

Identification moléculaire des variétés de châtaignier en Suisse

S. ABDELHAMID et P. KÜPFER, Laboratoire de botanique évolutive, Université de Neuchâtel, CH-2000 Neuchâtel
M. CONEDERA, Institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage, sous-station du sud des Alpes, CH-6504 Bellinzona-Ravecchia
C. L. LÊ, Agroscope RAC Changins, Case postale 254, CH-1260 Nyon

E-mail: cong-linh.le@rac.admin.ch
Tél. (+41) 22 36 34 422.

Introduction

Le châtaignier (*Castanea sativa* Mill.) est une espèce qui, peut-être plus que toute autre en Europe, a attiré l'attention de l'homme. Depuis les temps anciens, la culture de châtaignier est devenue dominante et nécessaire pour la survie des populations de montagne. Tant de techniques, de pratiques paysannes et domestiques, de même que tant de traditions y sont associées, qu'il est permis de parler d'une vraie «civilisation du châtaignier» (LIEUTAGHI, 1969).

Au sud des Alpes, la culture du châtaignier est pratiquée depuis deux mille ans (CONEDERA *et al.*, 1997). Dès le Moyen Age, il a constitué une ressource alimentaire de première importance. Ses fruits contribuaient à assurer la nourriture de l'homme et des animaux, tandis que son bois était utilisé pour la construction et le chauffage. Pour remplir leurs besoins, les populations montagnardes locales ont diversifié la gamme des variétés cultivées (précoces, tardives, fruits à consommer frais ou séchés, etc.) (CONEDERA, 1998). Cette diversification du châtaignier a eu comme conséquence une différenciation des variétés cultivées au niveau régional. Actuellement, dans les 26 000 ha de forêts de châtaignier du sud des Alpes de la Suisse, plus d'une centaine de noms de variétés sont connus, dont une soixantaine correspondent à des cultivars identifiés et répertoriés sur le terrain (CONEDERA *et al.*, 1993). Des cas d'homonymie (même nom, différents cultivars) ou de synonymie (différents cultivars, même nom) sont aussi connus (CONEDERA, 1994).

Résumé

Deux techniques d'analyse moléculaires, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) et AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ont été utilisées pour rechercher des marqueurs spécifiques permettant d'identifier génétiquement des variétés de châtaignier suisses. 98 et 222 bandes polymorphes ont été amplifiées par RAPD et AFLP en utilisant respectivement douze et quatre amorces.

Les analyses de groupement et en coordonnées principales avec les deux marqueurs ont permis la séparation des variétés fruitières et des rejets de taillis. La détermination univoque des différentes variétés n'a en revanche pas été possible.

Les résultats moléculaires de deux marqueurs sont comparables. Une corrélation significative ($r = 0,78$) a été établie entre les deux données RAPD et AFLP.



Fig. 1. Architecture du châtaignier type Lüina.



Fig. 2. Architecture du châtaignier type Verdanesa.

En dépit de cette diversité, il n'existe pas encore de méthodes rigoureuses de détermination des variétés cultivées, ni de leur diversité génétique. De même, les liens génétiques entre les variétés à fruits et les châtaigniers à bois (près de 18 000 ha cultivés en taillis ou en haute futaie non greffée) n'ont pas encore été établis. Généralement, au sud des Alpes de la Suisse, l'identification des cultivars du châtaignier est basée sur des critères morphologiques considérant par exemple l'architecture de l'arbre (fig. 1 et 2), la forme de la bogue ou celle du fruit. D'autres caractères morphologiques, ayant trait aux feuilles et aux fleurs, ainsi que la phénologie de la plante ont été récemment étudiés avec des résultats prometteurs, mais sans arriver à des applications pratiques (LURASCHI *et al.*, 1994; RUDOW et CONEDERA, 2001). De plus, certains de ces marqueurs morphologiques sont sensibles aux facteurs environnementaux et sont donc instables (CERVERA *et al.*, 1998). Pour cerner la diversité taxonomique réelle du châtaignier, il devenait donc nécessaire de prendre en considération les caractères génétiques.

Quelques auteurs ont appliqué des marqueurs biochimiques pour identifier et étudier la variabilité génétique du châtaignier européen. MÜLLER-STARCK *et al.* (1993) ont utilisé la technique des isozymes pour étudier la variabilité génétique des cultivars suisses, PEREIRA-LORENZO *et al.* (1996) pour les cultivars espagnols et PEREIRA *et al.* (1999) pour les cultivars portugais. MALVOLI et FINESCHI (1987) et FRASCARIA et LEFRANC (1992) ont utilisé les mêmes techniques pour étudier la variabilité génétique des châtaigniers respectivement en Italie et en France. Toutefois, les marqueurs protéiques sont très sensibles à plusieurs facteurs (âge du matériel, température, conditions de conservation des échantillons, etc.); de surcroît, le nombre des enzymes observés est souvent faible. Leur emploi est donc limité (PEREIRA-LORENZO *et al.*, 1996).

Plus récemment, les méthodes moléculaires fondées sur l'amplification enzymatique *in vitro* de fragments spécifiques d'ADN (Acide désoxyribonucléique) par l'intermédiaire de la réaction en chaîne de polymérase ou PCR (Polymérase Chain Reaction) ont été appliquées au châtaignier: Plusieurs marqueurs ont été utilisés. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (GALDERISI *et al.*, 1998; ORAGUZIE *et al.*, 1999), AFLP (*Amplified Fragment Length polymorphism*) (YAMAMOTO *et al.*, 1998), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (GOU-LÃO *et al.*, 2001; CASASOLI *et al.*, 2001) et SSR (*Simple Sequence Repeats* ou

microsatellites) (BOTTA *et al.*, 1999). Pour le moment, la seule tentative d'utiliser des marqueurs moléculaires pour l'identification de cultivars suisses de châtaignier date de 1993 et a été effectuée avec la technique des RAPDs (FINESCHI *et al.*, 1993).

Les objectifs du travail présenté ici sont d'étudier la diversité génétique inter- et intra-variétale du châtaignier, d'établir les différences génétiques entre les cultivars et les individus de taillis et d'étudier l'utilité des deux marqueurs moléculaires choisis (RAPD et AFLP) pour l'identification des variétés du châtaignier.

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le Service de biologie végétale (culture *in vitro*) d'Agroscope RAC Changins, la sous-station du sud des Alpes de l'Institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage (WSL) et le Laboratoire de botanique évolutive de l'Université de Neuchâtel.

Matériel et techniques

Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans le présent travail a été récolté au printemps, juste après le débourrement, sur des variétés autochtones comprenant 52 accessions de différentes régions de la Suisse italienne (tabl. 1).

Extraction d'ADN

L'ADN génomique est extrait à partir de petites feuilles en utilisant le bromure d'ammonium hexadécyltriméthyle (CTAB), selon la méthode décrite par POREBSKI *et al.* (1997), suivie d'une extraction organique (phénol/chloroforme). La purification de l'ADN a été réalisée par la matrice de prépa-gène (Biorad) et sa concentration est contrôlée par dosage spectrophotométrique. Ensuite, l'ADN a été remis en suspension dans une solution tampon TE (pH 8) et stocké à -20°C .

Amorces utilisées dans la PCR

Pour la méthode RAPD, sur un total de trente amorces qui ont été testées, seules douze amorces (OPA 02, 04, 07, 10 et 15; OPB 08; OPD 20; OPE 01, 04, 16 et 19 et OPX 17 d'Operon Technologies, Alameda, California) ont produit des bandes polymorphes et reproductibles.

Pour l'AFLP, quatre amorces sélectives ont été employées (E-AGG/M-CTT, E-AAC/M-CTT, E-AGT/M-CAT et E-AAC/M-CAT) (GIBCO BRL AFLP™ Core Reagent Kit).

Amplification d'ADN

RAPD

L'amplification est effectuée dans un volume total de $25\ \mu\text{l}$ contenant $1,4\ \text{mM}$ de MgCl_2 , $0,2\ \text{mM}$ de chaque dNTP, $0,4\ \mu\text{M}$ d'amorce oligonucléotide, une unité de Taq DNA polymérase (Eurobiotaq) et $20\ \text{ng}/\mu\text{l}$ d'extrait contenant de l'ADN. Le processus de la PCR consiste en une dénaturation initiale (4 min à 94°C), suivie de 38 cycles d'amplification (1 min de dénaturation à 93°C , 1 min d'hybridation à 45°C , 1 min d'extension à 72°C) et en une extension finale (5 min à 72°C). Les produits PCR sont séparés par électrophorèse dans un gel agarose 1,6% (p/v)-TBE contenant $0,4\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de bromure d'éthidium à 100V pendant 90 min. Les bandes d'ADN sont alors observées à la lumière ultraviolette.

AFLP

$100\ \text{ng}/\mu\text{l}$ de l'ADN génomique ont été digérés par cinq unités de EcoRI (Biolabs) et cinq unités de Mse I (Biofinex) pendant 2 h à 37°C dans un volume de $40\ \mu\text{l}$ de tampon de digestion. La ligation des adaptateurs a été effectuée par $40\ \text{p mol}/\mu\text{l}$ de chaque adaptateur EcoRI et Mse I et une unité de ligase T4 et ensuite incubé pendant 3 h à 37°C .

La réaction de préamplification a été effectuée dans un volume de $20\ \mu\text{l}$ contenant $1,5\ \text{mM}$ de MgCl_2 , $1\ \text{mM}$ de chaque dNTP, $10\ \text{p mol}/\mu\text{l}$ de l'adaptateur EcoRI, une unité de taq DNA polymérase (Qiagen AG, Bâle). La réaction de préamplification est effectuée avec des amorces ayant un nucléotide sélectif simple dans un thermocycleur Biometra I selon le procédé suivant: dénaturation de l'ADN pendant 2 min à 94°C , suivie de 28 cycles de 45 sec à 94°C , de 45 sec à 56°C et de 1 min à 72°C . Une étape finale d'élongation est réalisée à 72°C pendant 10 min. Les produits obtenus sont dilués $10\times$ pour la PCR sélective.

L'amplification sélective est effectuée dans un volume de $20\ \mu\text{l}$. La réaction contient $0,75\ \text{mM}$ de MgCl_2 , $1\ \text{mM}$ de chaque dNTP, $0,25\ \mu\text{M}$ de l'amorce EcoRI et $0,30\ \mu\text{M}$ de l'amorce Mse I et une unité de Taq polymérase. La PCR comporte 36 cycles avec la séquence suivante: une étape de dénaturation d'ADN pendant 30 sec à 94°C , une étape d'hybridation pendant 30 sec et une étape d'élongation pendant 1 min à 72°C . Pour les 13 premiers cycles, la température d'hybridation est de 65°C au début, pour être plus tard abaissée par palier de $0,7^{\circ}\text{C}$ à chaque cycle et maintenue à 56°C pour les 23 cycles restants.

$1\ \mu\text{l}$ du produit PCR est introduit à un volume de $12\ \mu\text{l}$ de formamide déionisée et $0,5\ \mu\text{l}$ de marqueurs de poids (Gene Scan 500 ROX), les échantillons sont chauffés pendant 2 min à 95°C et sont immédiatement refroidis dans de la glace.

Chaque échantillon est chargé sur le séquenceur automatique d'ADN ABI-310 (électrophorèse à capillaire). Les pics ainsi révélés sont visualisés par les logiciels GeneScan et le Genotyper (PE Applied Biosystems).

Tableau 1. Individus étudiés et leurs origines.

Numéro de l'échantillon	Nom de la variété	Numéro de l'individu	Génotype	Origine
1	Verdanesa	1	<i>C. sativa</i> greffé	Calonico 01.CH
2	Verdanesa	2	<i>C. sativa</i> greffé	Calonico 04.CH
3	Verdanesa	3	<i>C. sativa</i> greffé	Giornico 03.CH
4	Verdanesa	4	<i>C. sativa</i> greffé	Giornico 06.CH
5	Verdanesa	5	<i>C. sativa</i> greffé	Giornico 04.CH
6	Verdanesa	6	<i>C. sativa</i> greffé	Chironico 02.CH
7	Verdanesa	7	<i>C. sativa</i> greffé	Chironico 06.CH
8	Verdanesa	8	<i>C. sativa</i> greffé	Chironico 10.CH
9	Verdanesa	9	<i>C. sativa</i> greffé	Chironico 12.CH
10	Verdanesa	10	<i>C. sativa</i> greffé	Chironico 13.CH
11	Verdanesa	11	<i>C. sativa</i> greffé	Lodrino 04.CH
12	Verdanesa	12	<i>C. sativa</i> greffé	Torricella 10.CH
13	Verdanesa	13	<i>C. sativa</i> greffé	Torricella 13.CH
14	Lüina	1	<i>C. sativa</i> greffé	Calonico 02.CH
15	Lüina	2	<i>C. sativa</i> greffé	Calonico 07.CH
16	Lüina	3	<i>C. sativa</i> greffé	Giornico 01.CH
17	Lüina	4	<i>C. sativa</i> greffé	Giornico 02.CH
18	Lüina	5	<i>C. sativa</i> greffé	Chironico 01.CH
19	Lüina	6	<i>C. sativa</i> greffé	Chironico 05.CH
20	Lüina	7	<i>C. sativa</i> greffé	Chironico 08.CH
21	Lüina	8	<i>C. sativa</i> greffé	Chironico 14.CH
22	Lüina	9	<i>C. sativa</i> greffé	Lodrino 03.CH
23	Lüina	10	<i>C. sativa</i> greffé	Lodrino 05.CH
24	Lüina	11	<i>C. sativa</i> greffé	Lodrino 14.CH
25	Lüina	12	<i>C. sativa</i> greffé	Torricella 08.CH
26	Lüina	13	<i>C. sativa</i> greffé	Torricella 09.CH
27	Lüina	14	<i>C. sativa</i> greffé	Torricella 17.CH
28	Bonè negro	1	<i>C. sativa</i> greffé	Calonico 03.CH
29	Bonè negro	2	<i>C. sativa</i> greffé	Calonico 05.CH
30	Bonè negro	3	<i>C. sativa</i> greffé	Calonico 06.CH
31	Bonè negro	4	<i>C. sativa</i> greffé	Calonico 08.CH
32	Bonè negro	5	<i>C. sativa</i> greffé	Chironico 03.CH
33	Bonè negro	6	<i>C. sativa</i> greffé	Chironico 04.CH
34	Bonè negro	7	<i>C. sativa</i> greffé	Lodrino 02.CH
35	Bonè negro	8	<i>C. sativa</i> greffé	Lodrino 11.CH
36	Bonè negro	9	<i>C. sativa</i> greffé	Lodrino 12.CH
37	Bonè negro	10	<i>C. sativa</i> greffé	Lodrino 13.CH
38	Berögna	1	<i>C. sativa</i> greffé	Lodrino 07.CH
39	Berögna	2	<i>C. sativa</i> greffé	Lodrino 08.CH
40	Berögna	3	<i>C. sativa</i> greffé	Prosito 07.CH
41	Pinca	1	<i>C. sativa</i> greffé	Veizio 21.CH
42	Pinca	2	<i>C. sativa</i> greffé	Veizio 22.CH
43	Pinca	3	<i>C. sativa</i> greffé	Veizio 31.CH
44	sauvage	1	<i>C. sativa</i> : taillis	S. Antonino.CH
45	sauvage	2	<i>C. sativa</i> : taillis	S. Antonino.CH
46	sauvage	3	<i>C. sativa</i> : taillis	S. Antonino.CH
47	sauvage	4	<i>C. sativa</i> : taillis	Bellinzona.CH
48	sauvage	5	<i>C. sativa</i> : taillis	Bellinzona.CH
49	sauvage	6	<i>C. sativa</i> : taillis	Bellinzona.CH
50	sauvage	7	<i>C. sativa</i> : taillis	Bellinzona.CH
51	sauvage	8	<i>C. sativa</i> : taillis	Bellinzona.CH
52	sauvage	9	<i>C. sativa</i> : taillis	Bellinzona.CH

Analyse des données

Pour chacun des individus et pour chaque amorce, les bandes polymorphes sont notées par la note 1 pour les bandes présentes et 0 pour les bandes absentes. Pour les deux marqueurs utilisés, les dendrogrammes sont cons-

truits par la méthode UPGMA (*Unweighted Pair-Group with Arithmetic Averages*) fondée sur l'indice de similarité de Jaccard (SNEATH et SOKAL, 1973) en utilisant le programme d'analyse et de groupement <http://www.biology.ualberta.ca/jbrzusto> et ensuite visualisés avec le programme TREEVIEW.

L'analyse en coordonnées principales (PCoA) est réalisée à partir de la matrice de distance selon l'indice de Jaccard du progiciel R4 (Version Beta) (Philippe Casgrain et Pierre Legendre, Dpt de sciences biologiques, Université de Montréal). La corrélation entre les données de RAPD et AFLP est calculée à l'aide du test de Mantel (1967) basé sur le coefficient de similarité de Jaccard avec le progiciel R4 après 999 permutations aléatoires.

Résultats et discussion

Empreintes génétiques

Les deux techniques moléculaires utilisées dans cette étude ont permis de détecter des empreintes génétiques spécifiques pour les 52 individus étudiés. Les douze amorces de RAPD utilisées ont produit un total de 98 bandes polymorphes. Pour tous les génotypes, le nombre le plus élevé de bandes polymorphes est obtenu par l'amorce OPE-01 (10 bandes). En moyenne, huit bandes par amorce, d'une longueur de 1000 à 5000 pb, ont été produites. Pour la technique AFLP, les quatre amorces sélectives ont généré 222 fragments polymorphes avec une moyenne de 55 bandes polymorphes par amorce, d'une longueur comprise entre 50 et 350 pb.

Polymorphisme inter- et intravariétal

Les deux dendrogrammes produits par les approches RAPD et AFLP (fig. 3 et 4) séparent les génotypes de *C. sativa* en deux groupes: le premier est formé des variétés à fruit, le second comprenant le taillis. Les mêmes résultats sont confirmés par les ACoP (fig. 5 et 6). Les résultats obtenus par RAPD et AFLP montrent aussi que les variétés suisses sont génétiquement très proches. Ce résultat pourrait trouver son origine dans la sélection indépendante des variétés cultivées exclusivement pour la production de fruit, d'une part, et des rejets de taillis utilisés pour la production du bois, d'autre part. Plus difficile à expliquer est le manque de différenciation entre les variétés fruitières qui ne peuvent presque pas être discriminées par les analyses génétiques. Des résultats similaires ont aussi été rapportés par FINESCHI *et al.* (1993), qui avec la technique des RAPDs avaient pu détecter des empreintes génétiques spécifiques pour tous les individus analysés, sans pouvoir les regrouper dans les cultivars d'origine.

D'une façon plus générale, l'homogénéité génétique entre les cultivars suisses peut être expliquée, aussi, par l'origine commune du châtaignier et de sa culture au sud des Alpes de la Suisse (CONEDERA *et al.*, 2004).

Les douze amorces de RAPD et les quatre amorces d'AFLP utilisées dans ce travail nous ont permis d'étudier la variabilité génétique intravariétale et de classer les individus de chaque variété dans plusieurs groupes séparés, avec quelques exceptions.

Les analyses des dendrogrammes de

RAPD et AFLP montrent une certaine ressemblance dans le groupement des individus de chaque variété mais avec quelques différences. Cette complémentarité entre les deux méthodes dans le groupement des cultivars a été confirmée par une corrélation significative entre les deux types de marqueurs ($r = 0,78$). Des études antérieures en génétique des populations ont montré une corrélation élevée entre les données de RAPD et de AFLP (POWELL *et al.*, 1996; RENGANAYAKI *et al.*, 2001). Les deux marqueurs sont dominants mais,

dans notre étude, l'AFLP produit un plus grand nombre de bandes polymorphes que le RAPD (222 vs. 98). Ces deux marqueurs nous ont également permis de résoudre quelques problèmes de synonymie. Par exemple, le cas de Bonè negro 07 qui est suspecté d'appartenir à la variété Lüina.

Il est important de noter que les résultats des arbres phénétiques et ceux des ACoP discriminent bien les individus de Verdanesa, Bonè negro et Lüina, à l'exception de quelques individus qui se classent en dehors des groupes: deux

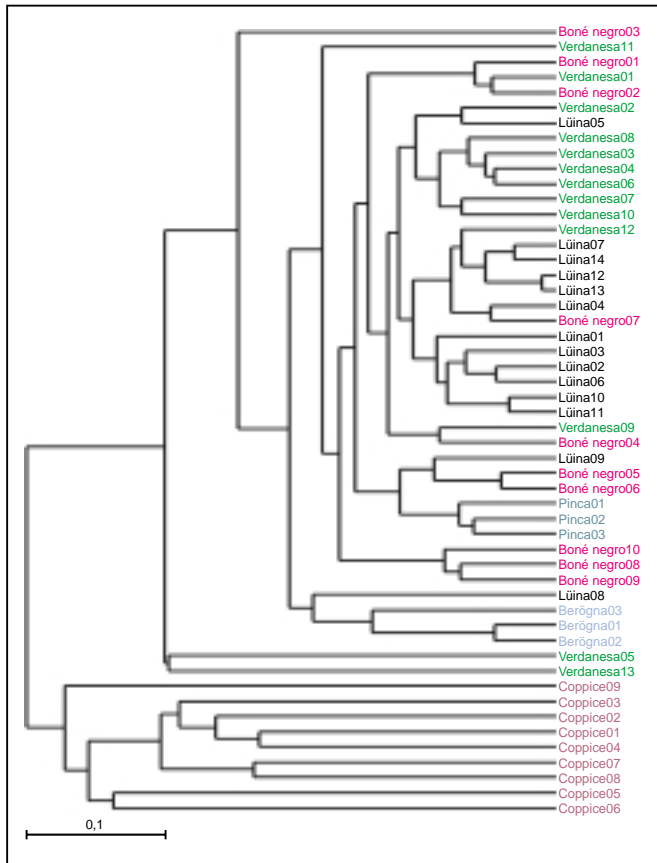


Fig. 3. Dendrogramme obtenu par la méthode RAPD (basé sur le coefficient de similarité de Jaccard).

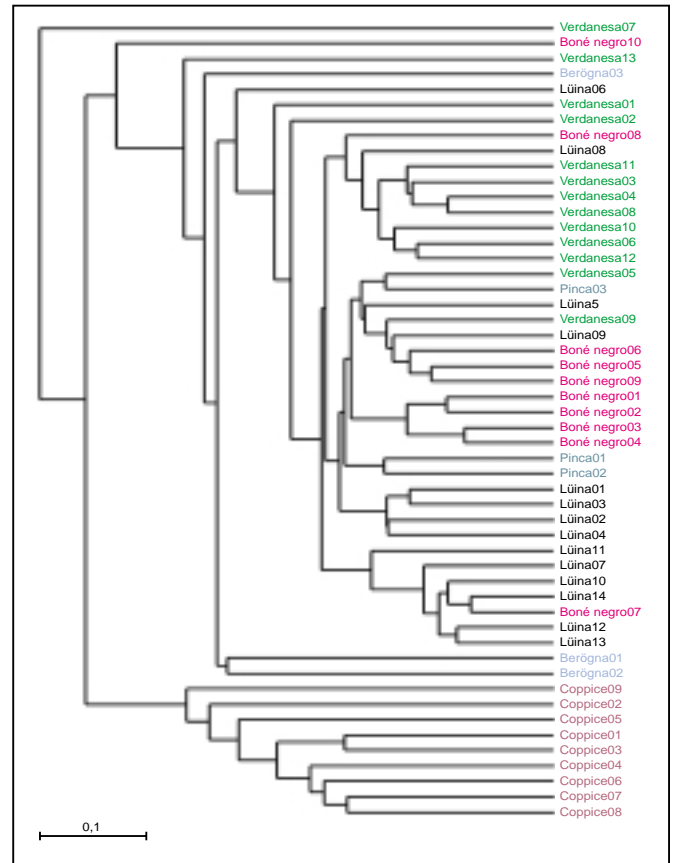


Fig. 4. Dendrogramme obtenu par la méthode AFLP (basé sur le coefficient de similarité de Jaccard).

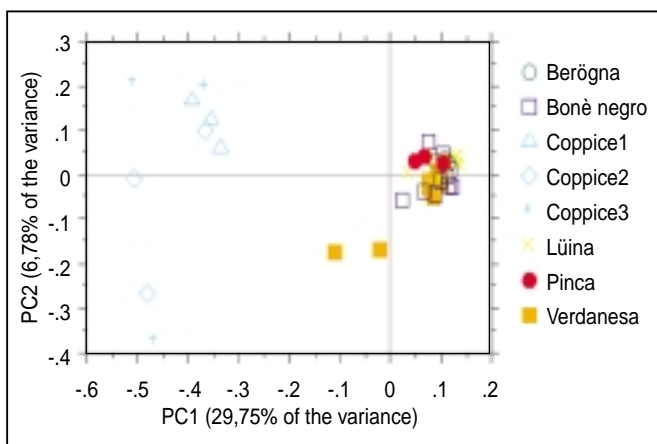


Fig. 5. Analyse en coordonnées principales basée sur les données du RAPD.

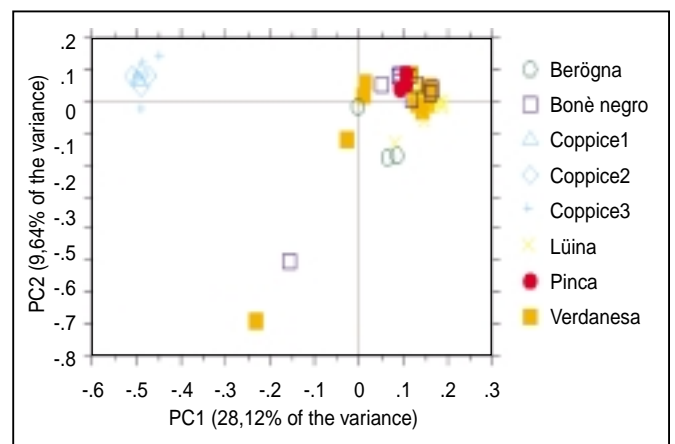


Fig. 6. Analyse en coordonnées principales basée sur les données de l'AFLP.

individus de Verdanesa par RAPD, un individu de Verdanesa et un individu de Bonè negro par AFLP. Ces résultats peuvent être expliqués par l'existence de variétés polyclonales au sud des Alpes. La variété Verdanesa a une large distribution géographique; en plus, elle peut être propagée par semis direct de la graine et non pas exclusivement par greffe (CONEDERA *et al.*, 1994).

Dans nos conditions d'expérimentation, la méthode basée sur le RAPD paraît plus adaptée et plus reproductible pour la discrimination et le groupement des individus de chaque variété que celle de l'AFLP. En outre, cette technique est moins coûteuse, est facile à utiliser et permet de gagner du temps par rapport à celle de l'AFLP.

Conclusions

Les expériences effectuées au cours de ce travail permettent de mettre en évidence les points suivants:

- les marqueurs RAPD et AFLP laissent espérer la mise au point d'empreintes génétiques spécifiques permettant d'identifier chaque individu de châtaignier;
- l'analyse des AFLP a permis de révéler plus de bandes polymorphes que celle des RAPD (222 vs. 98 bandes);
- la technique RAPD paraît plus adaptée pour grouper les individus de chaque variété étudiée que celle de l'AFLP;
- les variétés fruitières de châtaignier du sud des Alpes suisses sont génétiquement très homogènes.

Les perspectives ouvertes par nos présents résultats devront être confirmées en utilisant un plus grand nombre d'amorces et en élargissant le spectre des variétés autochtones étudiées. Le recours à d'autres méthodes d'analyse génétique, comme le séquençage de locus très polymorphes, pourrait offrir aussi une alternative aux techniques RAPD et AFLP.

Remerciements

Nos remerciements s'adressent à MM. R. Guadagnuolo et Y. Yong-Ming de l'Université de Neuchâtel (Laboratoire de botanique évolutive) pour leur précieuse collaboration et leur intérêt porté à cette étude. Notre gratitude s'exprime également à tous nos collègues du service de culture *in vitro* pour leur aide précieuse permettant le bon déroulement de ce travail.

Bibliographie

- BOTTA R., AKKAK A., MARINONI D., BOUNOUS G., KAMPFER S., STEINKELLNER H., 1999. Evaluation of microsatellites markers for characterizing chestnut cultivars. *Acta Horticulturae* **494**, 277-280.
- CASASOLI M., MATTIONI C., CHERUBINI M., VILLANI F., 2001. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* **102**, 1190-1199.
- CERVERA M. T., GUSMAO J., STEENACKERS M., VAN GYSEL A., 1996. Application of AFLP™-based molecular markers to breeding of *Populus* spp. *Plant Growth Regulation* **20**, 47-52.
- CONEDERA M., MÜLLER-STARCK G., FINESCHI S., 1993. Genetic characterization of cultivated varieties of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Southern Switzerland. (I) Inventory of chestnut varieties: History and perspectives. Proceedings of the International congress on chestnut. Spoleto, Italy, 299-302.
- CONEDERA M., 1994. Inventario e caratterizzazione genetica delle varietà nostrane di castagno da frutto. *Boll. Soc. tic. Scie. nat.* **94**, 212-228.
- CONEDERA M., 1998. Les variétés de châtaignes du sud des Alpes en Suisse. *Fruits* **97**, 1-2.
- CONEDERA M., JERMINI M., SASSELLA A., 1997. Nouvelles perspectives pour la culture du châtaignier au sud des Alpes. *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **29**, 1-7.
- CONEDERA M., KREBS P., TINNER W., PRADELLA M., TORRIANI D., 2004. The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe: from its origin to its diffusion on a continental scale. *Vegetation History and Archaeobotany* **13**, 161-179.
- FINESCHI S., 1988. Short note: Genetics of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) II. Uniformity of Isozyme phenotypes in grafted orchards. *Silvae Genetica* **37**, 82-83.
- FINESCHI S., TAURCHINI D., MÜLLER-STARCK G., CONEDERA M., 1993. Genetic characterization of cultivated varieties of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Southern Switzerland. (III) Analysis of RAPDs molecular markers. Proceedings of the international congress on chestnut. Spoleto, Italy, 309-313.
- 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* **10**, 1495-1504.
- FRASCARIA N., LEFRANC M., 1992. Le commerce de la châtaigne: un nouvel aspect dans l'étude de la différenciation génétique de populations de châtaigniers (*Castanea sativa* Mill.) en France. *Ann. Sci. for.* **49**, 75-79.
- GALDERISI U., CIPOLLARO M., DI BERNARDO G., DE MASI L., GALANO G., CASCINO A., 1998. Molecular typing of Italian sweet chestnut cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Hortic. Sci. Biotech.* **73**, 259-263.
- GOULÃO L., VALDIVIESSO T., SANTANA C., MONIZ OLIVEIRA C., 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.
- LIEUTAGHI P., 1969. Le livre des arbres, arbustes et arbrisseaux. Robert Morel éditeur. Vol. A., 370-390.
- LURASCHI P., MOTTIS P., PLOZZA L., 1994. Differenziazione di varietà di castagno europeo (*Castanea sativa* Mill.) in base alla morfologia fogliare. Travail de diplôme EPFZ, Zurich.
- MALVOLI M. E., FINESCHI S., 1987. Analysis of enzyme systems in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Genet. Agr.* **41**, 243-256.
- MANTEL N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**, 209-220.
- MÜLLER-STARCK G., CONEDERA M., FINESCHI S., 1993. Genetic characterization of cultivated varieties of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Southern Switzerland. (II) Genetic inventory based on enzyme gene markers. Proceedings of the International Congress on Chestnut. Spoleto, Italy, 303-307.
- ORAGUIE N. C., PATERSON A. M., MCNEIL D. L., 1999. Origin and relationships of New-Zealand chestnut (*Castanea* sp. *Fagaceae*) selections reflect patterns of graft failure. *Plant Syst. Evol.* **218**, 193-204.
- PEREIRA-LORENZO S., FERNANDEZ-LOPEZ J., MORENO-GONZALEZ, 1996. Variability and grouping of Northwestern Spanish Chestnut cultivars. II. Isoenzyme traits. *J. Amer. Soc. Hort. Science* **121**, 190-197.
- PEREIRA M. J., CASTRO L. F., TORREA-PEREIRA J. M., LORENZO S. P., 1999. Isozyme polymorphisms in Portuguese chestnut cultivars. *Acta Horticulturae* **494**, 283-286.
- PITTET J. R., 1986. Terres de Castanide. Hommes et paysages du châtaignier de l'Antiquité à nos jours. Librairie Arthème Fayard, Paris, 479 p.
- POREBSKI S., BAILEY G., BAUM R. B., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant molecular Biology Reporter* **15**, 8-15.
- POWELL W., MORGANTE M., ANDRE C., HANAFFEY M., VOGEL J., TINGEY S., RAFALSKI A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breeding* **2**, 225-238.
- RENGANAYAKI K., READ J. C., FRITZ A. K., 2001. Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **102**, 1037-1045.
- RUDOW A., CONEDERA M., 2001. Blüte und Sortenerkennung bei der Edelkastanie (*Castanea sativa* Mill.) auf der Alpensüdseite der Schweiz. *Bot. Helv.* **111**, 1-23.
- SNEATH P. H. A., SOKAL R. R., 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 000 p.
- YAMAMOTO T., SHIMADA T., KOTOBUKI K., MORIMOTO Y., YOSHIDA M., 1998. Genetic characterization of Asian chestnut varieties assessed by AFLP. *Breeding Science* **48**, 359-363.

Riassunto

Identificazione molecolare delle varietà di castagno in Svizzera

In questo lavoro sono state utilizzate due tecniche molecolari – RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length polymorphism*) – su varietà da frutto di castagno in Svizzera allo scopo di individuare marcatori specifici per una loro identificazione. La tecnica RAPD ha permesso di amplificare 98, l'AFLP 222, utilizzando rispettivamente 12 e 4 primers.

Le analisi dei raggruppamenti e delle componenti principali dei due marcatori hanno evidenziato la possibilità di distinguere tra le varietà da frutto e i polloni da ceduo, mentre la determinazione univoca delle singole varietà non è stata possibile.

I risultati delle due tecniche sono comparabili e mostrano una correlazione significativa tra di loro ($r = 0,78$).

Zusammenfassung

Genetische Identifikation von schweizer Kastaniensorten (*C. sativa* Mill.) mittels RAPD und AFLP Marker

Diese Studie beschreibt zwei molekulare Analysetechniken RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) und AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), mit denen spezifische Marker gefunden wurden, welche die genetische Identifikation von schweizerischen Kastaniensorten ermöglichen. Mit RAPD und AFLP konnten mittels 12 bzw. 4 Primer 98 resp. 222 polymorph Markerbanden gefunden werden. Durch die Clusteranalyse und die Übertragung der beiden Marker ins Koordinatensystem konnten die Frucht-Sorten von der wilden Stockausschlägen diskriminiert werden. Die eindeutige Bestimmung einzelner Sorten war dagegen nicht möglich. Die molekularen Ergebnisse der beiden Markern sind vergleichbar. Zwischen RAPD und AFLP wurde eine signifikante Korrelation ($r = 0,78$) gefunden.

Summary

Identification of Chestnut (*C. sativa* Mill.) cultivars using RAPD and AFLP markers in Switzerland

This study focuses on the use of two molecular analysis techniques including RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) and AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) in view to provide specific markers for the genetic characterisation of chestnut cultivars in Ticino (Switzerland). 98 and 222 polymorphic bands were amplified through RAPD and AFLP by using 12 and 4 primer combinations respectively. Clustering and principal coordinates analysis upon the two markers allowed to separate the varieties and the coppice sprouts into two clear groups. Identification at cultivar level, however, was not possible. Results obtained with the two molecular markers are comparable. A high significant correlation between RAPD and AFLP data ($r = 0.78$) was found as well.

Key words: *Castanea sativa* Mill., chestnut, molecular markers, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).



**Analyses et conseils de fumure:
notre laboratoire accrédité
et nos ingénieurs
sont à votre disposition!**

SOL-CONSEIL • Changins • CP 188 • 1260 Nyon 1
Tél. 022 363 43 04 • Fax 022 363 45 17
E-mail: sol.conseil@rac.admin.ch



VOTRE SPÉCIALISTE POUR:

- CUVES INOX 316
- TUYAUX À VIN
- MONTAGE DE RACCORDS
- PRODUITS ŒNOLOGIQUES
- VERRERIE DE LABORATOIRE



Nouveau dépositaire **Carbagas**

CHS CUÉNOUD SA

www.cuenoud.ch

TÉL. 021 799 11 07 – FAX 021 799 11 32

PEPINIÈRES DEFAYES

PEPINIÈRES VITICOLES
JEAN-JACQUES DEFAYES

CH-1912 LEYTRON-VS

TEL. 027 306 20 24

La pépinière, une affaire de confiance.

A VENDRE Cause décès

- Chenillette Geier 40 CV
- Turbo axial Geier
- Ecimeuse Binger
- Elévateur FL 8/18
- Rotobêche Celli NX
- Semoir

Tél. 079 470 94 72 ou 078 689 66 08