

Impiego di marcatori molecolari microsatelliti nella caratterizzazione varietale della fragola

MAURA BONOLI⁽¹⁾ - GUIDO CIPRIANI⁽²⁾ - LAURA MANZECCHI⁽¹⁾ - WALTHER FAEDI⁽¹⁾

⁽¹⁾ CRA - Istituto Sperimentale per la Frutticoltura - Sezione di Forlì

⁽²⁾ Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Università di Udine

Il "fingerprinting" vegetale offre la possibilità di identificare le varietà e si propone come metodologia complementare o integrativa ai metodi tradizionali. I marcatori molecolari SSR si sono rivelati utili strumenti per la caratterizzazione di genotipi appartenenti alle diverse specie di fragola.

In una situazione ormai da tempo sfavorevole per la fragola, derivata dal notevole ridimensionamento della coltura in atto in gran parte dell'Italia, risulta comunque necessario garantire un'adeguata risposta alle richieste del mercato fornendo al consumatore un prodotto di elevata qualità ad un costo contenuto. Questo binomio, all'apparenza utopistico, non scoraggia i "breeder" che continuano a ricercare genotipi in grado di produrre frutti con ottime caratteristiche qualitative e di fornire piante sane e produttive.

Già da diversi anni le azioni di miglioramento genetico si avvalgono di "strumenti genetici" individuati attraverso lo studio molecolare del genoma delle specie vegetali. In particolare, l'avvento dei marcatori molecolari ha segnato una notevole svolta nel mondo della genetica vegetale consentendo la costruzione di mappe genetiche di associazione, l'individuazione di geni re-

sponsabili di caratteri agronomici (Quarta *et al.*, 1998) e la caratterizzazione varietale ("fingerprinting").

La tipizzazione dei genotipi attraverso la tecnica del "fingerprinting" ha assunto una notevole importanza e un largo impiego in campo vivaistico in quanto permette l'identificazione e la distinzione di una pianta rispetto alle altre sulla base dei profili del DNA. In passato il controllo della rispondenza varietale era basato sulla sola analisi fenotipica, cioè sull'osservazione e registrazione dei caratteri morfologici della pianta. Dal 1997, secondo il DM del 14/4/97, che disciplina in materia di attività vivaistica, è obbligatoria la certificazione varietale basata sull'analisi del DNA dei materiali in moltiplicazione da inserire nel circuito commerciale.

Risulta quindi necessario per ciascun genotipo fornire un'impronta genetica definita da uno o più profili del DNA che renderà la varietà riconoscibile e distinguibile dalle altre.

I microsatelliti (SSRs) validi marcatori per il "fingerprinting"

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 distinguono genotipi diversi anche se molto simili. Esso rappresenta un sistema efficace di identificazione varietale in quanto supera i limiti della discriminazione basata su descrittori fenologici quali l'influenza di fattori esterni che possono alterare il fenotipo e i lunghi tempi necessari per i rilievi.

I marcatori molecolari di DNA microsatellite sono tra i più utili nell'analisi ge-



▲ Fig. 1 - Fruttificazione di piante della varietà Queen Elisa.

netica: presentano un elevato polimorfismo, un'ampia distribuzione nel genoma, sono codominanti, facili da analizzare e permettono un'alta ripetibilità delle analisi. I microsatelliti sono inoltre trasferibili tra specie molto simili; questa caratteristica li rende ideali per la costruzione di mappe genetiche e "fingerprinting" (James *et al.*, 2003). Già da diversi anni sulle specie del genere *Fragaria* sono state condotte analisi genetico-molecolari e la specie diploide *F. vesca* è stata impiegata come modello di studio, poiché la ploidia più complessa presente nel genoma di *F. x ananassa* (ottoploide) determina difficoltà di interpretazione dei risultati soprattutto nell'analisi di segregazione di progenie ottenute da incroci controllati usate per la costruzione di mappe genetiche (Davis e Yu, 1997). Le mappe di associazione, fino ad ora pubblicate, si basano su marcatori molecolari quali ISSR, AFLP (Albani *et al.*, 2001) e RAPD (Davis e Yu, 1997). Le informazioni ottenute con questi marcatori, utilizzati anche per l'analisi di "fingerprinting", sono però difficilmente trasferibili tra le specie (James *et al.*, 2003). I marcatori SSR sono quindi uno strumento efficace per la caratterizzazione e discriminazione di genotipi appartenenti alle varie specie di *Fragaria*. Nello studio di "fin-

Lavoro svolto nell'ambito del progetto "Qulifrape" finanziato da MiUR e MiPAF. Pubblicazione n. 13.

TAB. 1 - CONFRONTO TRA 10 VARIETÀ DI *F. X ANANASSA*: PER CIASCUNA CULTIVAR VIENE INDICATO IL NUMERO DI ALLELI PRODOTTI DALL'AMPLIFICAZIONE CON DIVERSE COPPIE DI PRIMER E LA TIPOLOGIA DI PROFILO ALLELICO (A LETTERA UGUALE CORRISPONDE LO STESSO PROFILO)

| Primer | Intervallo (paia di basi, bp) | Alba | Madeleine | Maya | Queen Elisa | Miss | Patty | Onda | Paros | Roxana | Idea |
|--------|-------------------------------|------|-----------|------|-------------|------|-------|------|-------|--------|------|
| UDF001 | da 128 a 165 | 3 a | 3 a | 3 a | 2 b | 2 b | 2 b | 3 c | 3 c | 3 d | / |
| UDF002 | da 107 a 128 | 2 a | 2 a | 3 b | 3 d | 3 e | 3 e | 2 a | 2 a | 4 c | 3 e |
| UDF003 | da 117 a 133 | 4 a | 6 b | 5 c | 4 e | 4 a | 4 a | 4 f | / | 6 d | 4 a |
| UDF004 | da 125 a 149 | 4 a | 2 b | 6 c | 3 d | 4 e | 5 f | 4 g | 3 h | 3 i | 4 l |
| UDF005 | da 205 a 225 | 3 a | 4 b | 2 c | 4 e | 3 f | 4 g | 5 h | 3 i | 4 l | 3 d |
| UDF007 | da 120 a 135 | 1 a | 3 b | 1 a | 3 c | 2 d | 2 d | 2 d | 2 d | 1 a | / |
| UDF008 | da 112 a 125 | 4 a | 4 a | 4 b | 4 d | 4 e | 4 e | 2 f | 3 g | 5 h | 3 c |
| UDF016 | da 104 a 116 | 4 a | 4 a | 3 b | 2 d | 3 e | 4 f | 2 g | 3 h | 3 c | 4 f |
| UDF018 | da 147 a 183 | 3 a | 6 b | 3 c | 3 c | 3 a | 4 e | 6 f | 3 g | 4 h | 3 d |
| UDF020 | da 81 a 176 | 5 a | 4 b | 3 c | 3 e | 3 c | 3 e | 3 e | 3 e | 4 f | 4 d |
| UDF022 | da 230 a 252 | 5 a | 5 b | 5 c | 2 e | 5 b | 5 f | 6 g | 3 d | 5 b | 5 f |

gerprinting" che viene riportato sono stati utilizzati alcuni marcatori microsatelliti ottenuti dal Dipartimento di Scienze Agrarie Ambientali dell'Università di Udine (Cipriani e Testolin, 2004).

Caratterizzazione e discriminazione varietale

Presso l'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura – Sezione di Forlì, e in collaborazione con l'Università di Udine, sono state effettuate discriminazioni varietali su tre gruppi di genotipi di fragola appartenenti a diverse specie: *F. x ananassa* (genoma ottoploide), *F. vesca* (genoma diploide), *F. moschata* (genoma esaploide). Da una libreria genomica di *F. vesca* (cultivar Ilaria) sono state isolate regioni contenenti sequenze microsatellite di tipo AC/TG. Sono stati disegnati i primer delle regioni fiancheggianti, e undici coppie di primer, marcate con fluorocromi, sono state utilizzate su ciascun campione di DNA per l'amplificazione, mediante PCR, di frammenti di DNA microsatellite. Il DNA è stato estratto da campioni di giovani foglie liofilizzate (30-50 mg) utiliz-



▲ Fig. 2 - *Fragolina di bosco* (*F. vesca*) dell'Azienda Valitutto.

zando CTAB come detergente d'estrazione. La reazione di PCR è avvenuta in 20 µl di soluzione con 20 ng di DNA, 1x buffer, 200 µM dNTPs, 0,25 µM "primers forward" e "reverse" e 0,8U Taq polimerasi. Il programma utilizzato dal termociclatore è il seguente: 94 °C per 2' (94 °C per 40", 56°C per 50", 72° per 50") per 40 cicli, 72° per 7'. L'analisi dei frammenti SSR è stata effettuata attraverso un sequenziatore capillare Amersham Biosciences MegaBace 500.

Sono state analizzate dieci varietà di *F. x ananassa*: Alba, Madeleine, Maya, Queen Elisa (Fig. 1), Miss, Patty, Onda, Paros, Roxana, Idea.

Ciascuna coppia di primer delinea un profilo allelico per ogni cultivar. La comparazione dei profili varietali ottenuti da un unico primer, o da una combinazione di primer, permette la discriminazione di tutte le cultivar analizzate. La coppia di primer siglata 005 risulta di particolare interesse poiché è in grado di produrre da sola profili allelici differenti per ciascuna varietà (Tab. 1).

Sono state inoltre considerate quattro varietà di fragola appartenenti alla specie *F. vesca*: Valitutto (Fig. 2), Alpine (Fig. 3), Ilaria e Regina delle Valli. L'analisi è stata effettuata seguendo i protocolli precedentemente descritti. I risultati mostrano che due coppie di primer (001 e 002) sono in grado di distinguere i quattro genotipi (Tab. 2).

È stata inoltre effettuata un'analisi su due varietà esaploidi della specie *F. moschata*: Profumata di Tortona, dioica, con piante a fiore staminifero (maschio) e a fiore pistillifero (femmina) (Figg. 4 e 5) e Capron, monoica, con fiore ermafrodita. La discriminazione tra Capron e Profumata di Tortona è avvenuta con tutti i primer testati, mentre la distinzione fra le piante dei due sessi di Profumata di Tortona si è verificata solo con poche coppie di primer, ma si rendono necessarie ulteriori analisi per

TAB. 2 - CONFRONTO TRA LE VARIETÀ DI *F. VESCA*: PER CIASCUNA CULTIVAR VIENE INDICATO IL NUMERO DI ALLELI PRODOTTI DALL'AMPLIFICAZIONE CON DIVERSE COPPIE DI PRIMER E LA TIPOLOGIA DI PROFILO ALLELICO (A LETTERA UGUALE CORRISPONDE LO STESSO PROFILO)

| Primer | Intervallo (paia di basi, bp) | Valitutto (rifiorente) | Alpine (rifiorente) | Ilaria (unifera) | Regina delle Valli (rifiorente) |
|--------|-------------------------------|------------------------|---------------------|------------------|---------------------------------|
| UDF001 | da 128 a 157 | 3 a | / | 2 b | 1 c |
| UDF002 | da 115 a 132 | 2 a | / | 2 b | 1 c |
| UDF003 | da 122 a 133 | / | 2 a | 2 a | 2 b |
| UDF004 | da 118 a 134 | / | 1 a | 2 b | 2 c |
| UDF005 | da 207 a 229 | / | 2 a | 4 b | 6 c |
| UDF007 | da 134a 139 | / | / | 2 a | 1 b |
| UDF008 | da 139 a 142 | / | 1 a | 2 b | 1 a |
| UDF016 | da 113 a 124 | / | / | 2 a | 1 b |
| UDF018 | da 167 a 199 | / | 1 a | 2 b | 2 c |
| UDF020 | da 84 a 167 | 2 a | / | 1 b | 2 a |
| UDF022 | da 219 a 234 | / | 2 a | 1 b | 1 b |



▲ Fig. 3 - *Fragolina di bosco* (*F. vesca*) della varietà Alpine.



◀ Fig. 4 - Fiore staminifero (a sinistra) e fiore pistillifero (a destra) della varietà Profumata di Tortona (*F. moschata*).

▶ Fig. 5 - Fruttificazione e infiorescenza di pianta di Profumata di Tortona a fiore pistillifero (femmina).



confermare i risultati. Quest'ultima discriminazione appare importante in quanto Profumata di Tortona è una varietà di un certo interesse commerciale per il gradevole ed intenso aroma dei frutti, ma producendo piante dioiche, è possibile distinguere il sesso solo al momento della fioritura e della fruttificazione. L'individuazione di SSR discriminanti potrebbe essere un valido strumento per effettuare screening a qualsiasi stadio vegetativo.

I microsatelliti possono essere impiegati sia in studi di caratterizzazione varietale, fornendo per ciascun genotipo uno o più profili allelici che definiscono l'identità genetica di una varietà, sia per discriminazioni varietali al fine di risolvere eventuali controversie commerciali o individuare eventuali sinonimie o omonimie. Il DNA delle piante sottoposte a verifica viene amplificato con primer SSR e i profili allelici ottenuti vengono confrontati. In questo caso è sufficiente dimostrare la similarità o la diversità dei profili. Va

precisato che le differenze di profilo sono sempre significative, mentre le identità nei marcatori possono non essere metodologicamente esaustive e definitive per dire che le due varietà hanno lo stesso genotipo (Sansavini e Pancaldi, 2000).

Le coppie di varietà di *F. x ananassa* messe a confronto sono: Paros/Pajaro, Queen Elisa/VR 96.58.2, Arosa® (Fig. 6) /Kore® Civos* (Fig. 7). Il DNA di ciascun campione è stato estratto e amplificato secondo i protocolli precedentemente descritti, ma l'analisi dei frammenti SSR è stata rilevata attraverso elettroforesi verticale (BioRad) su gel di poliaccrilammide al 5%. Nella figura 8 viene riportata la foto di parte di un gel di poliaccrilammide nel quale si è discriminata la varietà Arosa® (siglata A) da Kore® Civos* (siglata K) attraverso la coppia di primer 003. Dal confronto dei



▲ Fig. 8 - Discriminazione varietale tra Arosa e Kore. I profili allelici sono stati ottenuti utilizzando il primer 003 e mediante corsa elettroforetica su gel di poliaccrilammide. Le frecce in giallo segnalano le bande discriminanti

profili allelici si nota la distinzione delle due varietà in quanto Arosa presenta una coppia di bande assenti in Kore.

Per i tre confronti varietali sono stati individuati i primer in grado di distinguere le piante (Tab. 3).

Conclusioni

L'analisi molecolare del DNA, denominata "fingerprinting" vegetale, offre la possibilità di identificazione varietale, proponendosi in tal modo come metodologia complementare ed integrativa ai metodi descrittivi tradizionali (Sansavini e Pancaldi, 2000). I marcatori molecolari SSR, per le loro caratteristiche di trasferibilità tra specie, eredità codominante, facilità di analisi e ripetibilità, si dimostrano utili strumenti per la caratterizzazione di genotipi appartenenti alle diverse specie del genere *Fragaria*.

BIBLIOGRAFIA

Albani M., Taylor S., Rodriguez Lopez C. et al. (2001) - "Fragaria vesca, one way to understand flowering in perennials". *Flowering Newsletter*, 31, 44-48.

Cipriani G., Testolin R. (2004) - "Isolation and characterization of microsatellite loci in *Fragaria*". *Molecular Ecology notes*, 4, 366-368.

Davis T.M., Yu H. (1997) - "A linkage map of the diploid strawberry, *Fragaria vesca*". *Journal of Heredity*, 88, 215-221.

James C.M., Wilson F., Hadonou A.M., Tobutt K.R. (2003) - "Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in diploid strawberry (*Fragaria vesca* L.) for mapping, diversity studies and clone identification". *Molecular Ecology Notes*, 3, 171-173.

Quarta R., Dettori M.T., Verde I., Sartori A. (1998) - "Mappa genomica del pesco e individuazione di marcatori associati a caratteri agronomici utili". Atti IV Giornate Scientifiche SOL, p. 529.

Sansavini S., Pancaldi M. (2000) - "Brevettabilità e tutela dell'identità genetica delle nuove varietà". *Frutticoltura*, 2, 38-44.



▲ Fig. 6 - Fruttificazione di piante della varietà Arosa.



▲ Fig. 7 - Fruttificazione di piante della varietà Kore.

TAB. 3 - CONFRONTO TRA 3 COPPIE DI VARIETÀ DI *F. X ANANASSA*: PER CIASCUNA COPPIA VENGONO INDICATI I PRIMER TESTATI E LA CAPACITÀ DISCRIMINANTE.

| Primer | Paros/Pajaro | Queen Elisa / VR 96.58.2 | Arosa®/Kore®Civos* |
|--------|---------------|--------------------------|--------------------|
| UDF001 | discriminante | / | / |
| UDF002 | / | discriminante | / |
| UDF003 | / | / | discriminante |
| UDF004 | / | discriminante | discriminante |
| UDF005 | discriminante | discriminante | / |
| UDF007 | / | non discriminante | / |
| UDF008 | discriminante | / | discriminante |
| UDF009 | discriminante | / | discriminante |

