

## Caratterizzazione biochimica di alcune varietà locali di fagiolo friulane Biochemical characterization of some common bean local varieties from Friuli

A. R. Piergiovanni<sup>1\*</sup>, F. Miceli<sup>2</sup>, M. Vischi<sup>2</sup>, L. Lioi<sup>1</sup>

1- Istituto di Bioscienze e BioRisorse (IBBR), CNR, Via G. Amendola, 165/a, 70126 Bari

2 -Università di Udine, Dip. Scienze agrarie e ambientali (DISA), Via delle Scienze 206, 33100 Udine

Corresponding author: [angelarosa.piergiovanni@ibbr.cnr.it](mailto:angelarosa.piergiovanni@ibbr.cnr.it)

### Riassunto

In diverse regioni Italiane, ancora persiste la coltivazione di varietà locali di fagiolo, apprezzate per il profilo sensoriale e le caratteristiche del seme.

Questo studio ha analizzato la variabilità di alcune varietà locali a seme piccolo ("Centut", "Cesarins", "Cesarini gialli", "Cannellino di Forni") tradizionalmente coltivate in Carnia (Friuli), e la loro distinzione dal fagiolo "Gialet", coltivato in provincia di Belluno. I loro semi sono molto simili per colore e forma. I profili elettroforetici delle proteine di riserva, faseolina e fitoemoagglutinina, sono stati analizzati per valutare la variabilità presente e la possibilità di usarli come discriminante.

I risultati ottenuti consentono l'attribuzione di ciascuna varietà locale ad uno dei due gene pool del fagiolo. Il "Cannellino di Forni", mostra una faseolina di tipo Andino (pattern T), mentre "Centut", "Cesarins", "Cesarini gialli", "Gialet" presentano un pattern S (gene pool Mesoamericano). La fitoemoagglutinina di tipo TG<sub>2</sub> è presente in "Centut", mentre SG<sub>2</sub> in "Gialet", "Cesarins" e "Cesarini gialli". Queste ultime varietà si differenziano per bande minoritarie con Mw inferiore a 66,2 kDa. Questa differenza rappresenta una efficace discriminante tra "Cesarins", "Cesarini gialli" da un lato e "Gialet" dall'altro.

Il dendrogramma ottenuto dai marcatori SSR e la valutazione agronomica, evidenziano una apprezzabile differenza tra le varietà in accordo con i dati biochimici.

**Parole chiave:** *Phaseolus vulgaris*, proteine di riserva, risorse genetiche, variabilità, SSR

### Abstract

In some Italian regions, the cultivation of common bean local varieties, appreciated for their sensory profile and seed characteristics, still persists.

In this study, variation present in some local small-seeded varieties ("Centut", "Cesarins", "Cesarini gialli", "Cannellino di Forni"), traditionally grown in Carnia (Friuli), was analysed. The aim is to distinguish them from "Gialet", a local variety cultivated in Belluno province. Their seeds are very similar in colour and shape. Electrophoretic profiles of the main seed storage proteins, phaseolin and phytohemagglutinin, were observed to evaluate their variation and the possibility of using them as discrimination key.

Collected data allow each local variety to be attributed to one of two common bean gene pools. "Cannellino di Forni", shows an Andean type phaseolin (pattern T). The varieties "Centut", "Cesarins", "Cesarini gialli", "Gialet", having S type pattern, belong to the Mesoamerican gene pool. Two phytohemagglutinin patterns were observed: the TG<sub>2</sub> type in "Centut", the SG<sub>2</sub> type in "Gialet", "Cesarins" and "Cesarini gialli".

These last varieties differ in some minor bands with molecular weight below 66.2 kDa. This difference represents an effective discriminant between "Cesarins", "Cesarini gialli" on one side, and "Gialet" on the other.

The dendrogram, obtained from SSR markers, and agronomic evaluation reveal an appreciable difference among the studied varieties, in agreement with biochemical data.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris*, seed storage proteins, genetic resources, variation, SSR

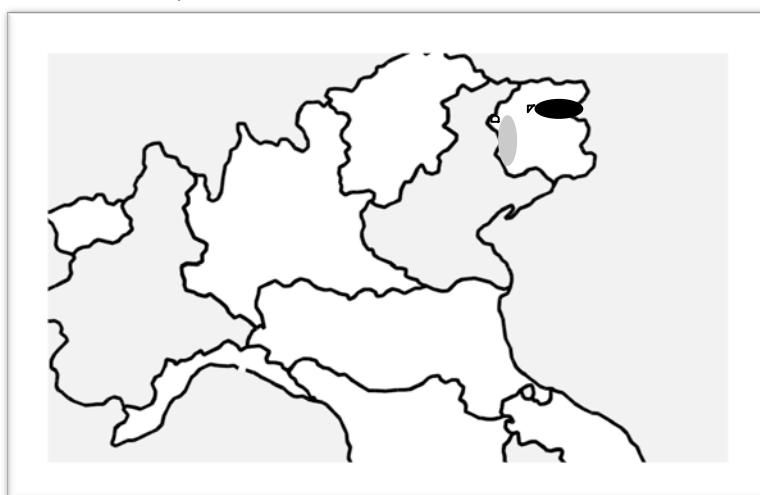
## Introduzione

Il fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.), una delle principali leguminose da granella, riveste un ruolo di rilievo in molte regioni italiane dove ancora persiste una radicata tradizione di coltivazione di questa specie. Ciò si verifica frequentemente in aree marginali, dove agricoltori o semplici appassionati, spesso anziani, impiegano metodi di coltivazione tradizionali su piccole superfici. Sia pure in misura diversa, tutte le regioni della nostra penisola sono interessate, ciascuna caratterizzata da un proprio gruppo di varietà locali (Piergiovanni e Lioi, 2010).

L'importanza di salvaguardare e caratterizzare le varietà locali risiede nel fatto che esse possiedono spesso caratteri di resistenza a stress biotici e abiotici, elevato adattamento agli ambienti marginali in cui sono in grado di competere con le cultivar commerciali e non di rado mostrano buone caratteristiche tecnologiche e nutrizionali. La conservazione on-farm di alcune varietà locali di pregio potrebbe rappresentare una strategia utile per contrastarne la scomparsa. Molte di esse sono particolarmente apprezzate dai consumatori per le caratteristiche del seme e lo specifico profilo sensoriale ed alcune hanno ottenuto marchi di tutela comunitari (IGP o DOP), o riconoscimenti a livello locale (registri regionali, consorzi di tutela, De.Co.).

Piccole superfici a fagiolo rampicante costituiscono un tratto del paesaggio rurale in Carnia (Friuli). Qui il fagiolo ha costituito per lungo tempo una fonte alimentare significativa per apporto di proteine e microelementi. Formaggi e latticini, quando prodotti, erano infatti venduti per fare cassa e ben poco restava al consumo familiare (N. Peresson, com. pers.). Ai primi del '900 il fagiolo era una coltura di tutto rispetto, con produzioni attorno a 1200 t di granella secca (Gottardo e Cattivello, 1999). Oggi le stime sono difficili, ma le produzioni non sembra superino le 10 t annue. Recentemente Martin (2011) ha studiato i motivi legati al mantenimento del fagiolo coltivato in Val Pesarina, rivolgendo particolare attenzione ad alcune varietà locali recuperate sul territorio.

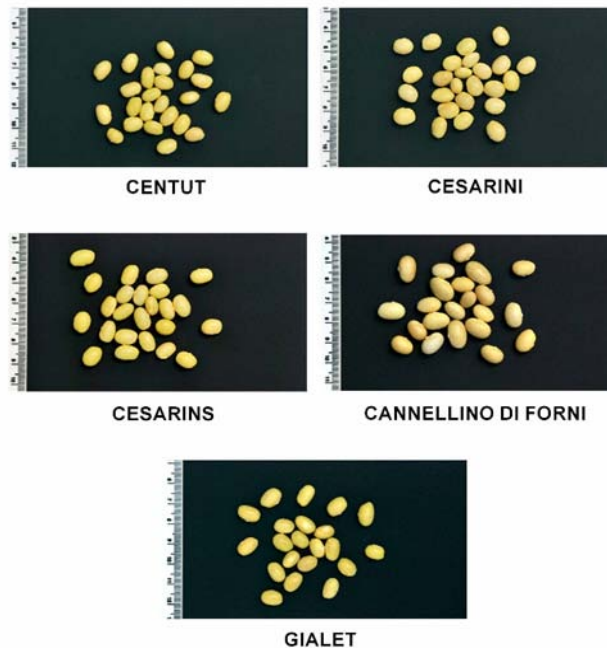
Il presente studio si è incentrato sulla variabilità presente in alcune varietà locali di fagiolo rampicante a seme piccolo (0,32–0,44 g/seme) tradizionalmente coltivate in Carnia (Fig. 1), denominate “Centut”, “Cesarins”, “Cesarini gialli”, “Cannellino di Forni”. Il seme piccolo può conferire una migliore tolleranza a condizioni di stress abiotici, migliorando la stabilità produttiva (Iacuzzo *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Indicazione dei siti di coltivazione delle varietà locali di fagiolo oggetto di studio: provincia di Belluno in grigio; Carnia in nero.

**Figure 1.** Cultivation areas of studied common bean landraces: Belluno Province grey spot; Carnia black spot.

Tutte queste varietà hanno semi molto simili tra loro per forma e colore (Fig. 2). In particolare, risulta interessante la possibile differenziazione tra queste varietà locali della Carnia e la varietà tradizionale “Gialet” della Val Belluna (Veneto), iscritta nell’elenco dei Prodotti Alimentari Tradizionali (DM 350/1999) e Presidio Slow Food. I materiali sono stati analizzati sia mediante lo studio dei pattern elettroforetici delle proteine di riserva, considerate efficaci marcatori biochimici, che mediante marcatori molecolari del tipo microsatelliti (SSR), con ottimo potere discriminante tra materiali anche molto simili. Sono riportati infine alcuni risultati tratti da una valutazione agronomica condotta nel 2013.



**Figura 2.** Immagini dei semi delle varietà locali di fagiolo tradizionalmente coltivate in Carnia (Friuli), a confronto con il “Gialet” (Belluno, Veneto).  
**Figure 2.** Photos of the seeds of studied common bean landraces, traditionally cultivated in Carnia (Friuli region), and compared with “Gialet” (Belluno, Veneto region).

## Materiali e metodi

Un campione di ciascuna varietà locale è stato ottenuto direttamente dagli agricoltori, eccetto per la varietà locale “Gialet” di cui sono stati studiati tre diversi campioni. Per l’analisi delle proteine di riserva, sono stati utilizzati dieci semi singoli, per ciascuna varietà locale. I semi, privati del tegumento e asse embrionale, sono stati macinati finemente utilizzando mortaio e pestello. Le proteine totali sono state estratte dalla farina così ottenuta con un tampone borato 0,02 M pH 9,0 (1:10 p/v). La sospensione ottenuta è stata agitata frequentemente e dopo 2 h centrifugata a 13.000 rpm. Il supernatante è stato mescolato con 5 volumi di tampone Tris-HCl pH 8,6 contenente SDS,  $\beta$ -mercaptoetanololo, glicerolo e blu di bromofenolo. Le proteine sono state denaturate prima dell’analisi e separate mediante elettroforesi (SDS/PAGE) su gel di poliaccrilammide al 15% in condizioni denaturanti. Al termine della corsa elettroforetica i gel sono stati colorati con Coomassie Brilliant Blue, decolorati e fotografati.

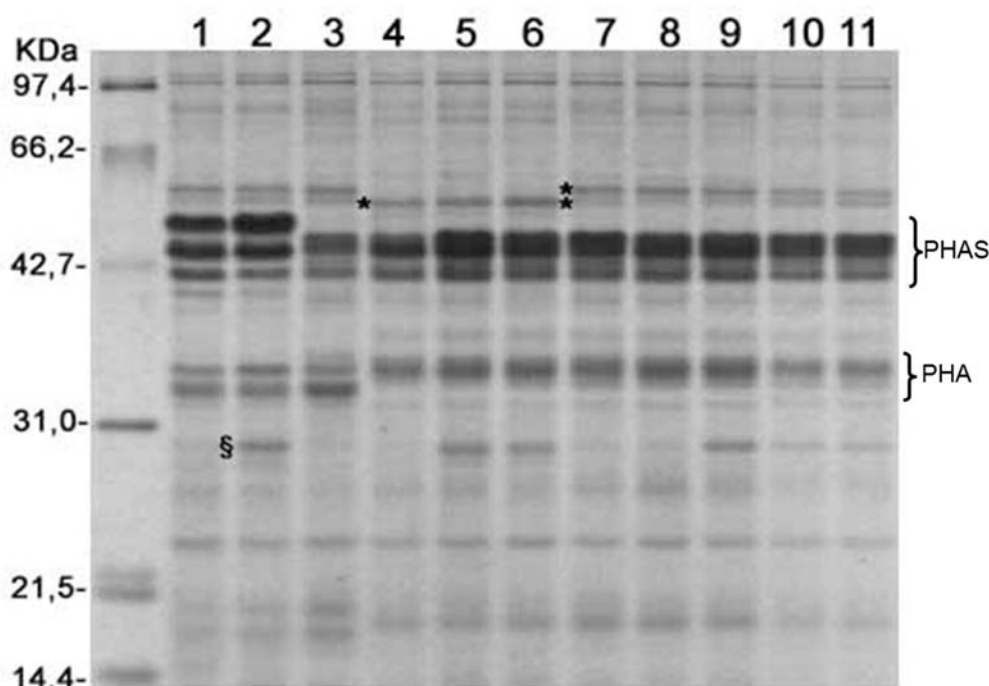
Per l’analisi con marcatori SSR, il DNA è stato estratto da giovani foglie di 32 individui per ciascuna varietà. Quattordici marcatori contenenti microsatelliti (Foschiani *et al.*, 2009) sono stati amplificati mediante PCR con primer specifici e i prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi capillare. I dati ottenuti sono stati elaborati con il software

GenMapper (Applied Biosystem). Sono state così determinate le varianti alleliche ai loci studiati e sulla base delle frequenze alleliche sono state calcolate le distanze genetiche di Nei (1978).

La valutazione agronomica condotta nel 2013 in Carnia ad Arta Terme (UD), loc. Piano d'Arta, (580 m s.l.m.) ha visto l'inserimento di una varietà commerciale rampicante a seme piccolo (Kondor, tipo Cannellino) già utilizzata quale testimone in attività precedenti. Non è stata viceversa inserita la varietà locale "Cesarins" la cui capacità produttiva dopo 5 anni in prove nella stessa località era nota. La prova è stata seminata seguendo uno schema a blocchi con tre ripetizioni e parcelle da 5,4 m<sup>2</sup> di superficie.

### Risultati e discussione

Nei materiali coltivati la faseolina (PHAS), la principale proteina di riserva del fagiolo, presenta un basso grado di variabilità, infatti sono normalmente presenti solo tre varianti elettroforetiche (Lioi et al., 2012). Tali varianti permettono l'attribuzione dei materiali coltivati ai due pool genici presenti nel fagiolo, il Mesoamericano (tipo S) e l'Andino (tipi T e C). Lavori precedenti hanno mostrato che nelle varietà locali Italiane sono presenti materiali di entrambi i gene pool con una netta prevalenza di quello Andino (70-80%) rispetto al Mesoamericano (Piergiovanni e Lioi, 2010).



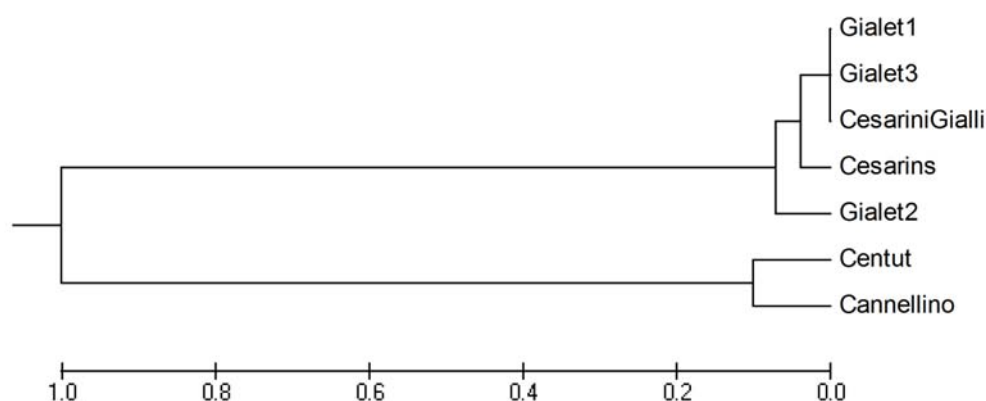
**Figura 3.** Pattern elettroforetici in SDS/PAGE delle proteine totali delle varietà locali. KDa: pesi molecolari dei marker. 1-2) "Cannellino di Forni"; 3) "Centut"; 4-5) "Cesarins"; 6) "Cesarini gialli"; 7) "Gialet" 1; 8-9) "Gialet" 2; 10-11) "Gialet" 3. PHAS = faseolina; PHA = fitoemoagglutinina.

**Figure 3.** SDS/PAGE electrophoretic patterns of total seed storage proteins of local varieties. KDa: marker molecular weights. "Cannellino di Forni"; 3) "Centut"; 4-5) "Cesarins"; 6) "Cesarini gialli"; 7) "Gialet" 1; 8-9) "Gialet" 2; 10-11) "Gialet" 3. PHAS = phaseolin; PHA = phytohemagglutinin.

In questo studio, la varietà locale "Cannellino di Forni" mostra una faseolina di tipo Andino (T) diversamente da tutte le altre accessioni analizzate, e quindi risulta il materiale geneticamente più distante. Le altre 4 varietà locali ("Centut", "Cesarins", "Cesarini gialli",

“Gialet”) presentano un pattern elettroforetico di tipo S che permette l’attribuzione di questi materiali al gene pool Mesoamericano. Le varietà che mostrano la faseolina di tipo S, presentano due diversi pattern di fitoemoagglutinina (PHA), TG<sub>2</sub> e SG<sub>2</sub>. Il primo osservato in “Centut”, è stato ritrovato più spesso associato alla faseolina di tipo Andino e solo raramente (5%), come nel caso in esame, alla faseolina di tipo S (Lioi, 1991). La variante della PHA di tipo SG<sub>2</sub> è invece presente sia in “Gialet” che in “Cesarins” e “Cesarini gialli”. Questi due gruppi di varietà si differenziano per alcune bande minoritarie immediatamente al di sopra della faseolina (Fig. 3, vedi asterischi) con peso molecolare inferiore a 66,2 kDa (Fig. 3, profilo 1). In “Cesarins” e “Cesarini gialli” è evidente una sola banda più intensa mentre nelle tre diverse accessioni di “Gialet” nella stessa area del gel è presente un doppietto molto nitido. Questa differenza tra i profili elettroforetici rappresenta una efficace discriminante tra “Cesarins”, “Cesarini gialli” da un lato e “Gialet” dall’altro. Tali bande rappresentano polipeptidi appartenenti alla frazione della legumina, una proteina di riserva appartenente alla classe delle globuline, con alcune subunità ad alto peso molecolare. La legumina in altre *Fabaceae* come il pisello o la fava rappresenta la principale proteina di riserva, mentre nel fagiolo risulta essere una componente minoritaria (Matta *et al.*, 1981). Sempre alla frazione leguminica può essere attribuita una banda con peso molecolare inferiore a 31 kDa (Fig. 3, vedi §). La sua frequenza varia da 0% (“Gialet” 1 e “Centut”) a 100% nella varietà locale “Cesarini gialli”.

La genotipizzazione con microsatelliti è stata attuata allo scopo di sfruttare la capacità discriminante di questi marcatori molecolari. Il numero di alleli dei singoli *loci* varia da 2 a 11 per un totale di 62 alleli presenti nei 14 *loci* in esame. L’analisi UPGMA basata sulle distanze genetiche di Nei (1978) ha evidenziato una chiara divisione dei genotipi in due sottogruppi, in sostanziale accordo con i dati biochimici, individuando un gruppo costituito da “Cesarins”, “Cesarini gialli” e “Gialet” e un gruppo costituito da “Cannellino di Forni” e “Centut” (Fig. 4).

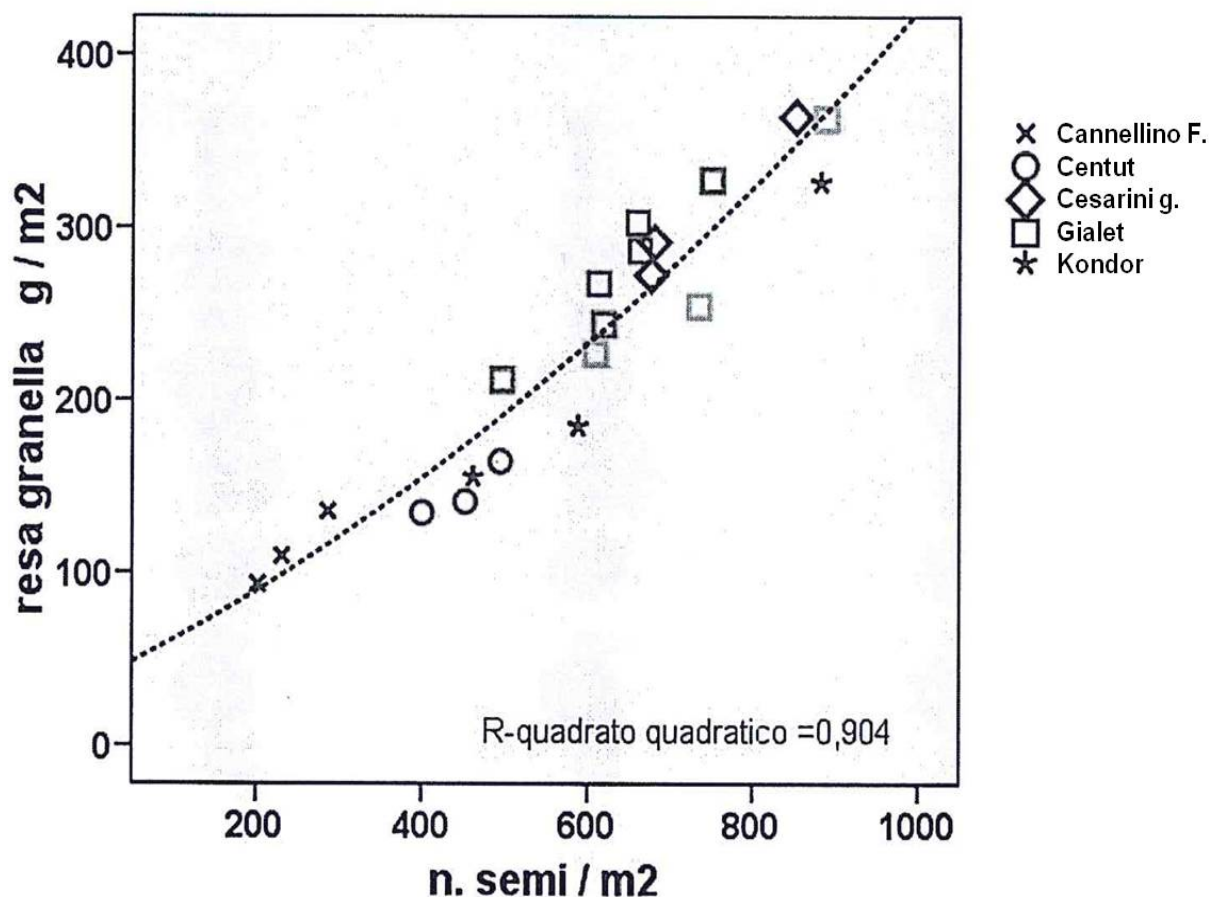


**Figura 4.** Dendrogramma che mostra i risultati dell’analisi UPGMA delle popolazioni di fagiolo analizzate.  
**Figure 4.** Dendrogram showing UPGMA analysis results of analysed common bean populations.

Dalla valutazione agronomica è emerso un intervallo di variazione piuttosto ampio (tra 113 e 309 g s.s. m<sup>-2</sup>) per le rese in granella. Le varietà locali meno produttive sono state “Cannellino di Forni” e “Centut”, mentre “Kondor”, i tre “Gialet”, assieme ai “Cesarini gialli” sono i più produttivi, senza differenze tra loro. La varietà locale “Cesarins”, valutata a Piano d’Arta per un quinquennio, ha una resa media pari a 308 g m<sup>-2</sup>. La fase tra emergenza e inizio fioritura è stata pari a circa 40 giorni in “Kondor”, “Cesarini gialli” e “Centut”, a 42 giorni per “Cannellino di Forni”, a 50-52 giorni per i tre genotipi “Gialet”. Pur entro materiali a seme piccolo, 100 semi di “Centut” e “Kondor” pesavano circa 33 g, 100 semi di “Gialet” 2 erano a 38 g, quelli di Gialet 1 e 3 assieme a Cesarini Gialli circa 43 g e infine 46 g per “Cannellino di

Forni". Come spesso notato per colture da granella (Egli, 1998), il numero di semi per m<sup>2</sup> alla raccolta risulta un ottimo predittore delle rese (Fig. 5).

Nessuna relazione è stata viceversa osservata tra il peso di 100 semi e la resa. I tre genotipi di "Gialet" della Val Belluna, assieme ai "Cesarini gialli", molto simili sul piano biochimico, hanno altresì evidenziato una capacità produttiva non diversa e pari alla varietà testimone. Il "Cannellino di Forni", ben distinguibile all'analisi biochimica e molecolare, ha viceversa fornito rese modeste e un ridotto numero di semi per m<sup>2</sup> alla raccolta.



**Figura 5.** Rese in granella secca, espresse come numero di semi/m<sup>2</sup> alla raccolta, per le varietà locali e la cv "Kondor", registrate a Piano d'Arta (UD) nel 2013.

**Figure 5.** Grain yields of the local varieties and the cv "Kondor", expressed as see/m<sup>2</sup> at harvest, recorded at Piano d'Arta (UD) in 2013.

### Conclusioni

Una dettagliata caratterizzazione delle varietà locali di pregio può agevolare la conservazione on-farm e costituire uno strumento utile per guidarne una più ampia diffusione, data la produttività interessante negli ambienti di elezione, ovvero contrastarne la scomparsa. Questi dati mostrano come la combinazione di più approcci metodologici è utile per aumentare il potere discriminante tra materiali molto simili.

### Bibliografia

Egli D.B. (1998) Seed biology and the yield of grain crops. Chapter 4 - Yield components. CAB International, New York, USA.

- Foschiani A., Miceli F., Vischi M. (2009) Assessing diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions at phenotype and molecular level: a preliminary approach. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56:445-453.
- Gottardo L., Cattivello C. (1999) Il miglioramento genetico del fagiolo in Friuli. *Notiziario ERSA* 1:19-24.
- Iacuzzo F., Miceli F., Foschiani A., De Infanti R., Dalla Costa L. (2009) Stability of grain yields and nutritive traits in climbing bean landraces from NE Italy. ASA-CSSA-SSSA Annual Meeting, Pittsburgh, PA, USA, 01-05 Nov.
- Lioi L. (1991) Electrophoretic variation and geographical distribution of the seed protein phytohemagglutinin in cultivated *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Genetics & Breeding* 45:97-102.
- Lioi L., Nuzzi A., Campion B., Piergiovanni A.R. (2012) Assessment of genetic variation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Nebrodi mountains (Sicily, Italy). *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:455-464.
- Martin C. (2011) Aspetti economici ed ambientali nella tutela dell'agro-biodiversità in Carnia: il caso delle varietà locali di fagiolo in Val Pesarina. Università di Udine, Laurea specialistica in Scienze e tecnologie per l'ambiente e il territorio, A.A. 2010/2011, 116 pp.
- Matta N., Gatehouse J.A., Boulter D. (1981) The structure of legumin of *Vicia faba* L.—a reappraisal. *Journal of Experimental Botany* 32:183-197.
- Nei M. (1978) The theory of genetic distance and evolution in human races. In: *Genetic Structure of Populations*, N.E. Morton (Ed.). pp. 45-51, University Press of Hawaii, Honolulu.
- Piergiovanni A.R., Lioi L. (2010) Italian common bean landraces: history, genetic diversity and seed quality. *Diversity* 2:837-862.