35(10): 725–732.
- PLINIO C. *Naturalis Historiae*. Tomus XXV 92-93.
- PONCHIA G., AGUANNO M., MENEGHETTI S. 2001. 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., AGUANNO M., MENEGHETTI S., 2001 a. Osservazioni morfologiche, carpometriche e molecolari su alcune piante di castagno del Feltrino. 103-108. Atti Convegno Nazionale CASTAGNO 2001 Marradi (FI).
- PONCHIA G., CELEGATO P., OSSARI E., PASQUALIN A., 2001 b. Prime osservazioni sulle caratteristiche morfologiche e carpometriche di piante di castagno dei Colli Euganei. 137-142. Atti Convegno Nazionale CASTAGNO 2001 Marradi (FI).
- PONCHIA G., FABBRI A., BRUGNA F. 1985. Osservazioni pomologiche su alcune cultivar di castagno della provincia di Trento. *L'informatore Agrario*. Verona.
- QUEIJERO J.M., BLANCO D., DE LA MONTAÑA J., MÍGUEZ M. 2005. Identification and Morphological Description of Chestnut Cultivars of the Region of Verín - Monterrei (Ourense, Spain).
- R DEVELOPMENT CORE TEAM 2005. R: A language and environment for statistical computing R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- RAMOS-CABRER A.M., PEREIRA-LORENZO S. 2005. Genetic relationship between *Castanea sativa* Mill. trees from north-western to south Spain based on morphological traits and isoenzymes. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52(7):879-890.
- REDDY. N. R., PIERSON. M. D., SATHE. S. K. & SALUNKHE. D. K. (1985). Dry bean tannins: a review of nutritional implication. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 63., 541-9.
- RIBEIRO B., RANGEL J., VALENTAO P., ANDRADE P.B., PEREIRA J.A., BOLKE H., SEABRA R.M. (2007). Organic acids in two Portuguese chestnut (*Castanea sativa* Miller) varieties. *Food Chem* 100:504–508
- RICCI, BOVOLO., 1925. I castagneti nel circondario di Mondovì.

- ROBIN, J. P., MERCIER, C., CHARBONNIERE, R., & GUILBOT, A. 1974. Lintnerized starches. Gel filtration and enzymic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry*, 51: 389–406.
- ROSELLI G. C., SCARAMUZZI F., 1974. Definizione dei termini di cultivar e clone. Accademia Nazionale di Agricoltura. Estratto dagli annali – 167° anno – serie quarta fascicolo N. 2 – Bologna.
- AGOSTINUCCI K., MANFREDI T. G., COSMAS A., MARTIN K., HAN S. N., WU D., SASTRE J., MEYDANI S. N., MEYDANI M., 2002. Vitamin E and age alter liver mitochondrial morphometry. *J. Anti-Aging Med.* 5 (2): 173–178.
- SACCHETTI, G., PINNAVAIA, G.G., GUIDOLIN, E., DALLA ROSA. M. 2004. Effects of extrusion temperature and feed composition on the functional, physical and sensory properties of chestnut and rice flour-based snack-like products. *Food Research International* 37 (2004) 527–534.
- SALUNKE D. K. CHAVAN J. K. & KADAM S. S. 1990. Dietary tannins: Consequences and Remedies. CRC Press Inc., Boca Raton. FL. USA.
- SALVINI, S., PARPINEL, M., GNAGNARELLA, P., MAISONNEUVE, P., & TURRINI, A. 1998. Banca dati di composizione degli alimenti per studi epidemiologici in Italia (pp. 370). Milano: Istituto Europeo di Oncologia.
- 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.
- SENER S.D., PAYNE J.A., MILLER G., ANAGNOSTAKIS S.L., 1994. Comparison of total lipids, fatty acids, sugar and non volatile organic acids in nuts from four *Castanea* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65: 223–227.
- SILVA, F., CHOUPINA, I., SOUSA, M. N., & BEIRÃO DA COSTA, M. L. (1994). Extrusion of *Castanea sativa*. In T. Yano, R. Matsuno, & K. Nakamura (Eds.), *Proceeding of 6th international congress on engineering and food*. 882–884. Tokyo: Blackie Academic
- SIMOPOULOS A.P. 2007. The importance of the omega6/omega3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Moywood)*, 233: 674-688
- 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. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 381-394.

- SORDELLI F. 1896. *Flora Fossilis Insubrica*. Studi sulla vegetazione di Lombardia durante i tempi geologici, Cogliati, Milano. 289.
- TAUTZ D. 1988. Hypervariability of simple sequence repeats as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.
- TIXIER, M., & DESMAISON, A. M. 1980. Relation metabolique entre l'arginine et l'acide gamma aminobutyrique dans le fruit de *Castanea sativa*. *Phytochemistry*, 19: 1643–1646.
- TREHANE P., BRICKELL C.D., BAUM B.R., HETTERSCHIED W. L. A., LESLIE A. C., MC NEILL, SPONGBERG S. A., VRUGTMAN F. 1995. *Internatiol Code of Nomenclature for Cultiveted Plants*. Qarterjack Publishing. Wimborne, UK.
- UPOV, 1991 Internation Convention for the Protection of New Varieties of Plants of December 2, 1961 as revised at Geneva on Novembr 10, 1972, on October 23, 1978, and on March 19, 1991.
- ÜSTÜN N., TOSUN Y., & SERDAR U. 1999. Technological properties of chestnut varieties grown in Erfelek district of Sinopy city. *Acta Horticulturae*, 494: 107–110.
- VALDIVIESSO T. 2000. Characterization of cultivars of *Castanea sativa* Mill. *Silva Lusitana* 8(2): 195-213.
- VAUGHAN, J. G., & GEISSLER, C. A. 1997. *The new Oxford book of food plants* (p. xix). New York: Oxford University Press.
- VÀZQUEZ G., GONZÁLEZ-ALVAREZ J., SANTOS J., FREIRE M.S., ANTORRENA G. 2009. Evaluation of potential applications for chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial crops and products* 29: 364
- VIGIANI D. 1900. Il Castagno da frutto nel Casentino., *Agricoltura Italiana*. Fasc. 432: 279 – 291.
- VILLANI F., PIGLIUCCI M., BENEDETTELLI S., CHERUBINI M. 1991. Genetic differentiation among Turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations. *Heredity* 66:131-136.
- VILLANI F., PIGLIUCCI M., BENEDETTELLI S., CHERUBINI M. 1991. Genetic 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.
- WAGNER H.W. E SEFC K.M., 1999. Identity 1.0: freeware program for the analysis of microsatellite data. Vienna. <http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>.
- WANG Z., WEBER J.L., ZHONG G., TANKSLEY S.D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Thoeretical Applied Genetics* 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. DNA 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. Bulletin 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.