

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



Facoltà di Scienze Agrarie

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL SUOLO DELLA PIANTA DELL' AMBIENTE E DELLE
PRODUZIONI ANIMALI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA
INDIRIZZO MIGLIORAMENTO GENETICO E ORTICOLTURA
XXI CICLO

**MIGLIORAMENTO GENETICO DEL FINOCCHIO:
PRODUZIONE DI IBRIDI F₁ E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE
DELLA MASCHIOSTERILITÀ CITOPLASMATICA**

TUTOR

Prof. Luigi Frusciante

DOTTORANDO

Dr. Francesco Gargiulo

CO-TUTOR

Dr. Riccardo Aversano

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Prof. Matteo Lorito

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

Sommario

1	Introduzione	4
1.1	Importanza economica del finocchio.....	4
1.2	Miglioramento genetico del finocchio	6
1.3	Gli ibridi F1 nel miglioramento genetico del finocchio	9
1.4	La maschiosterilità nelle specie di interesse agrario.....	12
1.5	I marcatori molecolari e la selezione assistita da marcatori (MAS)	15
1.6	Obiettivi della tesi	20
2	Materiali e metodi.....	22
2.1	Materiale vegetale	22
2.1.1	Allevamento del materiale vegetale.....	22
2.2	Analisi fenotipica e programma di miglioramento.....	23
2.3	Quantizzazione degli acidi nucleici	26
2.4	Analisi del genoma totale mediante AFLP	27
2.5	Analisi del genoma citoplasmatico	30
2.6	Isolamento, clonaggio ed analisi bioinformatiche del DNA	31
2.7	Analisi ISSR.....	37
2.8	Analisi statistiche	38
3	Risultati.....	39
3.1	Analisi fenotipiche.....	39
3.2	Analisi del genoma totale mediante AFLP	52

3.3	Analisi del genoma citoplasmatico	53
3.4	Isolamento, clonaggio ed analisi bioinformatiche del DNA	53
3.5	Analisi ISSR.....	56
3.6	Analisi statistiche	59
4	Discussioni	63
5	Conclusioni	72
6	Appendice	73
7	Bibliografia	74

1 Introduzione

1.1 Importanza economica del finocchio

Il finocchio è una specie diploide ($2n=2x=22$), allogama, appartenente alla famiglia delle Umbrellifere, originaria del bacino del mediterraneo dove cresce spontaneamente negli incolti. Già conosciuta dagli antichi Egizi, dai Greci che lo chiamavano “marathon” (da cui Maratona = campo di finocchi) e dai Romani che facevano grande uso di spezie selvatiche per profumare gli ambienti, notizie sulle prime coltivazioni di finocchi sono riportate da alcuni scrittori italiani già nel ‘500.

Il genere *Foeniculum* fu descritto da Miller nel 1768, che lo separò da quello dell’*Anethum* indicato in precedenza da Linneo, e lo distinse in *Foeniculum vulgare* che comprende le cultivar di finocchio dolce (var. dulce) di cui si utilizza il grumolo e *Foeniculum sativum* coltivato per i semi caratterizzati da aroma intenso.

È una pianta caratterizzata da radice fittonante, foglie pennatosette con divisioni capillari nella parte superiore; in quella inferiore le guaine fogliari, strettamente embricate e avvolgenti il breve caule vanno a costituire la parte edule detta “grumolo”.

Le infiorescenze sono ad ombrella mentre i frutti sono costituiti da acheni.

Il finocchio è uno degli ortaggi più graditi, più dolci e profumati utilizzati dalla gastronomia nazionale. In cucina il grumolo viene consumato crudo, in insalata o pinzimonio, oppure cotto. In cosmesi la polvere ricavata dalla pianta viene utilizzata per maschere rivitalizzanti. Dal punto di vista nutrizionale il finocchio (Banca Dati Alimenti INRAN) si caratterizza per il basso contenuto energetico con sole 9 kcal/100 g, rientrando quindi tra gli ortaggi ipocalorici con una elevata quantità di fibra ideale per le diete moderne, per il contenuto in sali minerali, in particolare di potassio e per l’elevata quantità di vitamina C pari a 12 mg/100 g corrispondenti al 20% del livello di assunzione giornaliera raccomandata (*Recommended Daily Allowance*, RDA, tabella 1).

I semi, ottenuti recidendo le ombrelle, vengono utilizzati per aromatizzare carni, pesce, verdure, dolci, liquori. La pianta di finocchio è particolarmente ricca di oli essenziali, i cui componenti principali sono l'etere fenolico trans-anetolo ed il monoterpene fencone. Altri importanti componenti contenuti in quantità variabili sono estragolo, p-anisaldeide e terpeni; nel loro insieme queste molecole conferiscono a tutte le parti della pianta, oltre che un aroma caratteristico, importanti proprietà farmacologiche. L'olio essenziale è utilizzato come espettorante, antispastico e stimolante la secrezione gastrica.

Tabella 1: Valori nutrizionali medi, contenuto medio di sali minerali e vitamine per 100 g di prodotto edule

Energia	9 kcal – 38 kj
Protidi	1,2 g
Glucidi	2,0 g
Fibra	2,2 g
Potassio	394 mg
Calcio	45,0 mg
Magnesio	16,0 mg
Selenio	0,9 mg
Vitamina A	2,0 µg
Acido ascorbico	12,0 mg

Fonte: Banca Dati Alimenti INRAN-Roma

L'Italia produce circa l'85% di grumoli a livello mondiale e le regioni maggiormente interessate sono la Puglia (30%), il Lazio (11%), le Marche (9%); nel mondo la diffusione del finocchio interessa la Turchia, la Siria, l'Egitto e il Marocco. In Italia unitamente a cavolfiore, broccolo e indivia, rappresenta una delle più diffuse colture

orticole autunno-invernali in colture sia principali sia intercalari. Solo di recente con la valorizzazione di particolari cultivar e con l'impiego di ibridi F_1 si è sviluppato come coltura primaverile-estiva in ristretti areali del basso Veneto e della provincia di Mantova o nella Piana del Fucino in Abruzzo. Dati ISTAT 2007 indicano una superficie totale investita per la coltura in Italia di 23426 ettari per una produzione di 5,5 milioni di quintali alla raccolta. L'esportazione è destinata in modo particolare a Francia, Germania, e Svizzera.

1.2 Miglioramento genetico del finocchio

Da una indagine bibliografica delle attività svolte nel settore del miglioramento genetico del finocchio da grumolo si evidenzia un numero esiguo di lavori che denota uno scarso interesse da parte dei genetisti di tutto il mondo alle problematiche di questa specie. In Italia la ricerca ufficiale si è occupata del finocchio in modo del tutto marginale e per aspetti diversi da quello del miglioramento genetico. Solo negli ultimi anni sono stati finanziati progetti di ricerca nazionali volti al miglioramento della specie. Si ricordano i progetti finanziati dal Mipaf all'Istituto sperimentale per l'orticoltura, sezione di Ascoli Piceno, e al Dipartimento di produzione vegetale dell'Università della Tuscia (Viterbo), entrambi finalizzati all'ottenimento, mediante selezione genealogica, di nuove varietà caratterizzate da una migliore qualità del grumolo, da una stabilità delle rese, da resistenza a stress biotici (malattie fungine) e abiotici (freddo). Nell'ambito delle attività di ricerca svolte negli ultimi anni sono da citare gli studi condotti presso il Dipartimento di Biologia delle Piante dell'Università di Firenze e l'Istituto di Genetica Vegetale di Firenze dove è stata valutata la stabilità genetica di rigeneranti ottenuti da

organogenesi ed embriogenesi somatica tramite marcatori RAPD e marcatori universali cloroplastici (Vendramin *et al*, 2004).

È da segnalare, presso l'università della Tuscia di Viterbo, lo sviluppo di tecniche di colture in vitro i cui risultati si sono concretizzati nell'ottimizzazione di una tecnica di micropropagazione per il mantenimento dei parentali maschiosterili; sono stati ottenuti rigeneranti di embrioni somatici, partendo da espianati fogliari (Saccardo, 2002) ed inoltre l'induzione di variabilità somaclonale nel finocchio da seme ha permesso di selezionare su filtrato tossico cloni resistenti a patogeni fungini. Questi stessi metodi potrebbero essere applicati sul finocchio da grumolo permettendo di ottenere linee parentali resistenti a stress, da utilizzare negli incroci per la produzione di ibridi F₁ di interesse maggiore.

Per molti anni sul finocchio da grumolo è stata applicata una sorta di selezione massale da parte degli agricoltori che destinavano alla produzione di seme le piante migliori, spesso tali per possibili incroci spontanei, e oltretutto senza utilizzare una qualunque forma di isolamento. In questo modo è possibile migliorare alcuni caratteri a determinismo monogenico mentre scarsi sono i risultati quando si tratta di caratteri a variabilità continua come le caratteristiche del grumolo.

Nel tempo si è resa necessaria all'interno del vasto calendario di coltivazione una diversificazione netta dei tipi per una giusta collocazione temporale, rispondente alle caratteristiche fisiologiche. Ciò al fine di evitare sovrapposizioni o mescolanze di genotipi, con diverso adattamento alle temperature. La contemporaneità di maturazione è necessaria essendo il finocchio un ortaggio a raccolta unica; essa è la conseguenza prima dell'uniformità del ciclo vegetativo e consente che tutti i grumoli giungano a maturazione commerciale nello stesso momento a vantaggio di una maggiore uniformità di pezzatura. Oltre ai difetti derivanti dalla maturazione non contemporanea ce ne sono

di più gravi quali la presenza di abbondanti ricacci ascellari, la forma appiattita, l'eccessiva fibrosità e spugnosità delle guaine, la suscettibilità alle fessurazioni delle stesse, la scarsa compattezza del grumolo, la diversità di forma e colore con presenza contemporanea di grumoli tondeggianti e più o meno allungati e grumoli perfettamente bianchi con altri in cui diffusa ed evidente è la colorazione verde; non ultima, tra i difetti, è la sensibilità all'imbrunimento post-raccolta.

Attualmente le popolazioni e varietà coltivate in Italia, selezionate attraverso metodi di miglioramento genetico convenzionale (selezione massale e genealogica) possono essere suddivise in base all'epoca di semina: cultivar a semina estiva primaverile precoci (80-90 giorni) tra cui Mantovano, Bianco lento, Spring; cultivar a semina estiva precoci (80-90 giorni) tra cui Precoce di Sarno, Precoce d'Italia e Tusco; cultivar medio-tardive (110-130 giorni) tra cui Romanesco, Pontino, Montebianco; cultivar tardive (oltre 160 giorni) tra cui Tardivo di Sarno, Montebianco RF-6 e Brino.

In tutti gli ambienti si usano selezioni locali o varietà derivanti da selezioni locali ma, ormai prevalente, è l'impiego di ibridi F₁. Larga diffusione oggi in coltura trovano soprattutto ibridi Clause, Asgrow e Bejo.

La realizzazione di ibridi F₁ necessita la presenza nelle specie di meccanismi biologici tali da favorire l'incrocio tra le linee parentali selezionate; difatti il miglioramento genetico del finocchio ha uno dei suoi punti di forza nella produzione di ibridi F₁ attraverso lo sfruttamento della CMS (*Cytoplasmic Male Sterility*), caratteristica individuata dalla Clause probabilmente in una popolazione locale italiana (Acciarri, 2001).

1.3 Gli ibridi F1 nel miglioramento genetico del finocchio

Nel finocchio l'ottenimento di seme ibrido F₁ rappresenta un traguardo molto importante per raggiungere una elevata resa produttiva, una migliore qualità del grumolo e una maggiore resistenza ai fattori climatici e parassitari. In particolare difetti come la disformità del prodotto, la non contemporaneità di maturazione, la conservabilità, la suscettibilità della coltura agli stress biotici (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Erysiphe umbrelliferarum*, cimici, afidi, ecc) possono essere superati nella condizione ibrida (Saccardo, 2002). Tali vantaggi si manifestano nella combinazione di caratteri favorevoli presenti nelle linee parentali e per il fenomeno del lussureggiamento si evidenziano nelle condizioni di eterozigosi. L'ottenimento di ibridi F₁ in finocchio passa attraverso diverse fasi di lavoro:

- *Produzione di linee parentali maschiofertili*: selezione ed autofecondazione controllata di piante di interesse agrario da popolazioni locali e commerciali di finocchio. Attraverso più cicli di autofecondazione si ottengono linee parentali isogeniche fertili utilizzate per la realizzazione di ibridi F₁; le progenie sono valutate per caratteri morfologici (peso del grumolo, dimensioni, forma appiattita o globosa, colore, ricacci ascellari) e fisiologici (ciclo vegetativo, resistenza a stress biotici e abiotici);
- *Individuazione di linee maschiosterili*: selezione di piante maschiosterili nell'ambito di popolazioni di finocchio a ciclo estivo-primaverile e loro caratterizzazione genetica;
- *Produzione di linee parentali maschiosterili*: trasferimento della CMS da piante donatrici alle linee selezionate tramite il metodo del reincrocio; (figura 1a e 1b)

- *Produzione e selezione delle migliori combinazioni ibride*: produzione di diverse combinazioni ibride, valutazione agronomica a diverse epoche di impianto e analisi della qualità del grumolo delle stesse;

Normalmente sono necessari molti anni prima di produrre e selezionare le linee pure. Il metodo più utilizzato si basa sull'autofecondazione, che non solo è il metodo classico più veloce ma consente anche l'eliminazione spontanea di genotipi con alleli deleteri che vengono espressi nelle progenie da autofecondazione. Lo sviluppo di nuovi strumenti di miglioramento genetico ha consentito anche l'utilizzazione di tecniche differenti. Tra queste, particolare interesse ha suscitato la produzione di aploidi ed il successivo raddoppiamento del loro corredo cromosomico. Gli aploidi possono essere ottenuti in molte specie vegetali tramite la coltura di antere, di microspore o di ovuli e, nel momento in cui è disponibile il protocollo per la loro produzione, questa tecnica in vitro può risultare estremamente efficiente per produrre in poco tempo un elevato numero di individui aploidi. Il raddoppiamento cromosomico degli aploidi (effettuato tramite colchicina, orizalina o rigenerazione in vitro) consente poi la produzione di linee pure omozigoti. Tra queste si sceglieranno quelle che producono le migliori combinazioni ibride.

Al fine di incrementare le rese di seme F_1 per pianta sono state messe a punto tecniche di impollinazione in ambiente protetto, sia manuali che con l'utilizzo di mosche carnarie.

Ciò costituisce un problema che ricorre abbastanza frequentemente, soprattutto se si pensa che i parentali coinvolti sono linee pure che a volte soffrono di bassa fertilità. È proprio per rimediare a questo fattore limitante che in mais fu proposta la produzione di ibridi a 3 e a 4 vie, con maggiori garanzie nella produzione di seme.

Un altro fondamentale aspetto legato alla produzione di ibridi F_1 è quello dei costi. Le

operazioni di emasculazione, impollinazione, cartellinaggio, eliminazione dei frutti che derivano da autofecondazione spontanea etc, sono estremamente costose e possono far lievitare i prezzi ad un valore tale da non essere più vantaggioso economicamente. Per alcune colture, tipo mais, la struttura fiorale e la posizione dei fiori maschili e femminili rende le operazioni di emasculazione ed impollinazione abbastanza semplici, seppure costose. Per altre, però, oltre ai costi si deve anche considerare la difficoltà con cui le operazioni di emasculazione ed impollinazione vengono svolte. È questo il caso del frumento, che presenta una impollinazione cleistogama. Sono stati quindi proposti e sperimentati approcci alternativi per ridurre i costi di produzione di seme ibrido. Tra questi, particolarmente interessanti, sono stati quelli basati sull'uso di sostanze chimiche gametocide che, applicate sulle piante portaseme, inducono sterilità del polline. Ovviamente tali sostanze non devono alterare in alcun modo la fertilità femminile né avere effetti negativi sulla pianta. Sono indicate soprattutto quando la fioritura e la maturazione dei gameti maschili delle varie piante presenti nel campo avvengono contemporaneamente, così da limitare gli interventi ad uno o due. L'autoincompatibilità, infine, garantendo l'impollinazione incrociata a causa dell'impossibilità del polline prodotto dal portaseme di fecondare gli ovuli, rappresenta un'ulteriore strategia per l'abbattimento dei costi legati alla produzione di seme ibrido. Tuttavia, la strategia più utilizzata per la produzione commerciale di seme ibrido a costi relativamente bassi è quella che si basa sull'uso della maschiosterilità, la quale rappresenta un mezzo molto efficace di emasculazione genetica.

1.4 La maschiosterilità nelle specie di interesse agrario

La maschiosterilità è un fenomeno molto diffuso nel regno vegetale ed è legato alla produzione di gameti non funzionali o nella mancata produzione di gameti maschili. Come manifestazione fenotipica la maschiosterilità è associata ad un ampio spettro di anomalie riproduttive. In alcuni casi, infatti, i geni che determinano la maschiosterilità causano trasformazioni omeotiche degli stami in petali (fenotipo petaloide) o degli stami in carpelli (fenotipo carpelloide). Talvolta, la maschiosterilità non è dovuta ad alterazioni della meiosi o del processo di maturazione del polline, ma piuttosto all'impossibilità di una regolare deiscenza delle antere in seguito alla mancata degenerazione delle cellule dello strato del tappeto. Più frequentemente, tuttavia, i processi di sporogenesi e gametogenesi risultano alterati e il mancato sviluppo o lo sviluppo limitato delle antere è soltanto la diretta conseguenza della incapacità di formazione del polline. In alcuni casi, infine, il polline è apparentemente normale, ma non risulta funzionale. La maschiosterilità è controllata da fattori genetici (ms genetica), citoplasmatici (ms citoplasmatica) o da entrambi (ms genetico-citoplasmatica).

La maschiosterilità genetica è controllata generalmente da un singolo gene nucleare allo stato recessivo (ms). È stata riscontrata in numerose specie ed in quelle estensivamente studiate a livello genomico, come mais, orzo e pomodoro, diversi geni difettosi implicati nella determinazione della fertilità maschile sono stati localizzati in più gruppi di associazione. In mais, ad esempio, al momento sono noti almeno 20 geni responsabili del fenotipo maschiosterile. Il grosso inconveniente che limita lo sfruttamento della maschiosterilità genetica per la produzione di seme ibrido è legato all'impossibilità di avere individui al 100% sterili. Ciò rende difficoltosa l'eliminazione dei genotipi fertili nell'incrocio di mantenimento. Le piante maschiosterili, infatti, hanno un genotipo msms e possono essere mantenute soltanto attraverso l'incrocio con piante isogeniche

ma maschiofertili eterozigoti. La metà delle piante prodotte da un incrocio $msms \times Msms$ sarà maschiofertili ($Msms$) e l'altra metà maschiosterile ($msms$). Generalmente si ovvia a tale inconveniente propagando le linee $msms$, utilizzando marcatori molecolari o selezionando questi genotipi alla fioritura, operazione praticamente possibile soltanto se il gene della ms è pleiotropico o è strettamente associato ad un gene che si manifesta fenotipicamente sempre prima della fioritura (ad esempio il gene marcatore che determina il colore rosso dell'ipocotile delle foglie cotiledonari in girasole). Molti approcci molecolari sono stati usati per regolare la maschiosterilità genetica tra cui la trasformazione genetica. Ciò è particolarmente fattibile per le colture ortive che sono in grado di rigenerare in vitro e per le quali sono stati messi a punto buoni protocolli di trasformazione genetica.

Il secondo tipo di ms è determinata da geni presenti nei mitocondri ed è pertanto denominata maschiosterilità citoplasmatica. In questo caso le piante maschiosterili usate come genitore femminile producono seme solo in presenza di un impollinatore maschiofertile. Il seme ibrido prodotto darà origine però solo a piante maschiosterili in quanto il citoplasma dello zigote è fornito esclusivamente dalla pianta madre maschiosterile. Pertanto, questo tipo di ms è largamente utilizzato nella costituzione di varietà ibride in specie nelle quali il seme non rappresenta il prodotto principale, come il finocchio, la cipolla e le specie da fiore. A causa del suo valore nella produzione di seme ibrido, i sistemi di maschiosterilità citoplasmatica sono stati identificati e caratterizzati in molte specie di interesse agrario. Diversi tipi di citoplasmi maschiosterili, ad esempio, sono stati identificati in genotipi comunemente utilizzati nei programmi di miglioramento genetico. I più noti sono il citoplasma "T" di mais, il citoplasma "pol" della colza, il citoplasma "S" della cipolla. Almeno 14 geni mitocondriali associati alla ms citoplasmatica sono stati identificati mediante tecniche di

mappaggio fisico comparativo e/o analisi dei profili di espressione di piante sterili, fertili, e fertili ristorate. Tali geni sono spesso chimerici, derivando dalla fusione di porzioni di geni con funzioni e origine sconosciuta ed in molti casi le sequenze che determinano CMS non sono correlate tra di essi.

L'ultimo tipo di maschiosterilità risulta dalla interazione di fattori citoplasmatici e nucleari e per questo è denominata genetica-citoplasmatica. In questo caso le piante con citoplasma S non sono necessariamente maschiosterili poiché la presenza di particolari geni, detti ristoratori (R), con sede cromosomica può ripristinare del tutto o in parte la fertilità maschile. Gli impollinatori in grado di fornire progenie maschiofertili sono dotati di geni R che permettono la produzione di polline funzionale, sovrapponendosi all'azione sterilizzante del citoplasma S. In mais sono noti almeno quattro geni ristoratori della fertilità: Rf1, Rf2, Rf3 e Rf4. Nell'utilizzazione della ms genetica-citoplasmatica è necessario disporre di una linea portaseme maschiosterile citoplasmatica (la quale non produce polline), di una linea mantenitrice isogenica ma maschiofertile (che produce polline) ed una linea ristoratrice omozigote dominante al locus R (la quale produce polline). In questo modo, l'incrocio di mantenimento produrrà una progenie tutta sterile, mentre l'incrocio per produrre la F₁ darà una progenie tutta fertile. La ms genetica-citoplasmatica è quella più largamente utilizzata per la produzione di ibridi F₁ in numerose specie. Inoltre è quella che meglio si presta nella costituzione delle varietà ibride in quelle specie dove il seme è il prodotto principale, come sorgo e girasole. Essa potrà essere ancora più utilizzata quando saranno superati alcuni problemi che, a volte, si hanno con la sua utilizzazione. Essi sono legati alla identificazione e selezione di linee di mantenimento e di ristorazione (e in questo caso le tecniche di ingegneria genetica possono essere di grande aiuto), all'assenza di effetti negativi associati alla ms (ad esempio una maggiore suscettibilità alle malattie),

all'efficienza fotosintetica e alla morfologia florale.



Figura 1a: particolare di infiorescenza maschiofertile.



Figura 1b: particolare di infiorescenza maschiosterile.

1.5 I marcatori molecolari e la selezione assistita da marcatori (MAS)

Un settore di notevole interesse e grandi potenzialità aperto dalle biotecnologie è quello dell'analisi del genoma basata sulla rilevazione di marcatori molecolari. È un settore in continua e rapida modificazione al quale contribuiscono, da un lato, la disponibilità di strumentazioni sempre più affidabili e, dall'altro, la sempre migliore conoscenza della struttura, dell'organizzazione e delle funzioni degli acidi nucleici. Dall'inizio degli anni '80 i marcatori molecolari sono stati utilizzati su numerose specie di interesse agrario, tra cui patata, pomodoro, mais e *Brassica spp.*. Il principio su cui si basa l'applicazione di quest'ultimi deriva dal fatto che la loro rivelazione non è direttamente riferibile all'attività di specifici geni, come per i caratteri morfologici o gli isoenzimi, ma si basa direttamente sull'identificazione di differenze nella sequenza nucleotidica del DNA (inserzioni, delezioni, inversioni, ecc) che costituisce il genoma di ogni individuo. Tali marcatori rispetto ai marcatori morfologici presentano numerosi vantaggi. Essi, essendo espressione del genotipo e non del fenotipo, non subiscono interferenze da parte

dell'ambiente, possono essere evidenziati nelle prime fasi di sviluppo della pianta e con pochissima quantità di tessuto e non hanno effetti deleteri sulla morfologia della stessa (fenotipo-neutrali).

Diversi tipi di marcatori sono oggi utilizzati nel miglioramento genetico, ciascuno con caratteristiche più o meno idonee ai diversi scopi che si prefigge l'analisi molecolare a livello del DNA. Essi essenzialmente si basano su due approcci, che possono essere alternativi o combinati in vario modo: la digestione del DNA con enzimi di restrizione e l'amplificazione del DNA mediante reazione a catena della polimerasi (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). La scelta dei vari tipi di marcatori, può dipendere anche dal tipo di attrezzature richieste per poter realizzare le varie tecniche, dal loro costo e dalla rapidità di impiego. Tra i marcatori molecolari oggi usati nel lavoro di miglioramento genetico vi sono i RAPD (*Rapid Amplified Length Polymorphism*), gli AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), i CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*), gli SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), gli STS (*Sequence Tagged Site*), i microsatelliti i SSR (*Simple Sequence Repeat*).

Tra le varie applicazioni dei marcatori molecolari negli studi di genetica e miglioramento genetico, vi è lo sviluppo di dettagliate mappe di associazione (*linkage maps*), le quali permettono la comparazione tra genomi di gruppi tassonomici diversi e la rivelazione di correlazioni e omologie genetiche (sintenia). Il ruolo dei marcatori molecolari è diventato sempre più importante non solo nel miglioramento genetico di piante erbacee ma anche arboree, forestali, ornamentali, negli studi di filogenesi e nel trasferimento di geni. Tra le numerose applicazioni dei marcatori molecolari, la selezione assistita e il DNA fingerprinting (o impronta genetica del DNA) per l'identificazione varietale hanno trovato largo impiego nel miglioramento genetico.

DNA Fingerprinting. Il *fingerprint* del DNA, termine che in italiano potrebbe essere assimilato all'impronta digitale genomica, è usato per evidenziare le differenze presenti nella sequenza di DNA tra due o più campioni a confronto, al fine di determinarne l'identità o accertarne le correlazioni esistenti. La "genotipizzazione" è usata anche come fonte di marcatori genetici per costruire mappe di linkage o per identificare marcatori molecolari legati a caratteristiche fenotipiche e/o loci genetici. Negli ultimi anni sono state sviluppate molte tecniche di fingerprint del DNA, basate essenzialmente su due strategie: l'ibridazione, che prevede il taglio del DNA genomico con endonucleasi di restrizione seguito dalla separazione elettroforetica dei frammenti di restrizione; con questa metodica il polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLPs) è messo in evidenza attraverso una ibridazione SOUTHERN con sonde specifiche per le regioni di DNA molto variabili; e l'amplificazione mediante PCR, che prevede l'amplificazione in vitro di particolari sequenze di DNA usando primer specifici od arbitrari; in questa metodica, invece, i prodotti di amplificazione sono poi separati tramite elettroforesi e rilevati attraverso la colorazione o l'uso di primer marcati. Le tecniche di questa categoria includono il DNA polimorfico amplificato a caso (RAPD), il DNA fingerprint amplificato (DAF) e la PCR a primer arbitrari (AP-PCR).

I marcatori I-SSR, noti più semplicemente come Inter-microsatelliti (Zietkiewicz *et al.*, 1994) utilizzano inneschi oligonucleotidici disegnati in modo tale che, unitamente alla ripetizione di monomeri molto semplici con due, tre o quattro nucleotidi come unità di base, presentino anche basi selettive all'estremità 3' oppure 5'. In questo modo, mediante PCR vengono amplificate le regioni comprese fra due microsatelliti. Tuttavia è necessario specificare che soltanto con primer ancorati in 5' è possibile amplificare interamente anche i due microsatelliti che delimitano il marcatore. Nel caso di primer

ancorati in 3' il tratto amplificato comprende soltanto la regione interna terminale dei due microsatelliti. I polimorfismi dipendono dalla lunghezza del tratto di DNA compreso tra due regioni microsatelliti aventi lo stesso motivo ripetuto, dal numero di ripetizioni presenti nei singoli microsatelliti e dalle sequenze delle regioni fiancheggianti i siti di attacco dei primer. Oltre al vantaggio di essere riproducibili, rapidi e poco costosi, l'elevata variabilità delle regioni di DNA inter-microsatellite rende tali marcatori particolarmente efficaci nella caratterizzazione genomica. Uno degli svantaggi più evidenti risiede nella natura dominante di tali marcatori che non consentono di distinguere la situazione all'elica ad un dato locus.

La selezione assistita (MAS). Interesse notevole ha suscitato l'uso dei marcatori molecolari per la selezione assistita, cioè nella selezione precoce per il carattere d'interesse, non più a livello del fenotipo mediante marcatori morfologici, bensì a livello del genotipo attraverso l'analisi dei marcatori molecolari. Tale possibilità, apparsa subito molto affascinante a coloro che operano nel settore del miglioramento genetico, ha portato a parlare di breeding o selezione assistita da marcatori molecolari (MAS, *Marker Assisted Selection*). Per permettere di seguire la segregazione del gene saggiando la presenza del marcatore è necessario che il marcatore abbia bassissima percentuale di ricombinazione con il gene in selezione, vale a dire che il marcatore ed il gene siano strettamente associati tra loro. Una volta stabilita l'associazione tra il gene d'interesse e il marcatore è possibile seguire la segregazione del gene nella progenie per realizzare i programmi di miglioramento genetico.

La selezione per marcatori genetici strettamente associati al gene da selezionare, relativamente più semplici da rilevare, può facilitare la selezione di caratteri di interesse, di più difficile determinazione. In pratica, è individuata la presenza di un gene di

interesse (resistenza, maschiosterilità, autoincompatibilità, architettura della pianta, del fiore, dei frutti, ecc) attraverso la presenza del marcatore strettamente associato al gene, in quanto geni associati sono trasmessi assieme. La selezione per marcatori associati può essere quindi più efficace di quella diretta. La selezione assistita da marcatori molecolari consente di eseguire uno screening direttamente sul DNA di piantine in fase precoce di sviluppo, senza aspettare la fase fenologia specifica in cui tale carattere si esprime (che può essere anche la fioritura o la completa maturazione dei frutti), accelerando quindi i tempi e riducendo gli spazi necessari al lavoro di selezione, che spesso richiede anche l'analisi di migliaia di genotipi differenti. Infatti, dopo aver identificato uno o più marcatori associati al carattere da selezionare, lo screening è effettuato su piccoli quantitativi di DNA estratto da vari tessuti della pianta, senza determinarne la distruzione. Ciò consente di analizzare contemporaneamente più caratteri e di effettuare più cicli di selezione nello stesso anno.

Attualmente la selezione assistita è utilizzata per l'ottenimento di genotipi superiori sia per la resistenza a stress biotici, che per i caratteri produttivi o di qualità. Nel primo caso la MAS mostra chiaramente i suoi vantaggi quando il carattere si esprime nelle ultime fasi di sviluppo della pianta, quando l'espressione del carattere è recessiva e quando sono richieste articolate operazioni prima che il gene sia rilevabile.

1.6 Obiettivi della tesi

Tutto il lavoro di selezione, di breeding e di valutazione fenotipica è stato svolto presso l'azienda, i campi e le serre sperimentali de "La Semiorto Sementi", società sementiera italiana sita in Sarno, che ha finanziato una borsa di studio per un dottorato di ricerca in collaborazione con il DISSPAPA dell'università di Napoli Federico II. Per la specie finocchio, ortiva di forte interesse economico per l'azienda finanziatrice, obiettivi del lavoro sono stati:

1. La produzione di ibridi F_1 : Interesse dell'azienda è la costituzione di nuove varietà, diverse per epoca di impianto (trapianto da maggio a ottobre) e per precocità (ciclo dai 70 ai 160 giorni), che bene si possano adattare agli areali italiani di produzione di finocchio e che possano ampliare il parco varietale aziendale già ben fornito in ecotipi locali. Il materiale di partenza di queste nuove varietà è stato individuato nei finocchi Precoce, Medio Precoce e Tardivo di Sarno, eccelsi dal punto di vista organolettico ma con difetti evidenti per ciò che riguarda l'uniformità varietale e la produttività. La produzione di ibridi F_1 è l'obiettivo principe di questo lavoro triennale, basti pensare che oggi oltre il 90% del seme ibrido di specie ortive venduto dalle aziende sementiere è rappresentato da ibridi F_1 in quanto essi garantiscono: a) produzioni elevate (eterosi); b) uniformità elevata; c) trasferimento di caratteri utili di due genitore in un unico genotipo; d) elevati margini di guadagno.

2. La caratterizzazione molecolare della CMS. Altro obiettivo è lo studio e la caratterizzazione molecolare della CMS. Innumerevoli studi sulla maschiosterilità hanno riguardato diverse specie appartenenti a diverse famiglie di interesse agrario ma l'interesse scientifico nei riguardi della specie finocchio è praticamente nullo. La messa a punto di eventuali marcatori molecolari associati ad essa può essere uno strumento potente di cui il breeder può avvalersi nel suo lavoro di miglioramento genetico. Lo

sviluppo di marker associati alla CMS, congiuntamente a studi riguardo alla ristorazione nella specie finocchio, consentirebbe al costituente varietale di utilizzare strumenti fondamentali per selezionare a monte del lavoro genotipi fertili ma non ristorati, genotipi sterili e genotipi ristorati (da eliminare). Visto l'interesse crescente del mercato nei riguardi di questa specie ortiva e visti gli sforzi profusi da multinazionali sementiere nel costituire ibridi sempre più performanti e rispondenti alle esigenze del mercato stesso, ben si può comprendere il duplice orientamento pratico e scientifico di questo dottorato di ricerca.

3. *La genotipizzazione di varietà locali e commerciali.* La genotipizzazione di varietà locali e commerciali ha una duplice finalità: la prima è quella di caratterizzare in maniera univoca il materiale genetico della “La Semiorto Sementi”; la seconda è quella di avere un' indicazione precisa, congiuntamente ad attente valutazioni di campo, circa la diversità del materiale commerciale reperito e degli ecotipi locali da utilizzare come parentali per la produzione di ibridi F₁.

2 **Materiali e metodi**

2.1 **Materiale vegetale**

Il materiale vegetale utilizzato in questo studio era costituito da: tre linee inbred CMS di finocchio, (MsR₃ x Napoli), (MsR₁ x Tarquinia) e (MsR₂ x Chiarino), tre ecotipi dell'agro-nocerino-sarnese, Precoce di Sarno, Medio Precoce di Sarno e Tardivo di Sarno, cinque varietà commerciali, Chiarino, Selma, Giulio, Helvia e Zafiro, (tabella 2). Le linee inbred sono state fornite dal Prof. Francesco Saccardo dell'università degli studi della Tuscia; gli ecotipi sono stati forniti dall'azienda "La Semiorto Sementi".

2.1.1 **Allevamento del materiale vegetale**

Nel triennio 2006-08 tutto il materiale genetico è stato allevato presso i campi e le serre sperimentali dell'azienda "La Semiorto Sementi", sita in località Lavorate nel comune di Sarno in provincia di Salerno, come indicato di seguito: le semine sono state effettuate ogni anno prima del 15 agosto in contenitori alveolati da 190 fori ed e dopo 50 giorni le piantine sono state trapiantate in pieno campo ad una distanza di 20-25 cm sulla fila e di 40-50 cm tra le file. Durante il ciclo colturale sono stati rispettati i fabbisogni nutritivi (200 kg/ha di N, 100 kg/ha di P, 100 kg/ha di K) ed idrici (4000 m³/ha di acqua) della coltura e si è provveduti con giudizio al controllo dei principali patogeni (*Cercospora foenicula*, *Sclerotinia* spp, *Rhizoctonia solani*, etc) e fitofagi (*Calocoris norvegicus*, *Depressaria marcella* e afidi).

Le piante sono state allevate in pieno campo fino alla maturazione commerciale. Eseguita la selezione fenotipica sui grumoli esse sono state messe a dimora in vasi dal diametro di 50 cm, in coltura protetta, fino a fioritura. L'epoca di maturazione commerciale dei grumoli è ricaduta ogni anno tra la prima decade di febbraio e la prima

decade di marzo; unica eccezione è l'ecotipo Tardivo di Sarno, pronto in termini commerciali nell'ultima decade di aprile.

La fioritura di tutto il materiale vegetale si è concentrata nei mesi di giugno-luglio ove si è proceduti in primo luogo a valutare con cura su base visiva l'effettiva maschiosterilità del materiale selezionato e in secondo luogo ad eseguire gli opportuni incroci e reincroci su infiorescenze debitamente isolate mediante piccoli isolatori di tessuto non tessuto delle dimensioni di 25 cm di larghezza e 40 cm di lunghezza. Le infiorescenze fertili sono state recise con delle forbicine e strofinate sulle infiorescenze maschiosterili che successivamente erano isolate fino a formazione dei semi.

2.2 Analisi fenotipica e programma di miglioramento

Tutto il programma di miglioramento genetico è stato condotto presso i campi e le serre sperimentali dell'azienda "La Semiorto Sementi s.r.l."

Obiettivo finale del lavoro è l'ottenimento di coppie isogenetiche (maschiosterili/maschiofertili) diverse per precocità e per epoca d'impianto da combinare con altre linee stabili per l'ottenimento di ibridi F_1 . Alcuni ibridi commerciali leader di mercato hanno rappresentato l'ideotipo del lavoro di breeding. Il programma di miglioramento ha previsto l'utilizzo di un classico schema di incrocio e reincrocio, i cui parentali donatori per la maschiosterilità sono rappresentati dalle linee inbred (MsR_3 x Napoli), (MsR_1 x Tarquinia) e (MsR_2 x Chiarino), mentre i parentali ricorrenti sono rappresentati dagli ecotipi locali Precoce di Sarno, Medio Precoce di Sarno e Tardivo di Sarno (figura 2). Ogni anno dal mese di novembre a quello di aprile, la valutazione fenotipica è stata effettuata con diversi sopralluoghi nei campi sperimentali

aziendali utilizzando i descrittivi UPOV. I caratteri considerati per la selezione fenotipica e le rispettive unità di misura sono di seguito riportate:

- giovane pianta, lunghezza dei cotiledoni (cm);
- giovane pianta, lunghezza del peziolo della prima foglia (cm);
- portamento fogliare: eretto, semieretto, prostrato;
- densità del fogliame: lasca, media, densa;
- intensità del colore verde delle foglie: molto chiaro, chiaro, medio, scuro, molto scuro;
- lunghezza foglie (cm);
- curvatura dell'apice: assente, accennata, presente;
- altezza del grumolo (cm);
- larghezza del grumolo (cm);
- spessore del grumolo (cm);
- forma in sezione trasversale del grumolo: circolare, ellittica;
- colore esterno del grumolo: bianco, verde;
- intensità del colore verde del grumolo: chiaro, medio, scuro;
- sovrapposizione delle guaine: lieve, media, forte;
- epoca di maturità del grumolo (giorni);
- tendenza alla fioritura: lieve, media, forte, molto forte.
- maschiosterilità: presenza/assenza.

In particolare il carattere maschiosterilità è stato valutato osservando lo sviluppo delle antere in fase di piena fioritura. Sono stati classificati maschiosterili i genotipi che hanno mostrato antere imbrunite e degenerate.

Tabella 2. materiale vegetale: per ciascun genotipo è riportato il codice identificativo, la provenienza e la descrizione.

Codice	Descrizione	Provenienza
Linea 2	Precocissimo	Semiorto s.r.l.
Linea 4	Precece	Semiorto s.r.l.
Linea 6	Medio precoce	Semiorto s.r.l.
Linea 8	Tardivo	Semiorto s.r.l.
Linea 9	(MsR ₁ x Tarquinia)	UNITuscia
Linea 10	(MsR ₃ x Napoli)	UNITuscia
Linea 11	varietà Giulio	commerciale
Linea 12	varietà Helvia	commerciale
Linea 13	varietà Chiarino	commerciale
Linea 14	varietà Selma	commerciale
Linea 15	(MsR ₂ x Chiarino)	UNITuscia
Linea 16	varietà Zafiro	commerciale

Il reincrocio

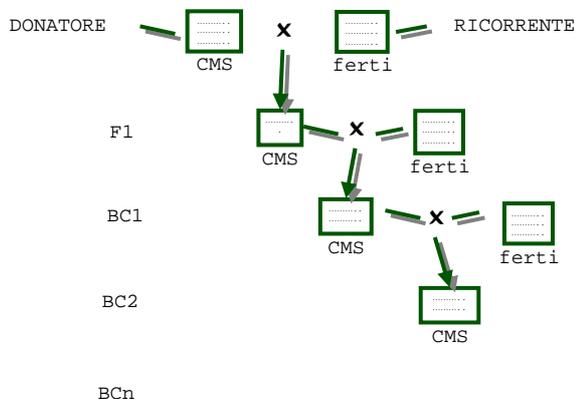


Figura 2: metodo del reincrocio; i parentali ricorrenti sono gli ecotipi Precoce, Medio Precoce e Tardivo di Sarno; i parentali donatori sono rappresentati dalle linee inbred (MsR₃ x Napoli), (MsR₁ x Tarquinia), (MsR₂ x Chiarino).

2.3 Quantizzazione degli acidi nucleici

La quantizzazione degli acidi nucleici presenti nelle soluzioni utilizzate nel corso delle analisi molecolari, nonché la loro dimensione in bp, sono stati determinati mediante valutazione dell'intensità della fluorescenza emessa dal bromuro di etidio. Tale metodica risulta rapida ed accurata anche con concentrazioni iniziali di DNA inferiori ai 250 ng/ml. Il principio del metodo è quello di utilizzare la fluorescenza emessa dalle molecole di bromuro di etidio intercalate nel DNA in seguito all'eccitazione indotta dai raggi UV. Poiché l'intensità della fluorescenza è proporzionale alla massa totale del DNA, la quantità di DNA presente nel campione può essere stimata per paragone con la fluorescenza emessa da campioni standard a quantità nota di DNA. Con questo metodo si possono rilevare anche quantità di DNA molto piccole dell'ordine di 1-5 ng (Sambrook *et al.*, 2001).

A tale scopo è stato preparato un gel di agarosio in tampone TAE, con percentuale di agarosio dell'1%, a cui sono stati aggiunti, prima della solidificazione, 0,03 µl/ml di bromuro di etidio. I campioni da visualizzare su gel sono stati preparati aggiungendo a 3-10 µl di DNA, a seconda della concentrazione che ci si aspettava, 2 µl di colorante, e 5 µl di acqua. Il colorante ha la duplice funzione di tracciare il percorso del campione e di facilitarne il caricamento nel pozzetto del gel.

Gli standard di riferimento sono rappresentati da soluzioni a concentrazione note di DNA derivate dal Fago λ per la quantità e dal marcatore di peso molecolare *1Kb Plus* (Invitrogen) per la grandezza del frammento in bp. Il gel viene poi visualizzato e fotografato al transilluminatore (Biorad) e successivamente sottoposto a scansione mediante Typhoon (Amersham) e quantizzato tramite analizzatore d'immagine ImageQuant.

Buffer Utilizzati

Colorante

4M Urea; 50% Saccarosio; 50 mM EDTA pH 8.0; 0.1% Bromofenolo Blu.

TAE pH 7.8 (con acido acetico)

10 mM Tris-HCl pH 7.8; 5 mM Acetato di Sodio; 0.5 mM EDTA;

2.4 Analisi del genoma totale mediante AFLP

Estrazione, digestione e ligazione del DNA: il DNA del materiale utilizzato in questa analisi, ovvero le linee inbred (MsR₃ x Napoli) e (MsR₂ x Tarquinia), gli ecotipi Precoce di Sarno e Medio Precoce di Sarno, le combinazioni ibride F₁, [(MsR₃ x Napoli) x Precoce di Sarno] e [(MsR₁ x Tarquinia) x Medio Precoce di Sarno], è stato estratto dalle foglie cotiledonari di piante allevate in vivaio all'età di 50-60 giorni usando il QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit e seguendo le istruzioni riportate sul manuale fornito dal produttore. Il DNA estratto è stato quantificato secondo procedura riportata al punto 2.3.

Il DNA estratto è stato sottoposto ad analisi AFLP secondo il protocollo di Vos *et al.* (1995). Il DNA genomico è stato digerito in una miscela di reazione contenente DNA (125 ng), buffer 5X (2.5 µl) ed EcoRI/M-seI (1 µl); è stata aggiunta acqua fino a raggiungere un volume finale di 12.5 µl. Il tampone di reazione 5X è costituito da Tris-HCl pH 7.5 (50 mM); acetato di magnesio 50 mM; acetato di potassio (250 mM). La miscela di reazione è stata incubata a 37°C per due ore, quindi a 70°C per 15 minuti per inattivare le endonucleasi di restrizione. Il DNA digerito è stato sottoposto alla reazione di legazione mediante aggiunta di: 1U di T4 DNA ligasi in Tris HCl 10 mM a pH 7.5,

DTT 1.0 mM, KCl 50 mM, glicerolo 50% (v/v); adattatore a doppia elica EcoRI (2.5 pmoli) ed adattatore a doppia elica MseI (2.5 pmoli), contenuti in una soluzione di ATP 0.4 mM, Tris HCl 10 mM a pH 7.5, acetato di magnesio 10 mM e acetato di potassio 50 mM.

La reazione è stata sottoposta per due ore ad una temperatura di 20°C ed il prodotto è stato diluito 1:10 con TE 1X (Tris HCl pH 8.0, EDTA 0.1 mM). Le sequenze degli adattatori sono qui riportate: Adattatore EcoRI: 5'CTCGTAGACTGCGTACC3', 3'CATCGACGCATGGTTAA5'; Adattatore MseI: 5'GACGATGAGTCCTGAG3', 3'TACTC AGGACTCAT5'.

Amplificazione preselettiva: il DNA ligato e diluito (1:10), è stato pre-amplificato in una reazione con volume finale di 26 µl contenente: DNA ligato diluito 1:10 (2.5 µl), buffer PCR 10X (2.5 µl), Taq-polimerasi 5U/ml (0.5 µl), Primer mix (20,5 µl). Il buffer PCR 10X contiene Tris HCl pH 8.4 (200 mM), MgCl (15 mM), KCl (500 mM), dNTP (0.8 mM). I primer di pre-amplificazione presentano una singola base selettiva all'estremità 3' e riconoscono le estremità generate nella precedente reazione di ligazione: (EcoRI primer-preselettivo: 5'GACTGCGTACCAATTCN 3'; MseI primer-preselettivo: 5'GATGAGTCCTGAGTA AN 3'). È stata sempre usata come base la A per il primer EcoRI e la C per il primer MseI. I campioni sono stati amplificati seguendo il seguente ciclo di temperature: 20 cicli a 94°C per 30 secondi, 56°C per 60 secondi e 72°C per 60 secondi. I prodotti di reazione sono stati diluiti 1:30 con TE 1X.

Amplificazione selettiva: la miscela di componenti di reazione per l'amplificazione selettiva di ciascun campione è stata preparata nel seguente modo: primer EcoRI (0.5 µl), primer MseI (4.5 µl), Taq polimerasi 5U/µl (0.1 µl), buffer PCR 10X (2 µl), DNA pre-amplificato diluito 1:30 (5 µl). L'acqua è stata aggiunta fino a raggiungere un volume finale di 20 µl. Entrambi i primer utilizzati presentano un'estensione selettiva al

3' costituita da tre nucleotidi (Primer Eco: 5'GACTGCGTACCAATTCNN3'; Primer Mse: 5'GATGAGTCCTGAGTAANN 3'). La reazione PCR è, inizialmente, di tipo "touch down" con decremento di 1°C della temperatura di annealing ad ogni ciclo di amplificazione: 10 cicli a 94°C per 60 secondi, 65°C per 60 secondi e 72°C per 90 secondi. Alla reazione di "touch down" segue il successivo ciclo di amplificazione: 23 cicli a 94°C per 60 secondi, 56°C per 60 secondi e 72°C per 90 secondi.

Il prodotto di reazione di ciascun campione (20 µl) è stato miscelato con un uguale volume di tracciante e denaturato a 90 °C per 5 minuti. Successivamente, 4 µl di tale miscela sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel denaturante al 6% di acrilammide/urea (20:1) in un tampone TBE 1X ad un voltaggio costante di 1600V. La corsa elettroforetica è stata effettuata per tre ore, fino a quando la banda più lenta del tracciante era sul punto di uscire dal gel.

L'analisi AFLP è stata condotta su undici genotipi di finocchio appartenenti a due linee inbred maschiosterili, (MsR₃ x Napoli) e (MsR₂ x Tarquinia), due linee fertili, ecotipo Precoce di Sarno ed ecotipo Medio Precoce di Sarno, e due combinazioni ibride F₁, [(MsR₃ x Napoli) x Precoce di Sarno] e [(MsR₁ x Tarquinia) x Medio Precoce di Sarno]. Diciassette combinazioni di EcoRI/MseI sono state utilizzate (tabella 3).

Tabella 3: combinazioni di primer EcoRI/MseI utilizzate nelle amplificazioni selettive. Le triplette si riferiscono ai tre nucleotidi selettivi al 3' di ciascun primer.

EcoRI/MseI	CAA	CAC	CAG	CAT	CTA	CTC	CTG	CTT
AAC					X	X	X	X
AGG	X				X		X	X
ACT	X		X	X		X	X	
ACC	X		X			X	X	

2.5 Analisi del genoma citoplasmatico

L'analisi del genoma mitocondriale è stata realizzata sulle linee inbred (MsR₃ x Napoli) e (MsR₂ x Tarquinia), sugli ecotipi Precoce di Sarno e Medio Precoce di Sarno, sulle combinazioni ibride F₁, [(MsR₃ x Napoli) x Precoce di Sarno] e [(MsR₁ x Tarquinia) x Medio Precoce di Sarno]. Il DNA è stato estratto utilizzando foglie cotiledonari di piante allevate in vivaio all'età di 50-60 giorni usando il QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit e seguendo le istruzioni riportate sul manuale fornito dal produttore. La sua quantizzazione è stata eseguita come riportato al punto 2.3.

Venticinque nanogrammi di DNA genomico sono stati utilizzati per le amplificazioni PCR. Sono stati utilizzati quattro primer altamente specifici per il genoma mitocondriale (mtDNA) (tabella 4).

La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume di 25 µl nelle seguenti condizioni: DNA (30-50 ng), dNTP (200 µM ciascuno), buffer 1X, MgCl₂ (3µM), Taq-polimerasi (0,2 U), primer (0,4 µM ciascuno) e acqua fino a volume finale (25 µl).

I campioni sono stati amplificati secondo il seguente ciclo di temperature: 94°C per 4 minuti; 30 cicli 94°C per 1 minuto - "annealing" per 1 minuto - 72°C per 3 minuti; estensione finale a 72°C per 10 minuti. I prodotti di amplificazione sono stati direttamente analizzati attraverso elettroforesi in un gel all'1% agarosio e colorati con bromuro di etidio.

Tabella 4 – Coppie di primer specifici per regioni del DNA mitocondriale (mtDNA) utilizzate per caratterizzare genotipi di finocchio CMS e genotipi fertili. Per ciascun primer è riportata la regione genomica amplificata, la temperatura di “annealing” e la referenza.

Coppie di primer (codice) ^a	Regione genomica	Temperature di “Annealing” (°C)	Referenze per la sequenza ^b
NSm2	<i>rpl5-rps14</i>	58	5
Alm4/5	<i>Ψcob-rps10</i>	57	1
NSm1	<i>rpl5-rps14</i>	58	5
pumD	<i>rps14-cob</i>	57,5	2

^a Codice primer come riportato in Bastia *et al.* (2001) e Scotti *et al.* (2003). ^b 1 = Lössl *et al.* (1999); 2 = Demesure *et al.* (1995); 5 = Scotti (2007)

2.6 Isolamento, clonaggio ed analisi bioinformatiche del DNA

Analisi del gel ed isolamento dei frammenti di DNA: il gel di acrilammide su cui sono stati separati i frammenti AFLP, dopo che uno dei due vetri entro i quali è racchiuso è stato rimosso, è stato digitalizzato mediante scanner Typhoon (Amersham).

L'immagine così ottenuta è stata studiata tramite analizzatore d'immagine ImageQuant al fine di individuare bande polimorfiche. Successivamente è stata effettuata una stampa in dimensioni reali dell'immagine, su cui sono stati evidenziate a mano le bande di interesse individuate dalla precedente analisi. In seguito, utilizzando i riferimenti laterali, è stato asportato in maniera precisa il gel in corrispondenza delle bande di interesse.

I frammenti di DNA sono stati estratti riponendo i pezzi di gel tagliati in tubi da 1,5 ml contenenti 100 µl di acqua per 24 ore alla temperatura di 4°C. Successivamente è stata effettuata un'amplificazione selettiva del frammento ottenuto. La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume di 50 µl nelle seguenti condizioni: DNA recuperato (20 µl), primer EcoRI 0,8 µl (10 ng/µl), primer MseI 1,2 µl (50 ng/µl), dNTP 0,8 µl (10mM), buffer PCR 10X 4 µl, MgCl₂ 1,2 µl, Taq polimerasi 0,4 µl (5U/µl),

acqua distillata sterile 11,6 µl. La rispondenza del frammento amplificato a quello individuato al momento dell'analisi del gel è stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% in TAE, in presenza del marcatore di peso molecolare *1Kb Plus* (Invitrogen).

Accertata l'identità della banda selezionata, il prodotto della reazione di amplificazione è stato purificato con il "QIAquick PCR Purification Kit" della Qiagen e quantizzato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% in TAE, come riportato per l'analisi AFLP.

Clonaggio dei frammenti di DNA: il prodotto di amplificazione dei frammenti di DNA estratti dal gel è stato clonato mediante Qiagen PCR cloning kit. Il vettore è stato ligato ai frammenti PCR e poi utilizzato per la trasformazione di cellule competenti di *Escherichia coli* tipo [F':::Tn10(Tc^r) *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q ZΔM15] *recA1 endA1 hsdR17*(r_{k12}⁻ m_{k12}⁺) *lac gln V44 thi-1 gyrA96 relA1*, in seguito a shock termico (Quiagen EZ Competent Cells).

Per la trasformazione con prodotti PCR di circa 200bp sono stati usati circa 16 ng di frammento amplificato per 50 ng di plasmide (rapporto molare di circa 6:1).

La trasformazione è stata condotta in 10 µl di volume totale utilizzando 50 ng di *p-drive cloning vector* ed un quantitativo di frammento amplificato tale da essere in rapporto molare di 5:1 con il vettore (tabella 5). La reazione di ligazione è stata incubata in frigorifero (circa 5°C) per mezz'ora o più e poi conservata a 20°C o utilizzata direttamente per gli step di trasformazione.

Tabella 5: Reazione di ligazione al plasmide dei frammenti di DNA isolati.

Sostanza/Reagente	Volume (μl)
pDrive Cloning Vector (50 ng/ μl)	1
frammento da clonare	da 1 a 4
Acqua distillate sterile	da 0 a 3
Ligation Master Mix 2X	5

Per la trasformazione, le cellule competenti Qiagen EZ sono state scongelate, unite a 2 μl di reazione di ligazione ed incubate in ghiaccio per 5 minuti. Lo *shock* termico è stato procurato ponendo le cellule a 42°C per 30 secondi e poi nuovamente in ghiaccio per 2 minuti.

Le cellule così trattate sono state addizionate con 250 μl di SOC medium e immediatamente piastrate su substrato LB (Luna Bertani) solido contenente ampicillina (100 $\mu\text{g/ml}$), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galattopiranoside, 80 $\mu\text{g/ml}$) e IPTG (isopropil- β -D-thiogalattopiranoside 50 μM) e incubate a 37°C per una notte.

Dato che l'antibiotico seleziona le colonie contenenti il plasmide da quelle non trasformate e la colorazione bianca distingue le colonie in cui il gene *Lac Z* del plasmide è interrotto dall'inserito (figura 3 in appendice), le colonie bianche sono state prelevate e propagate individualmente in tubi contenenti 5 ml di substrato LB liquido e sottoposte ad estrazione del DNA plasmidico dopo un ulteriore giorno di incubazione a 37°C.

Contemporaneamente, l'ansa contaminata con ciascuna colonia è stata stemperata in 10 μl di acqua distillata. Un'aliquota di 3 μl è stata utilizzata per verificare la presenza dell'inserito, mediante una amplificazione di controllo effettuata direttamente su colonia. La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume finale di 50 μl nelle seguenti condizioni: colonia (3 μl), primer M13 forward 0,4 μl (50 ng/ μl), primer M13 reverse 0,6 μl (50 ng/ μl), dNTP 2 μl (10 mM), buffer PCR 10X 5 μl , MgCl_2 1,5 μl , Taq polimerasi 0,2 μl (5 U/ μl), acqua distillata 37,3 μl .

I campioni sono stati amplificati secondo il seguente ciclo di temperature: 94°C per 5 minuti; 25 cicli 94°C per 30 secondi - “annealing” per 1 minuto a 52°C - 72°C per 1 minuto; estensione finale a 72°C per 5 minuti.

Estrazione del DNA plasmidico: le colonie di batteri propagate in LB liquido sono state centrifugate, per ottenere la precipitazione del pellet che, una volta raccolto in tubi da 1,5 ml, è stato sottoposto ad estrazione del DNA plasmidico mediante NucleoSpin® PLasmid Mini Kit. Il protocollo prevede diverse fasi:

1. Centrifugare il pellet per 30 secondi ad 11.000 x g e rimuovere il surnatante.
2. Aggiungere 250 µl di buffer A1 e risospendere le cellule agitando.
3. Aggiungere 250 µl di buffer A2 e miscelare con delicatezza capovolgendo il tubo per 6-8 volte ed incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
4. Aggiungere 300 µl di buffer A3 e miscelare con delicatezza capovolgendo il tubo per 6-8 volte.
5. Centrifugare per 10 minuti ad 11.000 x g.
6. Trasferire il surnatante in un tubo da 2 ml con colonnina NucleoSpin® PLasmid e centrifugare per 1 minuto ad 11.000 x g.
7. Aggiungere 500 µl di buffer AW riscaldato a 50°C e centrifugare per 1 minuto ad 11.000 x g ed eliminare l'eluato.
8. Aggiungere 600 µl di buffer A4 e centrifugare per 1 minuto ad 11.000 x g, successivamente eliminare l'eluato.
9. Asciugare la colonnina NucleoSpin® PLasmid centrifugando per 2 minuti ad 11.000 x g.
10. Trasferire la colonnina NucleoSpin® PLasmid su un nuovo tubo da 2 ml ed aggiungere 50 µl di buffer AE, incubare a temperatura ambiente per 1 minuto e successivamente centrifugare per 1 minuto ad 11.000 x g.

Il DNA ottenuto è stato separato e quantizzato mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,8% in TAE secondo le procedure descritte al punto 2.3.

Buffer Utilizzati

SOC Medium

Tryptone; estratto di lievito; NaCl; KCl; glucosio; MgCl₂; MgSO₄; acqua sterile.

Substrato LB (Luna Bertani): 10 gr di triptone; 5 gr di estratto di lievito; 10 gr di NaCl; acqua bidistillata fino a 1000 ml. Il pH è stato portato a 7,0 per ottenere il substrato solido sono stati aggiunti 15 gr di agar prima di portare a volume

Sequenziamento dei frammenti di DNA: per le reazioni di sequenza è stato utilizzato il BigDYE[®] Terminator Cycle Sequencing Kit basato sul metodo di Sanger (metodo dei dideossinucleotidi). La quantità di DNA clonato occorrente è stata calcolata in base alla sua grandezza in bp sapendo che per sequenziare un frammento di 1.000 bp occorrono 25 ng di DNA (tabella 6).

L'amplificazione è stata effettuata utilizzando il seguente ciclo PCR: 96°C per 1 minuto; 25 cicli 96°C per 10 secondi - "annealing" per 5 secondi a 50°C - 60°C per 4 minuti;

Tabella 6: Reazione di sequenza dei frammenti di DNA clonati.

Sostanza/Reagente	Volume (µl)
RR 100 (50 ng/ µl)	2
Primer Bst o Mse	1,6
Acqua distillate sterile	da 0 a 5,4
DNA	da 1 a 6,4

La purificazione del prodotto è stata effettuata utilizzando un protocollo basato sulla precipitazione con etanolo e sodio acetato che è consigliata quando si vuole ottenere un buon segnale già dalla prima base o quando i terminatori non incorporati sono presenti ad elevata concentrazione.

Al prodotto dell'amplificazione è stato quindi aggiunto 1/10 del volume di sodio acetato 3 M, 2 volumi e mezzo d'etanolo assoluto freddo ed il tutto è stato incubato in ghiaccio per 30 minuti. Successivamente, è stata effettuata una centrifugazione a temperatura ambiente per 30 minuti a 11.000 x g. Eliminato il surnatante, al precipitato sono stati aggiunti 125 µl di etanolo al 70% a -20°C. Successivamente, dopo una centrifuga a 11.000 x g per 20-30 minuti a temperatura ambiente, è stato eliminato il surnatante. Al precipitato sono stati aggiunti nuovamente 125 µl di etanolo al 70% -20°C. Dopo una nuova centrifuga a 11.000 x g per 20-30 minuti a temperatura ambiente è stato eliminato il surnatante. Il precipitato, quindi è stato asciugato a temperatura ambiente per 20 minuti e risospeso in 20 µl di formammide.

I prodotti della reazione di sequenziamento sono stati caricati sul capillare di un sequenziatore ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER o ABI PRISM 3100 GENETIC ANALYZER.

analisi bioinformatiche: i frammenti ottenuti dal clonaggio e dalla reazione di sequenziamento, sono stati sottoposti ad analisi bioinformatica al fine di determinarne l'annotazione funzionale tramite analisi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nei seguenti database:

CAB UNINA: <http://biosrv.cab.unina.it/>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

2.7 Analisi ISSR

Tredici primer ISSR (tabella 7) sono stati utilizzati per valutare la variabilità genetica delle varietà locali di finocchio di Sarno (Precoce, Medio Precoce, Tardivo) e delle varietà commerciali (Zafiro, Helvia, Giulio, Selma, Chiarino). La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume di 25 µl contenente: DNA (25-30 ng), dNTP (200 µM ciascuno), buffer 1X, MgCl₂ (3µM), Taq polimerasi (1U), primer (1,2 µM) e acqua fino a volume finale (25 µl). I campioni sono stati amplificati secondo il seguente ciclo di temperature: 94°C per 3 minuti; 30 cicli 94°C per 1 minuto - “annealing” per 30 secondi - 72°C per 2 minuti; estensione finale a 72°C per 6 minuti. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel al 2% di agarosio in tampone TAE 1X e visualizzati con colorazione di bromuro di etidio; la grandezza delle bande ottenute è stata stimata utilizzando come riferimento un marcatore di peso molecolare noto (1 Kb DNA ladder).

Tabella 7: elenco dei primers ISSR utilizzati, relative sequenze, temperature di annealing.

Codice primer	sequenza	T annealing °C
<i>ISSR 1</i>	HVH(TG)7T	54
<i>ISSR 2</i>	HVH(TCC)5	54
<i>ISSR 4</i>	BDB(CA)7T	54
<i>ISSR 5</i>	BDB(TCC)5	54
<i>ISSR 6</i>	(GA)8YG	54
<i>ISSR 10</i>	(AG)8YG	54
<i>ISSR 16</i>	(AC)8	54
<i>ISSR 17</i>	(CAC)5	54
<i>ISSR 1425</i>	BDV(CAG)5	55
<i>ISSR 2102</i>	HVH(CTT)5	54
<i>ISSR 2105</i>	BDB(GAC)5	55
<i>ISSR MC1</i>	VHV(GT)7G	55
<i>ISSR MC2</i>	DHB(GCA)5	55

2.8 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state effettuate sui dati qualitativi e quantitativi relativi alla caratterizzazione fenotipica effettuata (UPOV) utilizzando il programma SPSS 11.0 per Windows. In particolare, i risultati ottenuti sono stati sottoposti al test di Duncan, all'analisi della varianza (ANOVA), alla PCA (Principal Component Analysis) e l'Analisi delle Multicorrispondenze. I dati ottenuti dalla lettura dei pattern elettroforetici ISSR sono stati immessi in una matrice binaria che riporta per i diversi campioni, l'assenza (0) e la presenza (1) di bande. Per la valutazione della distanza genetica è stato utilizzato il coefficiente di "simple matching" $SM_{ij}=(a+b)/(a+b+c+d)$ in cui: SM è la similarità tra due individui i e j ; a è il numero di bande presente in entrambi gli individui; b indica il numero di bande presenti in i ed assenti in j ; c indica il numero di bande presenti in j ed assenti in i e d indica il numero di bande assenti in entrambi i campioni (Sneath e Sakal, 1973). La matrice di similarità è stata analizzata attraverso il metodo UGMPA mediante il software NTSYS-PC (Rolf, 1989).

3 Risultati

3.1 Analisi fenotipiche

Il materiale in esame è stato valutato per caratteri morfologici (dimensioni del grumolo, colore del grumolo, presenza di striature, numero di brattee, portamento fogliare) e fisiologici (ciclo vegetativo) e quindi utilizzato in un programma di reincrocio con l'obiettivo di ottenere linee isogenetiche (maschiosterili/maschiofertili) diverse per precocità e per epoca d'impianto. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti nel triennio 2006-2008.

Risultati relativi al 2006

I risultati relativi alla valutazione fenotipica degli ecotipi Precoce, Medio Precoce e Tardivo di Sarno e delle linee inbred CMS, (MsR₃ x Napoli), (MsR₁ x Tarquinia) e (MsR₂ x Chiarino) sono riportati nei grafici 1-5. La lunghezza media delle foglie (grafico 1) è oscillata da un massimo di 53,6 cm nell'ecotipo Tardivo ad minimo di 38 cm nella linea (MsR₂ x Chiarino);

L'altezza media del grumolo (grafico 2) è variata da valori massimi di 11,6 cm nell'ecotipo Tardivo a valori minimi di 7,9 cm nella linea (MsR₁ x Tarquinia);

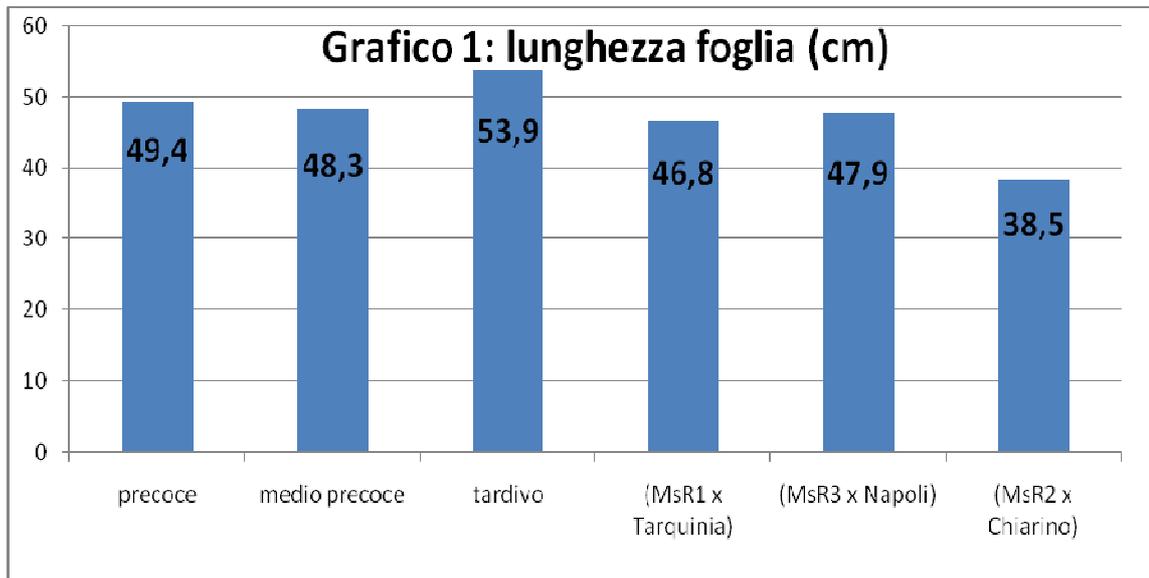
La larghezza media del grumolo (grafico 3) ha registrato valori massimi di 12,1 cm e minimi di 6,3 cm rispettivamente negli ecotipi Medio Precoce e Tardivo.

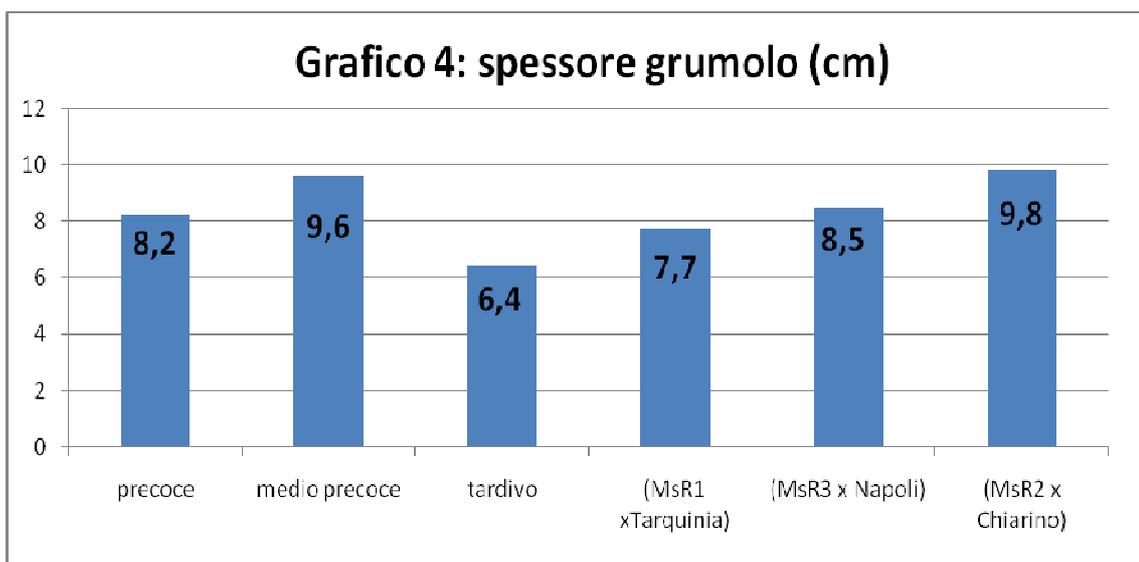
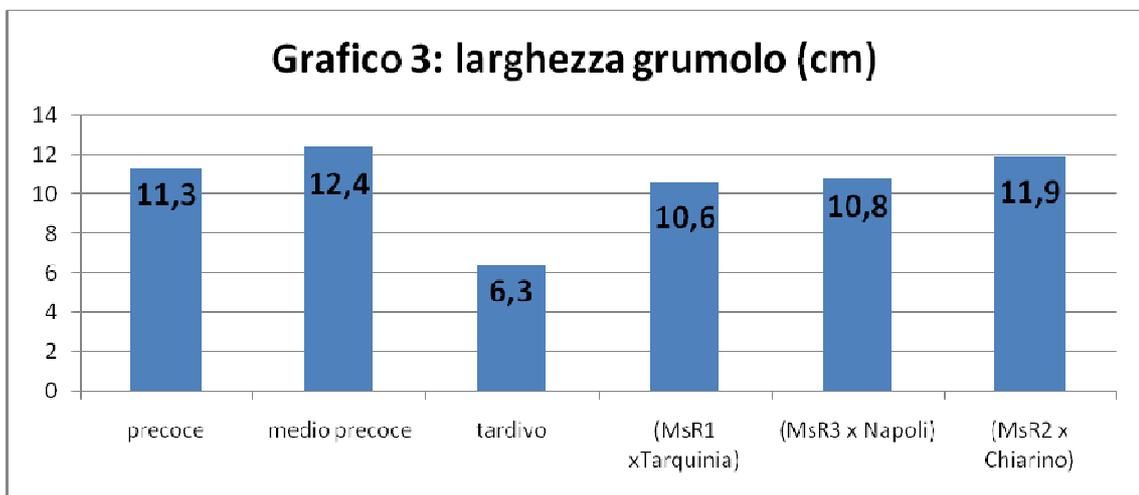
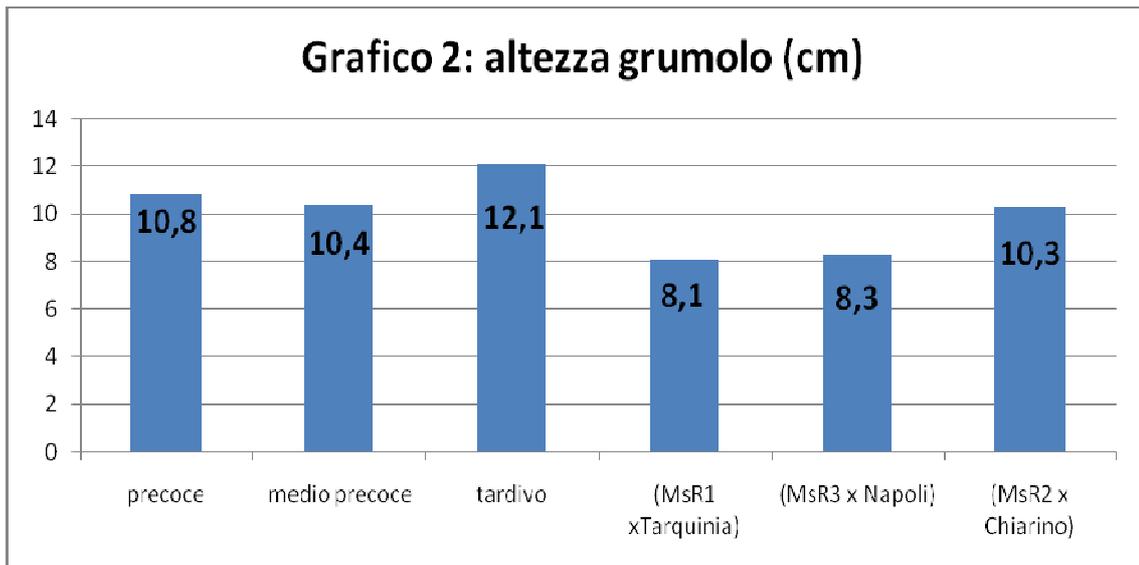
Lo spessore medio del grumolo (grafico 4), invece, è variato da 9,8 cm nell'ecotipo Medio Precoce a 6,2 cm nell'ecotipo Tardivo.

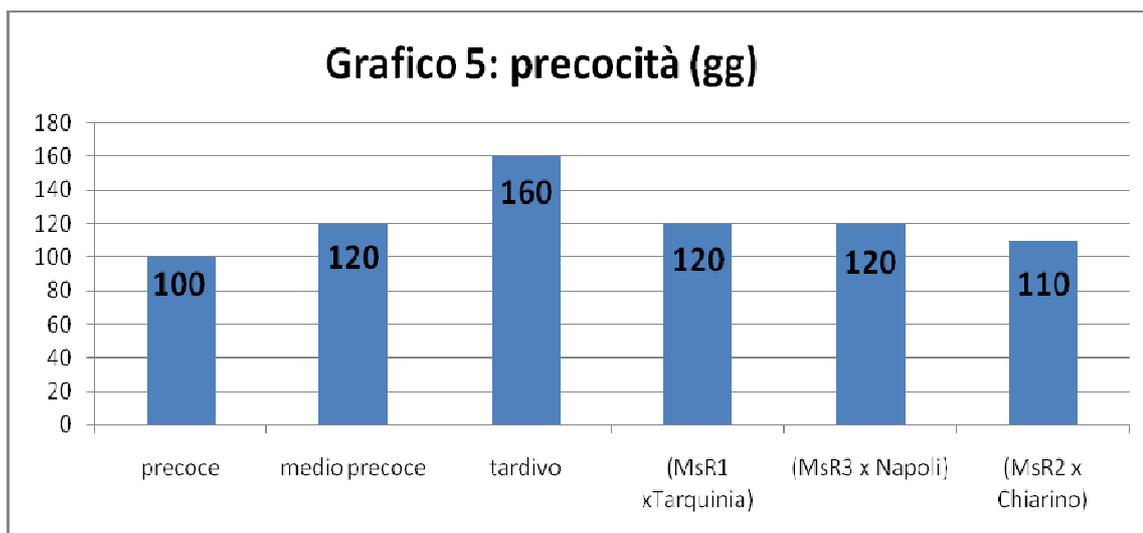
La precocità infine (grafico 5) è oscillata dai 100 giorni dell'ecotipo Precoce ai 160 giorni dell'ecotipo Tardivo. In particolare per questo parametro gli ecotipi hanno mostrato dei valori in linea con le indicazioni aziendali.

Nella tabella 8 sono riportati i risultati delle analisi fenotipiche per i caratteri qualitativi. Ad eccezione dell'ecotipo Tardivo (con un portamento fogliare eretto e un grumolo di colore verde scuro) tutti i genotipi analizzati hanno mostrato un portamento fogliare semieretto e un grumolo di colore bianco medio. Tutti i genotipi delle linee inbred sono risultati maschiosterili; in particolare, ciascun genotipo ha mostrato, in fase di fioritura, antere dapprima imbrunite e poi degenerate.

Nell'ambito delle linee inbred e degli ecotipi valutati sono stati selezionati rispettivamente quattro genotipi maschiosterili e quattro fertili. Essi sono stati utilizzati successivamente in incroci controllati secondo lo schema riportato in tabella 9 in cui è indicato anche il quantitativo di seme prodotto per ogni combinazione ibrida. Sono stati prodotti circa 400 semi in totale.







Grafici 1-5: risultati relativi alla valutazione fenotipica delle linee inbred e degli ecotipi utilizzati nell'anno 2006 nel programma di reincrocio.

Tabella 8: risultati dell'analisi fenotipica sul materiale oggetto di studio; valori medi di 5 piante per ecotipo e linea inbred.

linee	parametri					
	portamento fogliame	densità fogliame	intensità colore	formazioni e grumolo	colore grumolo	intensità colore
4	semieretto	medio	medio	presente	bianco	medio
6	semieretto	medio	chiaro	presente	bianco	medio
8	eretto	medio	medio	assente	verdastro	scuro
9	semieretto	medio	medio	presente	bianco	medio
15	semieretto	medio	medio	presente	bianco	medio

Tabella 9. Tipologia di incroci F₁ effettuati e numero totale di semi prodotto 2006

Parentale ♀	parentale ♂			Totale semi
	Precoce	Medio Precoce	Tardivo	
(MsR ₂ x Chiarino)	-	-	85	
(MsR ₃ x Napoli)	70	120	-	
(MsR ₁ x Tarquinia)	90	40	-	
				405

Risultati relativi al 2007

I risultati relativi alla valutazione fenotipica dei dati quantitativi degli ibridi Precocissimo F₁, Precoce F₁, Medio Precoce F₁ e Tardivo F₁ (figura 3a-3b) sono riportati nei grafici 6-10. La lunghezza media delle foglie (grafico 6) è variata da 46 cm nell'ibrido Precocissimo F₁ a 56 cm nell'ibrido Tardivo F₁. I dati riportati hanno evidenziato come si è espresso per questo parametro il fenomeno del lussureggiamento nella condizione ibrida rispetto ai parentali di partenza [ad esempio, per l'ibrido Tardivo F₁ i parentali, ecotipo Tardivo e linea (MsR₂ x Chiarino), hanno mostrato dei valori di lunghezza delle foglie di 53,9 cm e 38,5 cm rispettivamente].

L'altezza del grumolo (grafico 7) è oscillata da valori 8,9 cm nell'ibrido Precocissimo F₁ a valori di 13,2 cm nell'ibrido Tardivo F₁.

La larghezza del grumolo (grafico 8) ha registrato il suo valore massimo di 12,4 cm nell'ibrido Medio Precoce F₁ e il suo valore minimo nell'ibrido Tardivo F₁.

Ugualmente lo spessore del grumolo (grafico 9) ha registrato il valore massimo nell'ibrido Medio Precoce F₁ con 10,2 cm e il valore minimo nell'ibrido Tardivo F₁ con 6,8 cm. La precocità (grafico 10) ha mostrato valori estremi di 85 giorni nell'ibrido Precocissimo F₁ e di 145 giorni nell'ibrido Tardivo F₁. È proprio la valutazione di quest'ultimo parametro che ha mostrato meglio la capacità dell'ibridazione sessuale di dar vita a nuova variabilità genetica con la creazione degli ibridi Precocissimo F₁, finocchio bianco, a sezione circolare, con portamento fogliare semieretto, numero di guaine pari a 6 [i cui parentali, (MsR₃ x Napoli) e Precoce, hanno evidenziato una precocità, rispettivamente, di 120 e 100 giorni] e Tardivo F₁ [i cui parentali, (MsR₂ x Chiarino) e Tardivo, hanno mostrato una precocità, rispettivamente, di 120 e 160 giorni]. Tale variabilità da subito è stata inserita nel programma di breeding per l'ottenimento delle linee isogenetiche.

Nella tabella 10 sono riportati i risultati delle analisi fenotipiche per i caratteri qualitativi: l'ibrido Tardivo F₁ ha mostrato un portamento fogliare eretto ed un grumolo di colore verde scuro mentre tutti gli altri ibridi hanno fatto registrare un portamento fogliare semieretto ed un colore del grumolo bianco medio. Tutti gli ibridi valutati hanno mostrato antere dapprima imbrunite e poi degenerate e pertanto sono stati selezionati come maschiosterili.

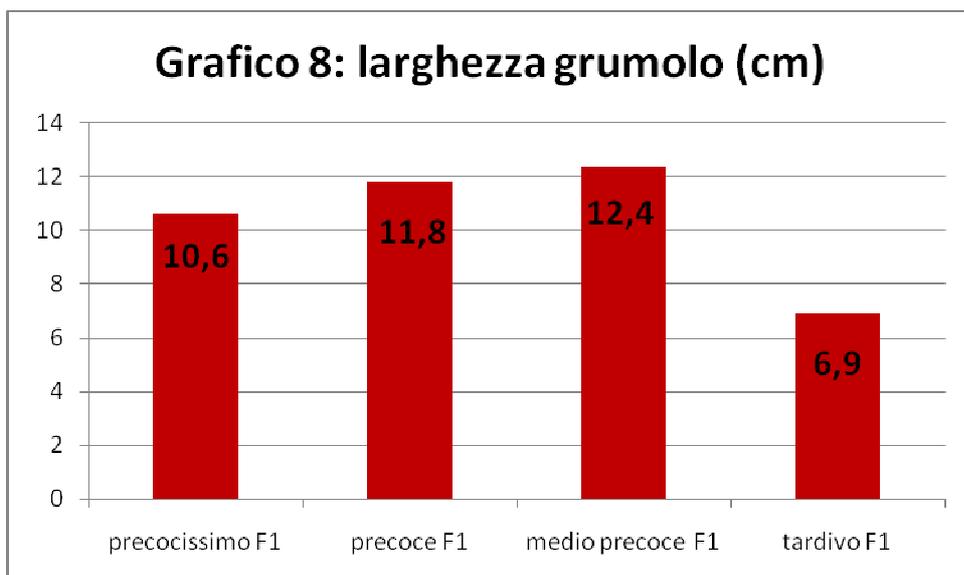
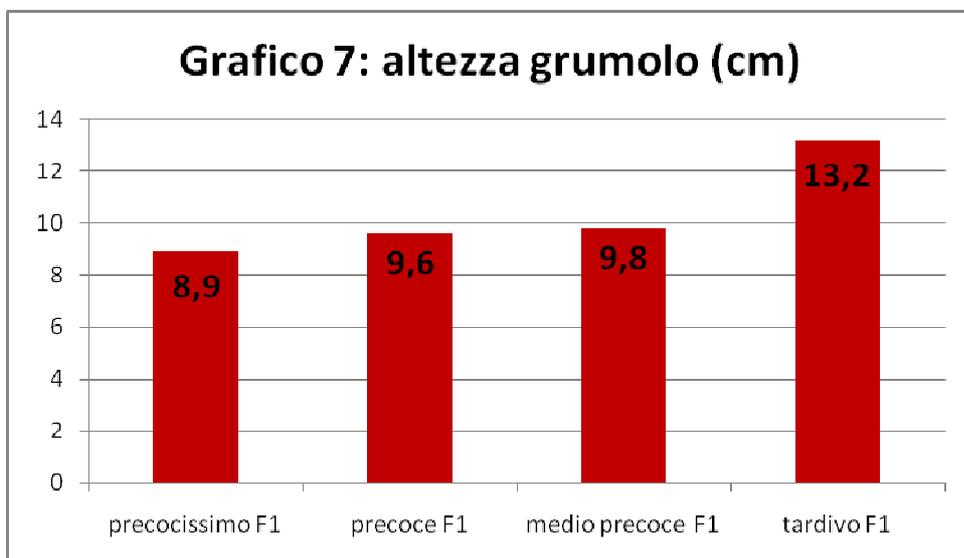
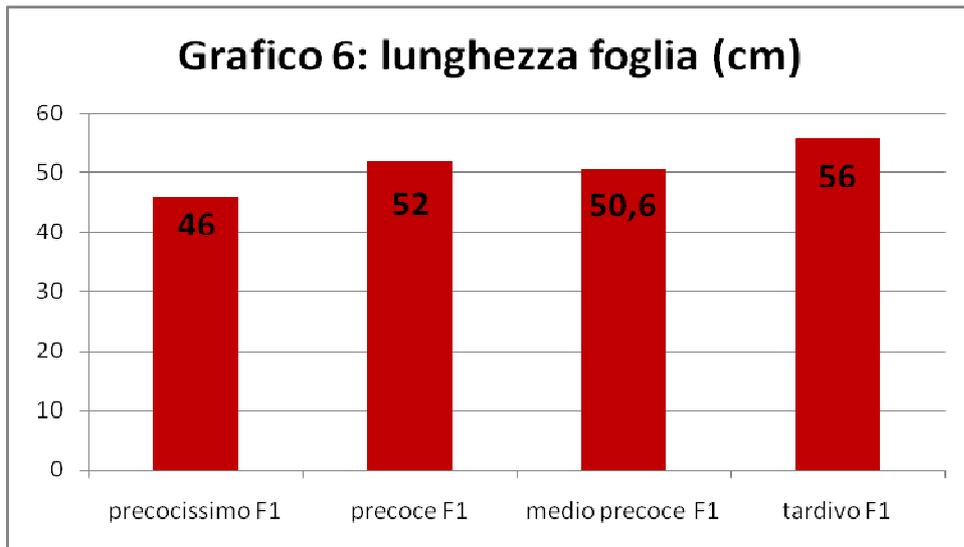
Nell'ambito delle linee ibride ottenute quattro genotipi sono stati selezionati ed utilizzati in incroci controllati con i rispettivi mantenitori fertili secondo lo schema riportato in tabella 11 in cui è indicato anche il quantitativo di seme prodotto per ogni combinazione ibrida. Sono stati prodotti circa 400 semi in totale.

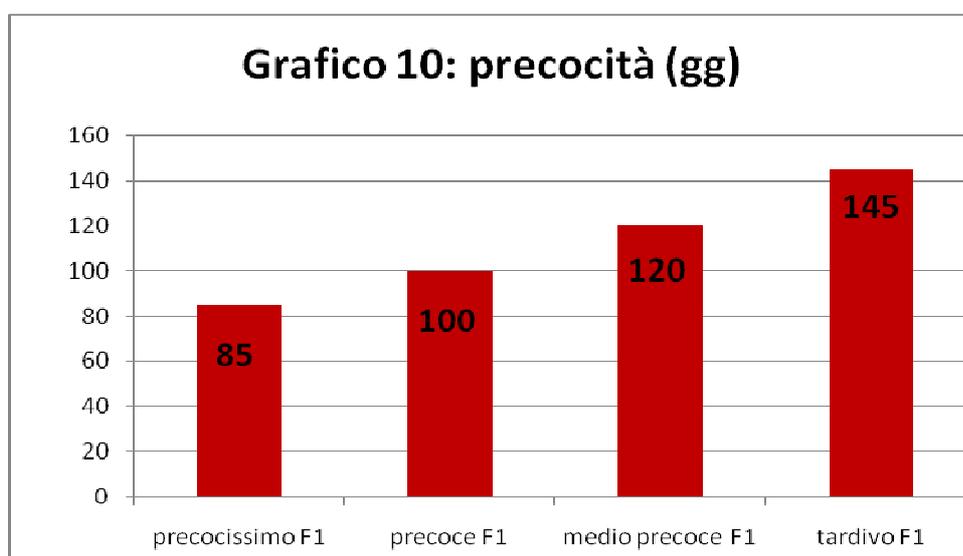
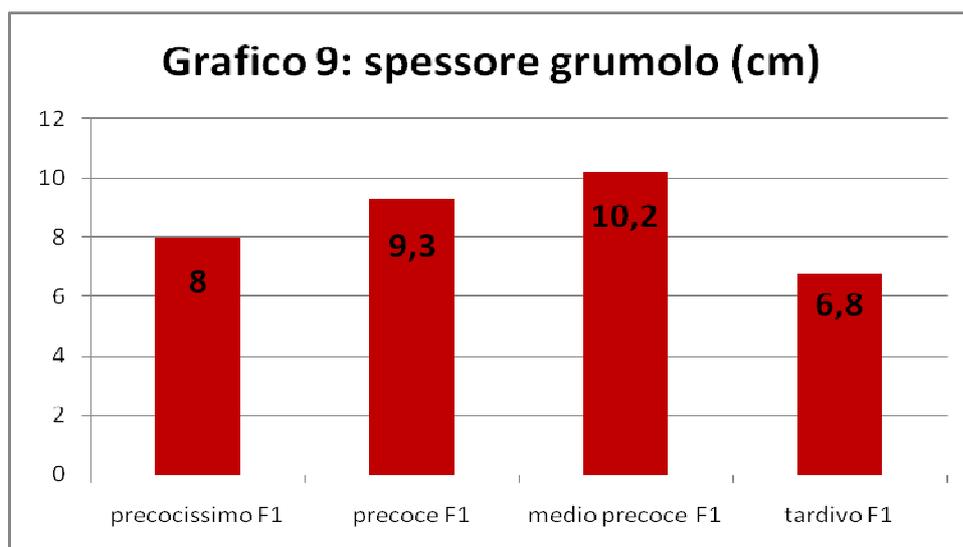


**Figura 3a: Medio Precoce F₁
ibrido [(MsR₁ x Tarquinia) x Medio Precoce]**



**Figura 3b: Precocissimo F₁
ibrido [(MsR₃ x Napoli) x Precoce]**





Grafici 6-10: risultati relativi alla valutazione fenotipica degli ibridi F₁ utilizzati nell'anno 2007 nel programma di reincrocio.

Tabella 10: risultati dell'analisi fenotipica sul materiale oggetto di studio; valori medi di 5 piante per ibrido F₁.

linee	parametri					
	portamento fogliame	densità fogliame	intensità colore	formazione grumolo	colore grumolo	intensità colore
1	semieretto	medio	chiaro	presente	bianco	medio
3	semieretto	medio	chiaro	presente	bianco	medio
5	semieretto	medio	medio	presente	bianco	medio
7	eretto	medio	medio	assente	bianco	scuro

Tabella 11: tipologia di reincroci effettuati e numero totale di semi prodotto 2007

parentale ♀	parentale ♂			Totale semi
	Precocissimo	Precoce	Medio Precoce	
F1[(MsR3 x Napoli) x Precoce]	-	70	-	
F1[(MsR3 x Napoli) x Precoce]	65	-	-	
F1[(MsR3 x Napoli) x Medio Precoce]	-	-	80	
F1[(MsR1 x Tarquinia) x Precoce]	-	70	-	
F1[(MsR1 x Tarquinia) x Medio Precoce]	-	-	95	
				380

Risultati relativi al 2008

In quest'ultimo anno di lavoro sono stati valutati, nuovamente, gli ecotipi aziendali per effettuare successivamente un'analisi statistica dei dati fenotipici di tutto il materiale vegetale. I risultati relativi alla valutazione fenotipica dei dati quantitativi delle BC₁ ottenute, delle varietà commerciali e degli ecotipi aziendali sono riportati nei grafici 11-15. Per le linee 15 (MsR₂ x Chiarino) e 16 (Zafiro) non è stato possibile eseguire i rilievi fenotipici previsti a causa dell'insorgere di problemi fitopatologici (*Sclerotinia spp*, *Rhizoctonia solani*) nella fase fenologica di ingrossamento del grumolo.

La lunghezza delle foglie (grafico 11) è oscillata da valori medi di 38 cm nella varietà commerciale Giulio a valori medi di 59,4 cm nella linea Tardivo F₁; l'altezza del grumolo (grafico 12) è variata da un minimo di 7,9 cm nella linea (MsR₁ x Tarquinia) ad un massimo di 13,3 cm nella linea Tardivo F₁; la larghezza del grumolo (grafico 13)

ha mostrato valori medi che vanno dai 6,3 cm nell'ecotipo Tardivo ai 12,7 cm nell'ecotipo Precoce; lo spessore del grumolo, invece, è variato da un minimo di 6,2 cm nell'ecotipo Tardivo ad un massimo di 10,3 nella varietà commerciale Chiarino (grafico 14). La precocità infine (grafico 15) ha mostrato una forbice che oscilla da valori di 80 giorni nella varietà commerciale Chiarino e nella linea di breeding Precocissimo BC₁ a valori di 160 giorni nell'ecotipo Tardivo passando per i 100 giorni dell'ecotipo Precoce e delle varietà commerciali Helvia e Selma.

In tabella 12 sono riportati i risultati delle analisi fenotipiche relative ai caratteri qualitativi: i rilievi effettuati hanno confermato quanto già osservato nei due anni precedenti con la quasi totalità dei genotipi caratterizzati da un portamento fogliare semieretto (unica eccezione rispetto ai già menzionati Tardivo e Tardivo F₁ la varietà Selma) e da un grumolo di colore bianco che nelle varietà commerciali (Giulio, Helvia, Chiarino e Selma) è risultato essere di un colore bianco chiaro. Tutti le BC₁ ottenute hanno mostrato antere dapprima imbrunite e poi degenerate e pertanto sono state selezionate come maschiosterili. Nell'ambito delle linee ibride ottenute quattro genotipi sono stati selezionati ed utilizzati in incroci controllati secondo lo schema riportato in tabella 13 in cui è indicato anche il quantitativo di seme prodotto per ogni combinazione ibrida. Sono stati prodotti circa 1000 semi in totale. Le BC₂ così ottenute sono state seminate nella prima decade di luglio 2008 e trapiantate nella prima decade di ottobre. La selezione fenotipica delle stesse avverrà a febbraio-marzo 2009.

Grafico 11: lunghezza foglia (cm)

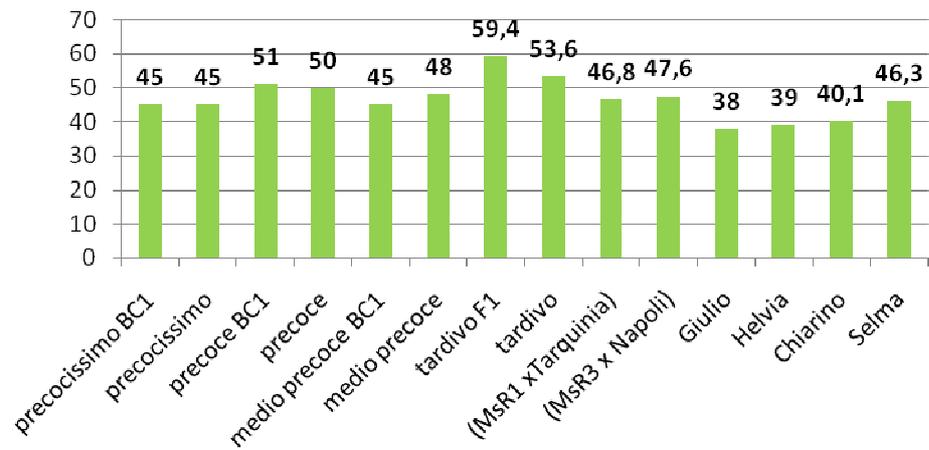


Grafico 12: altezza grumolo (cm)

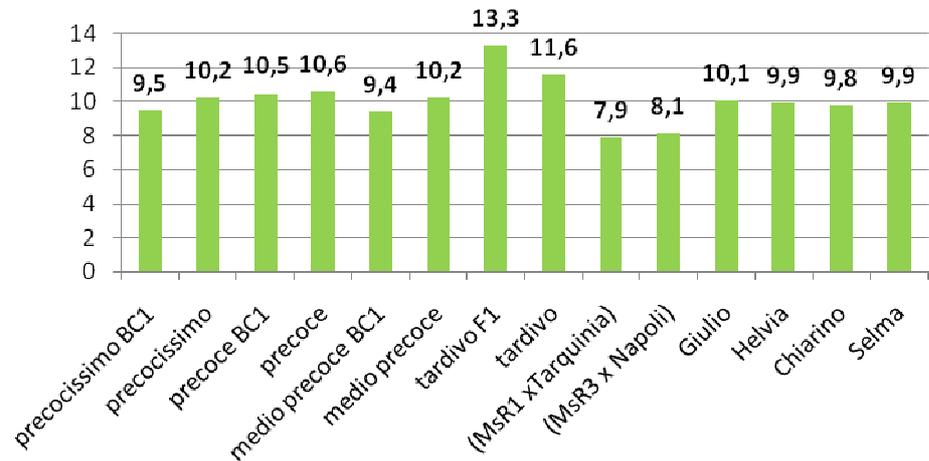
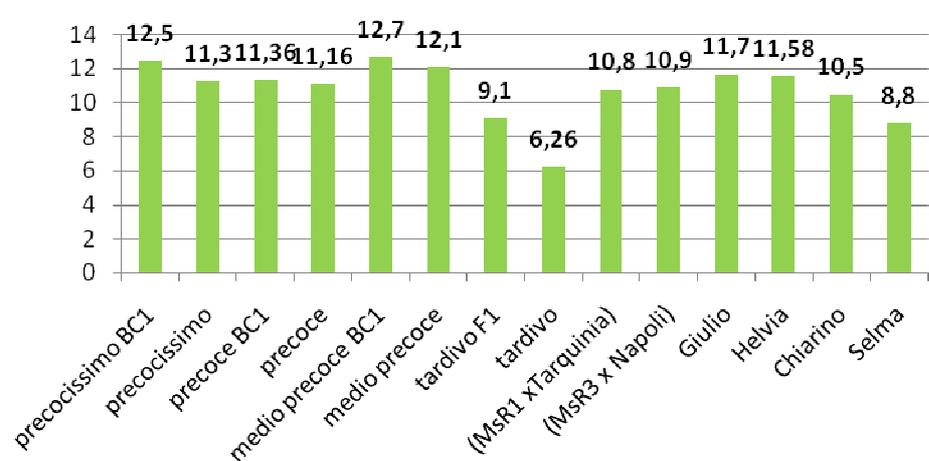
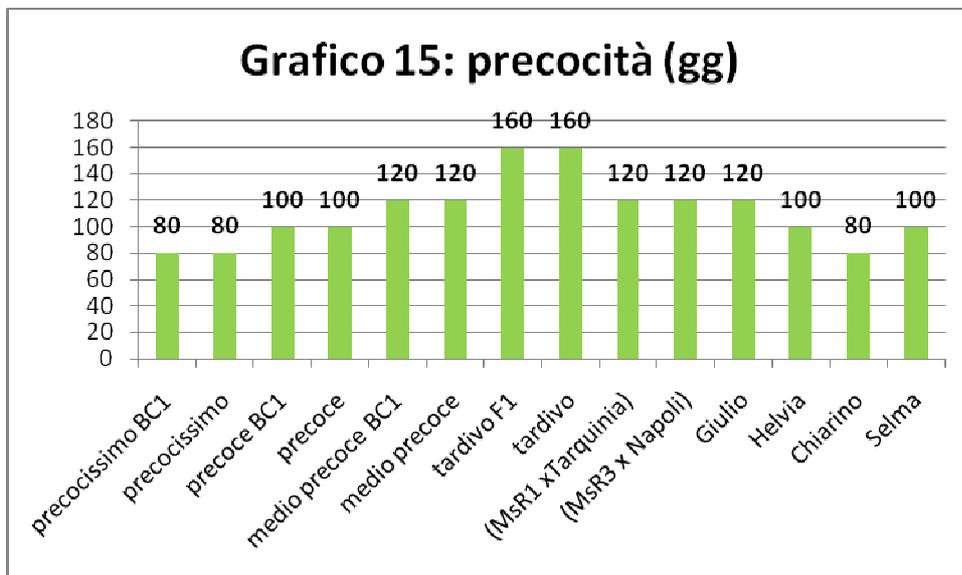
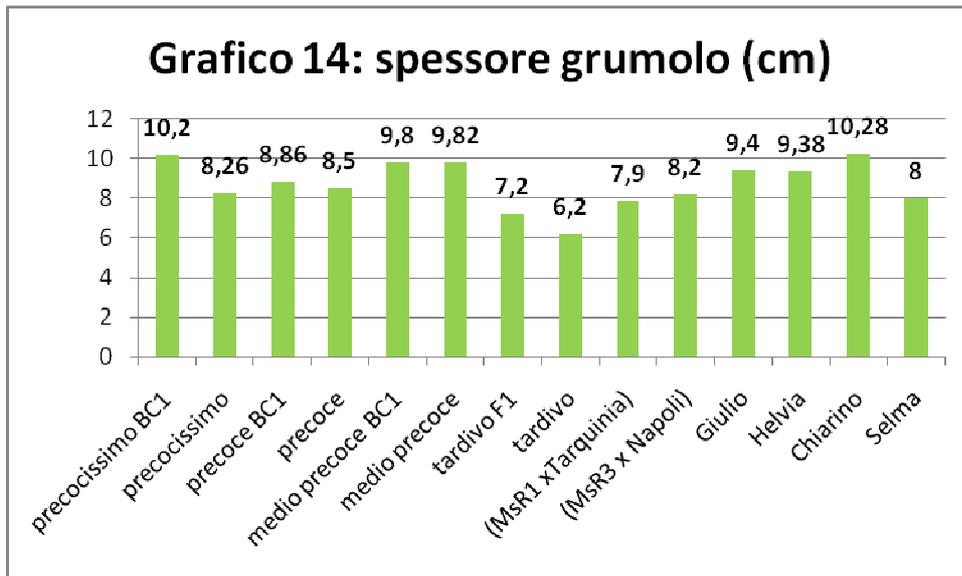


Grafico 13: larghezza grumolo (cm)





Grafici 11-15: risultati relativi alla valutazione fenotipica delle BC₁, degli ecotipi e delle varietà commerciali nell'anno 2008 per il programma di reincrocio.

Tabella 12: risultati dell'analisi fenotipica sul materiale oggetto di studio; valori medi di 5 piante per linea, ecotipo e varietà.

linee	parametri					
	portament o fogliame	densità fogliame	intensità colore	formazione grumolo	colore grumolo	intensità colore
1	semieretto	medio	medio	presente	bianco	chiaro
2	semieretto	medio	medio	presente	bianco	chiaro
3	semieretto	medio	medio	presente	bianco	medio
4	semieretto	medio	medio	presente	bianco	medio
5	semieretto	denso	medio	presente	bianco	medio
6	semieretto	medio	chiaro	presente	bianco	medio
7	eretto	medio	scuro	accennata	verdastro	scuro
8	eretto	medio	medio	assente	verdastro	scuro
9	semieretto	medio	medio	presente	bianco	medio
10	semieretto	medio	medio	presente	bianco	medio
11	semieretto	medio	medio	presente	bianco	chiaro
12	semieretto	medio	scuro	presente	bianco	chiaro
13	semieretto	medio	scuro	presente	bianco	chiaro
14	eretto	lasco	medio	presente	bianco	chiaro

Tabella 13: tipologia di reincroci effettuati e numero totale di semi prodotto 2008

parentale ♀	parentale ♂			Totale semi
	Precocissimo	Precoce	Medio Precoce	
Precocissimo BC ₁	140	-	-	
Precoce BC ₁	-	250	-	
Medio precoce BC ₁	-	-	200	
Precoce BC ₁	-	180	-	
Medio Precoce BC ₁	-	-	220	
				970

3.2 Analisi del genoma totale mediante AFLP

L'analisi del genoma delle linee di finocchio oggetto di studio mediante la procedura AFLP ha mirato all'individuazione di marcatori polimorfici tra le linee sterili e quelle fertili. Come atteso i marcatori AFLP hanno prodotto profili elettroforetici piuttosto complessi, in cui un elevato polimorfismo tra le linee esaminate è stato rivelato. Tuttavia l'oggetto della nostra indagine ha mirato all'identificazione di marcatori per la CMS. In tal senso i profili elettroforetici sono stati analizzati con l'unico obiettivo di individuare bande presenti nelle linee maschiosterili ma non nelle linee maschiofertili o viceversa. Delle diciassette combinazioni di primer utilizzati solo la combinazione E-AGG/M-CTA ha permesso di individuare due marcatori AFLP, rispettivamente di 180 bp e 200 bp (figura 5), presenti in tutte le linee sterili e nei relativi ibridi F₁ e per contro assenti in tutti i parentali fertili.

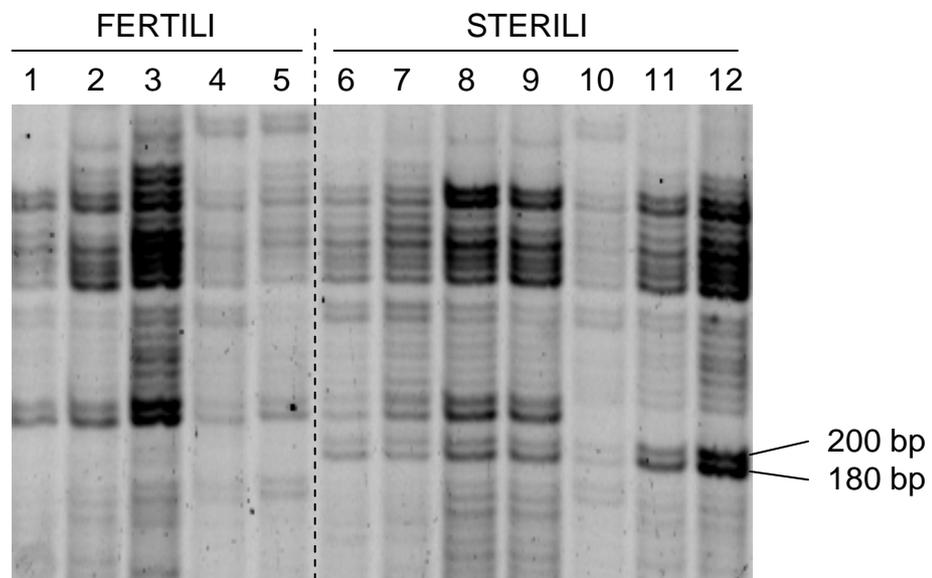


Figura 4: profilo AFLP dei genotipi Precoce (1-2) Medio Precoce (3-4-5), MsR₂ x Tarquinia (6-7), MsR₃ x Napoli (8-9) e relativi ibridi (10-11-12), ottenuti tramite combinazione E-AGG/M-CTA.

3.3 Analisi del genoma citoplasmatico

Dei quattro primer mitocondriali valutati solamente il primer Nms2 ha prodotto amplificato (figura 6). In tutti i campioni analizzati è stato osservato il frammento delle dimensioni attese di 2100 bp.

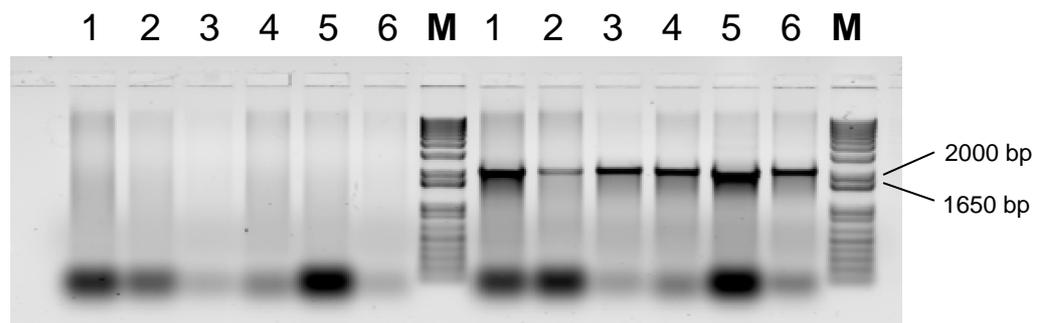


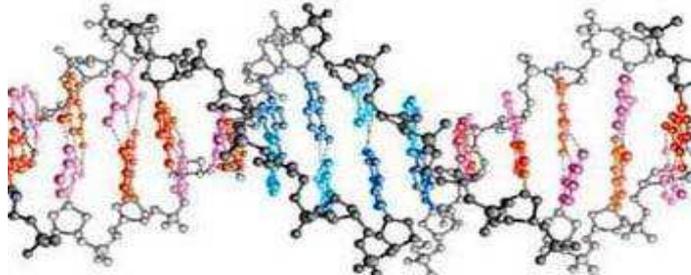
Figura 5: profilo dei primer *ALm4-5* (*sinistra*), *Nms2* (*destra*) sui genotipi: Tardivo (1), Precoce (2), Medio Precoce (3), MsR₃ x Napoli (4), MsR₂ x Tarquinia (5), [(MsR₃ x Napoli) x Precoce Sarno] (6), M = marker 1 kb plus.

3.4 Isolamento, clonaggio ed analisi bioinformatiche del DNA

Sequenziamento dei frammenti di DNA: le sequenze ottenute tramite reazione di sequenziamento (figura 6 in appendice), denominate sequenza 1 (200 bp) e sequenza 2 (180 bp) (figura 7) sono state sottoposte ad analisi bioinformatica, al fine di determinarne l'annotazione funzionale, tramite analisi BLAST nel database NCBI (figura 8).

Sequenza 1

```
TTATGCAAGCCGGGGTATTACAATGGGTGCAGCATGGGAAGATCCC  
TGTTGGGGTGCCTGTGTTTGTGCTTCCACAGGCTCAGGAACCATTG  
CTGAGCTAGAAAATTATGAAGCCCTCATGTCTGGCATAGGGTAAGGG  
TAAGT
```



Sequenza 2

```
TGGGTCCGGTAGCAGCAGCAGCATCAACAGCAGCAGCAGCATGATA  
GGCAAGGAGGAAGGTCTGTATCTGGATTAGAGGAACTCATTATGGG  
ATGCACTTCATCTCATCATAATAACAAGTTAGTGTCCCACCTACTTT  
TTGAC
```

Figura 7: sequenza 1 e sequenza 2 ottenute tramite reazione di sequenziamento.

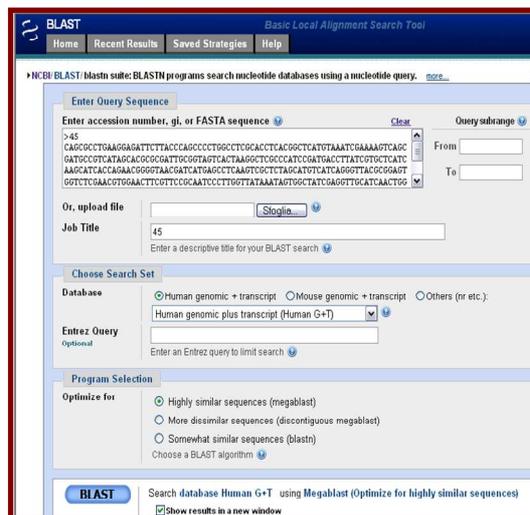


Figura 8: sito dell'NCBI utilizzato per l'annotazione manuale tramite BLAST.

L'allineamento in BLAST NCBI della sequenza 1 (200 bp) non ha mostrato identità di sequenza significative (93% di similarità con un clone di *Taeniopygia guttata* ma con un E value di 0,028) per contro l'allineamento della sequenza 2 (180 bp) ha mostrato

l'80% di similarità genetica con l'accessione AM461850.2, contig VV78X211388.5 isolato in *Vitis vinifera* (E value di $8e \times 10^{-16}$) e l' 83% di similarità genetica con l'accessione NM_119067.1 (E value di $2e \times 10^{-5}$) corrispondente al fattore di trascrizione ANAC075, isolato in *Arabidopsis thaliana*, e coinvolto in processi di sviluppo di organi fiorali e nel controllo ormonale della pianta (tabella 14).

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
AM461850.2	Vitis vinifera contig VV78X211388.5, whole genome shotgun sequence	91.5	91.5	63%	8e-16	80%
NM_119067.1	Arabidopsis thaliana ANAC075 (Arabidopsis NAC domain containing protein 75); transcription factor (ANAC075) mRNA, complete cds	57.2	57.2	35%	2e-05	83%
AL161574.2	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, contig fragment No. 70	57.2	57.2	35%	2e-05	83%
AC110177.19	Mus musculus chromosome 1, clone RP24-245K23, complete sequence	48.2	48.2	31%	0.009	81%
AC160762.4	Mus musculus BAC clone RP24-330E8 from chromosome 1, complete sequence	48.2	48.2	31%	0.009	81%
AY356889.1	HIV-1 isolate patient010 clone 5C from Belgium protease (pol) gene, partial cds	42.8	42.8	26%	0.37	85%
XM_001032226.1	Tetrahymena thermophila SB210 hypothetical protein (TTHERM_00655950) mRNA, complete cds	41.0	41.0	22%	1.3	88%
AL604023.12	Mouse DNA sequence from clone RP23-468D17 on chromosome 11, complete sequence	41.0	41.0	24%	1.3	84%
AL606962.22	Mouse DNA sequence from clone RP23-29H22 on chromosome 4 Contains a novel pseudogene, the Mycbp gene for c-myc binding protein, a novel gene, the Rragc gene for Ras-related GTP binding C and two CpG islands, complete sequence	41.0	41.0	20%	1.3	87%
AC017091.8	Homo sapiens BAC clone RP11-506N2 from 4, complete sequence	39.2	39.2	19%	4.5	90%
XM_650304.1	Entamoeba histolytica HM-1:IMSS bromodomain protein (30.t00008) partial mRNA	39.2	39.2	16%	4.5	92%
AC157756.1	Mus musculus 10 BAC RP24-377M12 (Roswell Park Cancer Institute (C57BL/6J Male) Mouse BAC Library) complete sequence	39.2	39.2	18%	4.5	89%

Tabella 14: alcuni allineamenti significativi dell'amplicone a 180 bp in BLAST NCBI.

3.5 Analisi ISSR

Sono stati valutati tredici primer ISSR (tabella 15, figura 9) sugli otto genotipi analizzati; essi hanno prodotto un totale di 186 bande di cui 65 monomorfe e 121 polimorfe. I primer ISSR 4 e ISSR 2102 hanno mostrato il 100% di polimorfismo, per contro i primer ISSR 17 e ISSR MC1 hanno mostrato rispettivamente il 70 % e il 44 % di monomorfismo (tabella 15).

Il numero di bande polimorfe (grafico 16) ottenute utilizzando i primer ISSR è stato estremamente variabile, oscillando da un minimo di 2 bande (ISSR 6 e ISSR2102) a un massimo di 23 bande (ISSR 1, ISSR10 e ISSR17). La percentuale di polimorfismo totale riscontrata è stata del 65,1 % (grafico 17). Utilizzando il software NTSYS-PC e il coefficiente di similarità genetica simple matching sono stati costruiti il dendrogramma e la matrice di similarità genetica (figura 10 e figura 11); il quadro informativo che ne deriva rivela che alcuni genotipi hanno mostrato un coefficiente di similarità > dell'80% (87% tra le varietà Chiarino e Selma, 85% tra l'ecotipo Precoce di Sarno e la varietà Zafiro) ed altri genotipi un coefficiente di similarità < 65% (63% tra le varietà Zafiro e Selma, 64% tra la varietà Selma e l'ecotipo Precoce di Sarno). L'ecotipo Medio Precoce ha mostrato, invece, una similarità genetica del 65% con la varietà Selma e del 64% con la varietà Chiarino; l'ecotipo Precoce, oltre che con le suddette varietà (rispettivamente 67% con Chiarino e 64% con Selma) mostra una similarità genetica del 67% anche con la varietà Giulio. L'ecotipo Tardivo, per contro, ha evidenziato una similarità genetica del 72% con le due varietà commerciali Helvia e Zafiro. In tabella 17 sono riportate le combinazioni ibride F₁ che saranno prodotte in virtù dei risultati sopra citati.

Tabella 15: elenco dei primers ISSR utilizzati, relative sequenze, temperature di annealing, n° bande totali e percentuale di polimorfismo riscontrato.

Codice primer	sequenza	n° bande totali	n° bande monomorfe	% polimorfismo
<i>ISSR 1</i>	HVH(TG)7T	23	13	43,47
<i>ISSR 2</i>	HVH(TCC)5	10	3	70
<i>ISSR 4</i>	BDB(CA)7T	7	0	100
<i>ISSR 5</i>	BDB(TCC)5	17	7	58,82
<i>ISSR 6</i>	(GA)8YG	2	1	50
<i>ISSR 10</i>	(AG)8YG	23	7	69,56
<i>ISSR 16</i>	(AC)8	20	4	80
<i>ISSR 17</i>	(CAC)5	23	16	30
<i>ISSR 1425</i>	BDV(CAG)5	11	4	63,63
<i>ISSR 2102</i>	HVH(CTT)5	2	0	100
<i>ISSR 2105</i>	BDB(GAC)5	11	1	90,9
<i>ISSR MC1</i>	VHV(GT)7G	16	7	56,25
<i>ISSR MC2</i>	DHB(GCA)5	21	2	90,47
totale		186	65	65,1

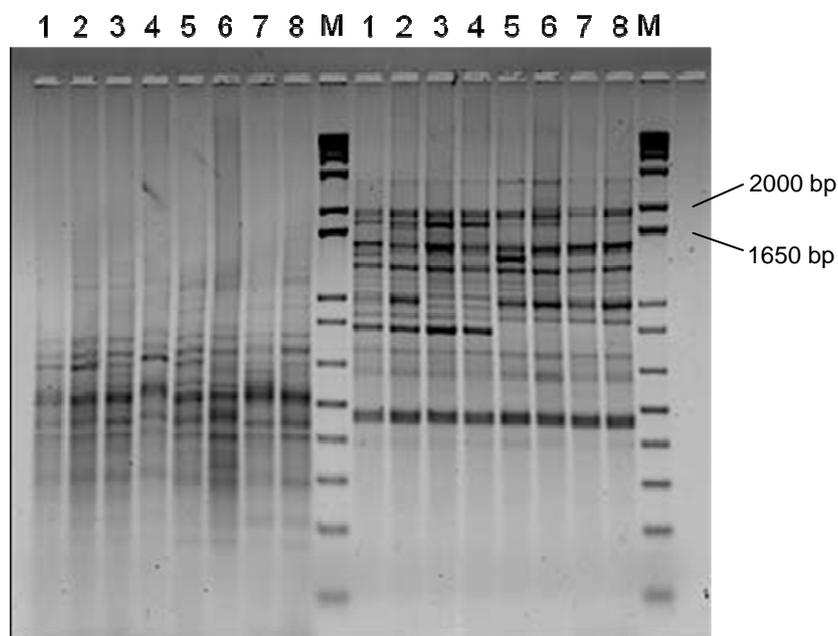


Figura 9: profilo dei primer *ISSR1*(sinistra)-*ISSR17*(destra) sui genotipi: Tardivo (1), Precoce (2), Medio Precoce (3), Zafiro (4), Helvia (5), Giulo (6), Selma (7), Chiarino (8), M = marker 1 kb plus.

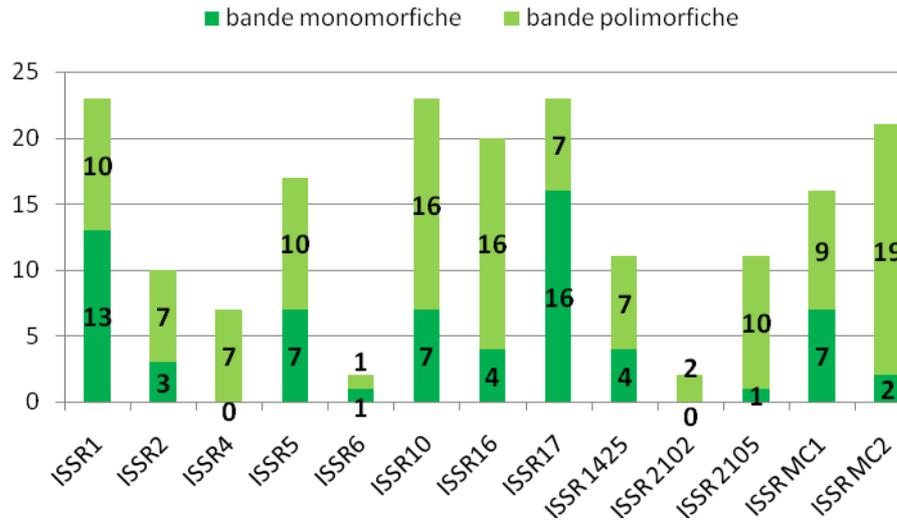


Grafico 16: numero di bande monomorfe e polimorfe prodotte dai primer ISSR utilizzati.

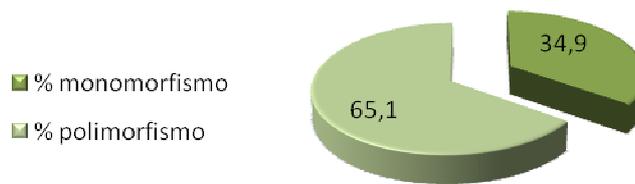


Grafico 17: percentuali di bande monomorfe e polimorfe prodotte dai primer ISSR utilizzati.

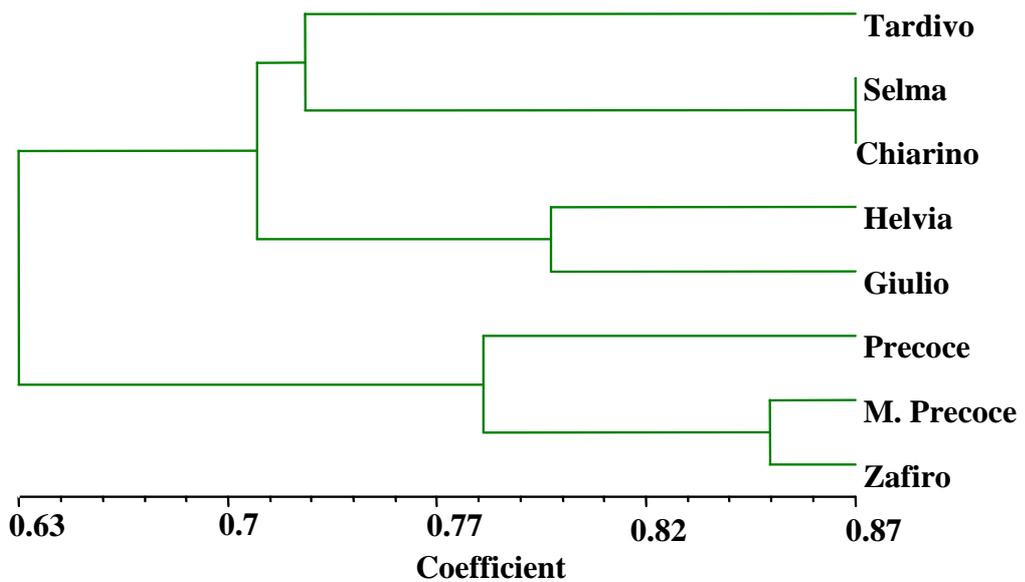


Figura 10: dendrogramma derivato da analisi cluster UPGMA

	8.3	6.3	4.2	16.1	12.1	11.4	14.3	13.1
8.3	1.00							
6.3	0.77	1.00						
4.2	0.74	0.80	1.00					
16.1	0.72	0.77	0.85	1.00				
12.1	0.72	0.72	0.70	0.68	1.00			
11.4	0.74	0.70	0.67	0.63	0.80	1.00		
14.3	0.74	0.65	0.64	0.63	0.71	0.73	1.00	
13.1	0.75	0.64	0.67	0.65	0.73	0.77	0.87	1.00

Figura 11: matrice di similarità dei genotipi: Tardivo (8.3), Precoce (4.2), Medio Precoce (6.3) Zafiro (16.1), Helvia (12.1), Giulio (11.4), Selma (14.3), Chiarino (13.1).

Tabella 17: combinazioni F₁ individuate in seguito alla genotipizzazione del materiale vegetale tramite marcatori ISSR.

Combinazioni F ₁	Giulio	Selma	Chiarino	Helvia	Zafiro
Precoce		X			
Medio Precoce		X	X		
Tardivo				X	X

3.6 Analisi statistiche

Con lo scopo di descrivere le differenze osservate tra gli ecotipi fertili, Precoce di Sarno, Medio Precoce di Sarno e Tardivo di Sarno, le varietà commerciali Chiarino, Selma, Giulio e Helvia e il materiale di breeding sono state realizzate due analisi statistiche: la PCA (Principal Componet Analisis) per i dati quantitativi e la MCA (Analisi delle MultiCorrispondenze) per i dati qualitativi. Sono state rilevate cinque osservazioni per due repliche in blocchi completamente randomizzati.

I risultati della PCA sono riportati in figura 12. I caratteri presi in esame sono di seguito riportati: lunghezza foglia, altezza, larghezza e spessore del grumolo. L'elaborazione dei dati ha permesso di individuare due componenti in grado di descrivere la maggior parte della variabilità totale osservata (85,5%). La componente 1 ha descritto la larghezza del grumolo, lo spessore del grumolo e la lunghezza delle foglie per una variabilità pari al 43,5%. In particolare, essa ha mostrato che più aumenta la larghezza del grumolo, più aumenta lo spessore di quest'ultimo e più diminuisce la lunghezza della foglia. La componente 2 ha descritto l'altezza del grumolo, per un valore pari al 42% della variabilità riscontrata. L'analisi ha evidenziato che all'aumentare di quest'ultima si ha un aumento dell'altezza del grumolo. Dal grafico si è evinto come tutti i genotipi si distribuiscono lungo la componente 1, mentre più concentrata è la distribuzione lungo la componente 2 fatta eccezione per i genotipi 7 e 8.

In figura 13 sono riportati i risultati della MCA. L'elaborazione dei dati ha permesso di individuare due dimensioni in grado di descrivere la maggior parte della variabilità totale osservata (84,5%). I seguenti caratteri sono stati presi in esame: portamento fogliare, densità fogliare, curvatura dell'apice, forma in sezione del grumolo, colore grumolo, presenza/assenza di costolature nelle guaine, sovrapposizione delle guaine.

La dimensione 1 ha descritto: la formazione del grumolo, il colore del grumolo, il portamento fogliare, l'intensità del colore del grumolo e la precocità, per un valore pari al 52% della variabilità totale.

La dimensione 2 ha descritto invece la densità del fogliame e il 32% della variabilità riscontrata.

Dal quadro informativo che ne deriva (figura 14) è risultato che le varietà locali di finocchio di Sarno (genotipi 2, 4 e 6) sembrano mostrare una origine comune e una certa similarità con la varietà commerciale Helvia (genotipo 12) e con la linea MsR₃ x

Napoli (genotipo 10); per contro esse sono risultate abbastanza diverse dalle cultivar commerciali Giulio, Chiarino e Selma (genotipi 11, 13, 14) e dall'ecotipo Tardivo di Sarno.

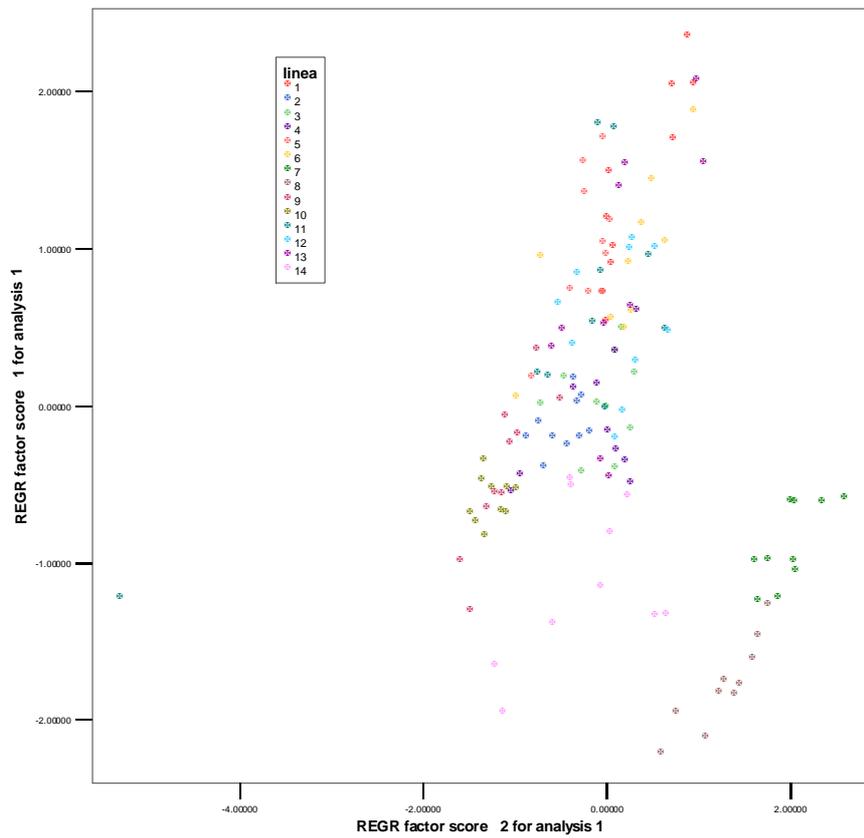


Figura 12: analisi PCA sugli ecotipi, sulle varietà commerciali e sul materiale di breeding.

Discrimination Measures

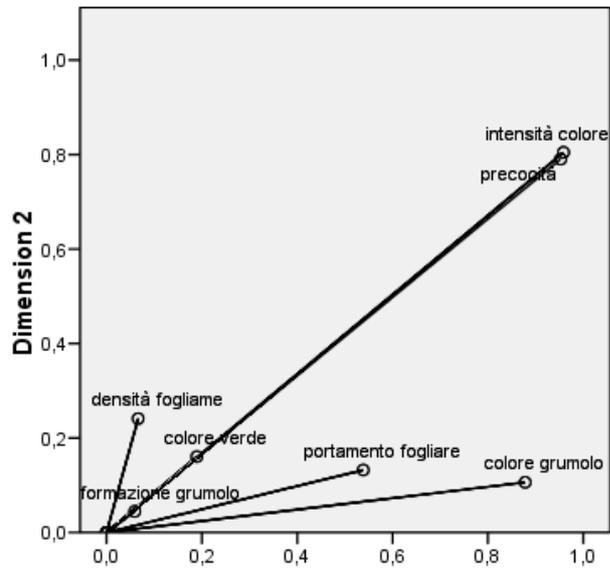
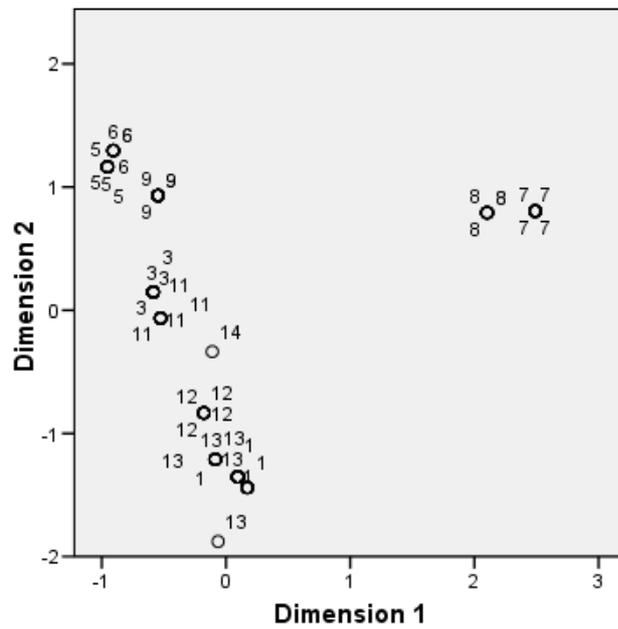


Figura 13: analisi MCA sugli ecotipi, sulle varietà commerciali e sul materiale di breeding.

Object Points Labeled by linea



Variable Principal Normalization.

Figura 14: classi fenotipiche del materiale vegetale

4 Discussioni

La limitatezza di lavori che hanno riguardato il miglioramento genetico del finocchio da grumolo denota uno scarso interesse da parte dei genetisti di tutto il mondo alle problematiche di questa specie. Anche in Italia, infatti, la ricerca ufficiale si è occupata del finocchio in modo del tutto periferico e per aspetti diversi da quello del miglioramento genetico. I primi progetti finanziati dal Mipaf e orientati in questa direzione sono stati realizzati presso l'Istituto sperimentale per l'orticoltura, sezione di Ascoli Piceno e presso il Dipartimento di produzione vegetale dell'Università della Tuscia (Viterbo), entrambi finalizzati all'ottenimento, mediante selezione genealogica, di nuove varietà caratterizzate da una migliore qualità del grumolo, da una stabilità delle rese, da resistenza a stress biotici (malattie fungine) e abiotici (freddo). Sono da citare in finocchio gli studi condotti nel 2004 da Vendramin *et al*, presso il Dipartimento di Biologia delle Piante dell'Università di Firenze e l'Istituto di Genetica Vegetale di Firenze, e volti alla valutazione della stabilità genetica di rigeneranti ottenuti da organogenesi ed embriogenesi somatica tramite l'utilizzo di marcatori RAPD e marcatori universali cloro plastici.

Questo lavoro ha espresso la necessità di integrare la ricerca di base con quella applicata. Lo studio del genere *Foeniculum*, genere del tutto orfano di lavori di genetica e genomica applicata, ha rappresentato una forte motivazione all'approfondimento delle tematiche affrontate. In particolare, le richieste pratiche avanzate da "La Semiorto Sementi" hanno riguardato l'ottenimento di nuova variabilità genetica nel genere *Foeniculum* con la duplice finalità di ampliare il parco varietale già in dotazione all'azienda stessa e di rimpiazzare nel tempo gli ecotipi con varietà ibride più performanti. Se da un lato l'antico adattamento alle condizioni ambientali rende

irrinunciabile il ricorso a questi ecotipi per evitare i comuni difetti di prefioritura e di appiattimento del grumolo quando la pianta viene a trovarsi in condizioni di stress termico o idrico, dall'altro, il perdurante impiego di selezioni empiricamente ottenute e di cultivar non ben moltiplicate comporta ancora l'ottenimento di produzioni qualitativamente dequalificate, che si differenziano per morfologia e per diverso grado di precocità. Queste selezioni empiriche provocano una corrente produttiva e quindi commerciale poco omogenea e a scapito della qualità generale del prodotto.

Alla luce di quanto detto, il lavoro di questa tesi ha mirato a creare nuovi genotipi di finocchio dotati di quei caratteri richiesti dal mercato. Per realizzare ciò, spesso il lavoro di miglioramento genetico si avvale del metodo del reincrocio, in cui l'obiettivo è quello di trasferire in una varietà già eccellente per altre caratteristiche (genitore ricorrente) geni che controllano poche altre caratteristiche per le quali essa è deficitaria, creando così nuova variabilità genetica. Negli schemi di reincrocio tradizionali, ad un primo incrocio F_1 , seguono 5-7 cicli di reincrocio, che permettono di recuperare il genotipo di partenza migliorato per la presenza del nuovo gene introdotto.

Nei reincroci realizzati in questo lavoro di tesi sono stati utilizzati i genotipi Precoce, Medio Precoce e Tardivo di Sarno come genitori ricorrenti. Tali ecotipi, diffusi nell'agro nocerino sarnese, sono eccelsi dal punto di vista organolettico ma presentano difetti evidenti per ciò che riguarda l'uniformità varietale e la produttività. Un risultato importante ottenuto nei tre anni di lavoro è stato l'ottenimento della linea "Precocissimo BC_1 ", finocchio bianco, a sezione circolare, con portamento fogliare semieretto, numero di guaine pari a 6 e precocità di 85 giorni. Come è noto, all'interno del calendario di coltivazione è quanto mai necessaria una diversificazione netta dei tipi per una giusta collocazione temporale, rispondente alle caratteristiche fisiologiche e al fine di evitare sovrapposizioni o mescolanze di genotipi, con diverso adattamento alle temperature; la

linea “Precocissimo BC₁” costituisce, in tal senso, un primo risultato importante potendo diversificare le semine ed i trapianti rispetto all’ecotipo Precoce in virtù della precocità anticipata di circa 15 giorni.

In seguito ad un numero di reincroci opportuni, la linea isogenica precocissima BC₁ potrà essere valutata in combinazioni ibride F₁ con gli altri parentali reperiti in commercio (varietà Giulio, Chiarino, Helvia, Selma, Zafiro) per la costituzione di varietà con caratteristiche superiori. Infatti, difetti come la non contemporaneità di maturazione e la disformità del prodotto potranno essere superati nella condizione ibrida.

In finocchio la produzione di ibridi F₁ dovrebbe soddisfare le seguenti necessità: essere efficiente e poco costosa. In particolare, per ridurre i costi di produzione commerciale di seme ibrido sono stati proposti e sperimentati molti approcci. Tuttavia, la strategia più utilizzata è quella che si basa sull’uso della maschiosterilità, la quale rappresenta un mezzo molto efficace di emasculazione genetica. Il grosso inconveniente che limita lo sfruttamento della maschiosterilità genetica per la produzione di seme ibrido è legato all’impossibilità di avere individui al 100% sterili. Ciò rende difficoltosa l’eliminazione dei genotipi fertili nell’incrocio di mantenimento. Le piante maschiosterili, infatti, hanno un genotipo msms e possono essere mantenute soltanto attraverso l’incrocio con piante isogeniche ma maschiofertili eterozigoti. La metà delle piante prodotte da un incrocio msms X Msms sarà maschiofertili (Msms) e l’altra metà maschiosterile (msms). Generalmente si ovvia a tale inconveniente propagando le linee msms, o operando una vera e propria selezione positiva quando, però, (a) il gene della ms è pleiotropico, o (b) è strettamente associato ad un gene che si manifesta fenotipicamente sempre prima della fioritura. Negli ultimi anni un numero sempre maggiore di innovazioni tecnologiche in genetica e in genomica e di strumenti molecolari hanno

consentito di comprendere sempre meglio aspetti strutturali e funzionali del genoma delle piante. Tali tecnologie e strumenti hanno permesso di accrescere i benefici ottenuti dalla coltivazione delle piante e, in particolare, di aumentare l'efficienza dei metodi tradizionali di selezione. Interesse notevole ha suscitato la selezione assistita dai marcatori molecolari la quale consente di selezionare i genotipi che possiedono uno specifico carattere, ad esempio la maschiosterilità, in base all'associazione di quest'ultimo con un marcatore molecolare. Non appena si rendono disponibili marcatori associati ai caratteri d'interesse, è possibile, infatti, procedere velocemente ed accuratamente alla selezione di genotipi che presentano il carattere desiderato direttamente a livello di analisi del DNA, senza ricorrere alle procedure standard di selezione, spesso elaborate e lunghe.

Perché la selezione assistita sia efficiente è necessario che il marcatore molecolare abbia bassissima percentuale di ricombinazione con il gene in selezione, vale a dire che il marcatore ed il gene siano strettamente associati tra loro. Una volta stabilita l'associazione tra il gene d'interesse e il marcatore è possibile seguire la segregazione del gene nella progenie per realizzare i programmi di miglioramento genetico.

Proprio il sistema CMS è stato identificato e caratterizzato in molte specie vegetali, includenti fagiolo, bieta, mais, cipolla, petunia, brassica, riso, sorgo, girasole, grano, carota, ecc. In molte di esse la ricerca ha permesso di sviluppare marcatori molecolari associati al carattere maschiosterilità citoplasmatica (CMS).

In orzo marcatori RAPD associati al locus Rfm1 sono stati individuati da Matsui *et al* (2001); marcatori AFLP, sempre associati al medesimo locus, sono stati individuati e convertiti in markers STS da Murakami *et al.* (2004); marcatori PCR-RFLP, convertiti in SNP marker, che discriminano il citoplasma fertile-N da quello sterile-S in cipolla sono stati sviluppati da Kwang-Soo Cho *et al* (2006). In *Brassica*, infine, marcatori

PCR costruiti sulla orf263, hanno mostrato differenze nei profili elettroforetici di cultivar fertili e sterili (Dieterich e Braun, 2003).

In carota, vegetale appartenente alla famiglia delle *Umbrelliferae* come il finocchio, molti lavori e studi sono stati condotti circa la caratterizzazione molecolare della CMS. Tratto fenotipico ad eredità materna (Peterson e Simons, 1986), strettamente associato a riarrangiamenti nel genoma mitocondriale (Pingitore *et al.*, 1989), è stato investigato da Steiborn *et al* (1995) tramite indagine RFLP su DNA mitocondriale della progenie da incrocio interspecifico *Dacus carota maximum* x *Dacus carota sativus* .

Sempre in carota Nakajima *et al* (1999) hanno prodotto 6 marcatori STS discriminanti il citoplasma sterile (493S, 2566A, 9304A, MS-1, MS-2) da quello fertile (493N, 2566B, 9304B, cultivar “Nagafutori-kintoki”, cultivar “Kokubun-senkou-oonaga”, cultivar “Koizumi-gosun”, cultivar “Imperator” e cultivar “Scarlet Nantes”) partendo da sei frammenti RAPD presenti in entrambe le tipologie di citoplasma. Lo stesso Nakajima, nel 2001 ha evidenziato la presenza di un marcatore STS di 1,1 kb discriminante tra i 2 gruppi di piante CMS (tipo Cornell e tipo Wisconsin) e 3 linee ibred fertili (493N, 2566B e 9304B). Infine, Grzebelus *et al.* (2001) hanno approcciato questa indagine avvalendosi della tecnica AFLP; una linea ibred CMS (K2163A), il suo mantentore (K2158B) e la loro progenie F₁ hanno mostrato 5 marcatori tra i genotipi fertili e sterili discriminanti però non in tutti i genotipi analizzati con diverse percentuali di presenza/assenza. Solo il marcatore Eco-AGG / Mse-CTA (180 bp) è stato osservato in tutti i genotipi sterili, in 12/13 della sua progenie F₁ ed in nessuno dei mantentori fertili (0/16).

Al fine di individuare dei marcatori associati alla maschiosterilità in finocchio, in questa tesi è stata realizzata un'analisi del genoma delle tre linee ibred maschiosterili [(MsR₃ x Napoli), (MsR₁ x Tarquinia) e (MsR₂ x Chiarino)] gentilmente fornite dal

Prof. Francesco Saccardo dell'Università degli studi della Tuscia, e dei tre ecotipi fertili Precoce di Sarno, Medio Precoce di Sarno e Tardivo di Sarno. Tale studio è stato realizzato mediante la procedura AFLP. Delle diciassette combinazioni di primer utilizzati la combinazione E-AGG/M-CTA ha permesso di individuare due frammenti, rispettivamente di 180 bp e 200 bp polimorfici tra le linee sterili e le linee fertili. In particolare, il frammento AFLP di 180 bp, è risultato essere lo stesso marker ritrovato in carota e discusso da Grzebelus *et al.* (2001).

Le attuali tecnologie informatiche non permettono di svelare i più elevati livelli di complessità di alcuni sistemi biologici, sebbene siano capaci di trovare le unità fondamentali costituenti i geni, le proteine e le sostanze chimiche. Dal 1995 Kanehisa *et al.* hanno sviluppato metodi basati sulle conoscenze disponibili in letteratura per determinare i complessi comportamenti sistemici della cellula e dell'organismo, partendo da informazioni genomiche. Le conoscenze disponibili sono raccolte nel KEGG, l'Enciclopedia dei Geni e dei Genomi di Kyoto e le relative tecnologie bioinformatiche sono state sviluppate sia per la ricerca di base che per le applicazioni pratiche (Kanehisa *et al.*, 2006). L'allineamento in BLAST NCBI della sequenza 2 di 180 bp ha mostrato l'80% di similarità genetica con una sequenza AM461850.2, isolata in *Vitis vinifera* e l'83% di similarità genetica con l'accessione NM_119067.1, isolata in *Arabidopsis thaliana*, e corrispondente al fattore di trascrizione ANAC075, coinvolto in processi di sviluppo di organi fiorali e nel controllo ormonale della pianta.

Come in tutte le specie vegetali anche in finocchio la maschiosterilità si esprime nel fiore. L'imbrunimento e la degenerazione delle antere in questa specie, fenomeno che fenotipicamente è associato alla CMS, fortemente possono essere relazionati all'individuazione di questo marcatore, visto il ruolo svolto da ANAC075 in *A. thaliana*.

La CMS è usualmente definita come “l’inefficienza ad eredità materna nella produzione di polline fertile”; essa è stata bene osservata in più di 150 specie di piante e rappresenta un modello eccellente per studiare le interazioni tra il genoma nucleare e quello citoplasmatico, in quanto la ristorazione della fertilità è dovuta a geni nucleari che sopprimono le disfunzioni citoplasmiche. La CMS può sorgere spontanea in linee di breeding, attraverso la mutagenesi, la fusione somatica e come risultato di incroci o di scambio interspecifico tra genoma nucleare e citoplasmatico. In carote, in particolare si manifestano due fenotipi CMS denominati “brown anther” e “homeotic-like”. Il primo è caratterizzato da arresto dello sviluppo degli stami con imbrunimento e degenerazione delle antere (stesso tipo di CMS notata in questo lavoro su finocchio); nel secondo si denota un rimpiazzo degli stami con strutture che ricordano organi fiorali quali petali o carpelli, identificati, rispettivamente, come “petaloid CMS” e “carpeloid CMS” da Stein e Nothnagel nel 1995 e da Linke *et al.* nel 2003.

Il marcatore molecolare utilizzato in questa tesi rappresenta un utilissimo strumento per migliorare l’efficienza di selezione dei genotipi maschiosterili che saranno prodotti nelle future generazioni di incrocio. L’utilizzo di altri marcatori molecolari nel *breeding* del finocchio, non solo potrà migliorare i processi di selezione, ma consentirà di costituire, in tempi brevi, nuove varietà aventi tratti agronomici di rilevante importanza economica (es. resistenza, valore nutrizionale, produzione, etc). La conoscenza, inoltre, delle basi genetiche di tutte le caratteristiche agronomiche importanti e della variazione allelica dei singoli loci di interesse, metterebbe il *breeder* nelle condizioni ottimali per progettare/disegnare linee di valore genetico superiore “*in silico*”. Tale concetto è conosciuto come “*Breeding by Design*” (Peleman *et al.*, 2003). Il *Breeding by Design* può essere tradotto, nel caso più vantaggioso, in una combinazione di alleli vantaggiosi a tutti i loci. Tale metodo può essere molto favorevole nel *pyramiding* di geni e alleli

diversi. Una volta che tutti i loci di importanza siano mappati precisamente, usando marcatori fiancheggiati, possono essere accuratamente selezionati gli eventi di ricombinazione in modo che si possano riorganizzare e raccogliere gli alleli favorevoli vicini gli uni agli altri. I software, poi, sono in grado di fornire grande aiuto per generare il percorso ideale per la creazione dei mosaici di combinazioni genotipiche, tramite l'incrocio di linee e l'uso di marcatori per poter selezionare le specifiche ricombinazioni che combineranno gli alleli voluti. Seguendo tale processo, in futuro, sarà possibile ridurre o addirittura eliminare la selezione fenotipica. Soltanto le varietà superiori saranno valutate in campo, per poter meglio valutare la loro estrinsecazione genotipica in differenti ambienti di crescita.

L'ultimo obiettivo di questa tesi è stato quello di individuare, nell'ambito delle varietà commerciali di finocchio reperite sul mercato e gli ecotipi locali studiati le migliori combinazioni da utilizzare come parentali per la produzione di ibridi F_1 . Ciò è stato possibile grazie all'uso, nuovamente, dei marcatori molecolari mediante la tecnica del DNA *fingerprinting* (o impronta genetica del DNA); tale tecnica consiste nell'identificazione delle varietà o del materiale in selezione o in propagazione e la sua protezione dalle improprie sostituzioni.

Il *fingerprinting* del DNA rappresenta un metodo ideale per evidenziare le differenze presenti nella sequenza di DNA tra due o più campioni a confronto, al fine di determinarne l'identità o accertarne le correlazioni esistenti, laddove esse non possano manifestarsi per effetto dell'ambiente, di meccanismi epistatici o pleiotropici (Hongtrakul *et al.* 1997; Rasmusson e Phillips 1997, Seefelder *et al.* 2000). In *Fragaria* primer ISSR sono stati ampiamente utilizzati per lo studio di distanze genetiche e per il DNA *fingerprinting* (Cekic *et al.*, 2001); altresì marcatori ISSR sono stati utilizzati per l'analisi del genoma e per analisi cluster in cultivar di riso (Blair *et al.*, 1999), per il

genotyping in cultivar di patata (Prevost e Wilkinson, 1999), ai fini forensi per dispute sui diritti del costituente in varietà di peperone (Lekha *et al*, 2000). L'analisi *fingerprinting* realizzata in questa tesi con i marcatori ISSR, ha permesso di individuare con esattezza quelle combinazioni di genotipi che al meglio potranno esprimere il fenomeno del lussureggiamento nella produzione di ibridi F₁. Le relazioni esistenti tra gli ecotipi e le varietà commerciali a livello di sequenza del DNA sono state determinate comparando il coefficiente di similarità genetica *simple matching*. Nel lavoro svolto la matrice di similarità genetica ottenuta ed il dendrogramma derivato da analisi cluster, unitamente ad accurate analisi fenotipiche, rappresentano un forte ausilio con cui è stato possibile individuare quelle combinazioni che al meglio potranno esprimere il fenomeno del lussureggiamento nella produzione di ibridi F₁. Questi strumenti hanno permesso di esplorare le relazioni esistenti nell'ambito del materiale vegetale utilizzato nel programma di breeding. Le differenze tra gli ecotipi e le varietà commerciali a livello di sequenza del DNA sono state determinate comparando il coefficiente di similarità genetica *simple matching* che è variato da valori di 0,63 tra le varietà Zafiro e Selma a valori di 0,87 tra le varietà Chiarino e Selma. Le combinazioni che saranno ottenute riguarderanno tutti gli ecotipi (Precoce, Medio e Tardivo) e le varietà commerciali Zafiro, Helvia, Chiarino, Selma. Esse saranno prodotte utilizzando come parentali quei genotipi che hanno mostrato la maggior diversità genetica.

I marcatori ISSR sono risultati uno strumento di indagine affidabile, capace di fornire polimorfismi riproducibili e numerosi evidenziando la variabilità entro le varietà di *Foeniculum vulgare*, e il DNA *fingerprinting* per la selezione assistita si è rilevato uno strumento efficiente di ausilio nei programmi di *breeding*.

5 Conclusioni

In relazione agli obiettivi che il lavoro si era prefissato si possono dedurre le seguenti considerazioni:

- È stata creata nuova variabilità genetica con l'individuazione della linea denominata Precocissimo e da subito tale variabilità è stata inserita nel programma di breeding; alla fine dei tre anni di lavoro sono state ottenute tre BC₂ relative alle coppie isogenetiche Precocissimo, Precoce e Medio Precoce che dopo un numero di reincroci opportuni potranno essere valutate in combinazioni ibride F₁ con gli altri parentali reperiti in commercio (varietà Giulio, Chiarino, Helvia, Selma, Zafiro).
- La genotipizzazione del materiale vegetale ha permesso di individuare con esattezza quelle combinazioni che al meglio potranno esprimere il fenomeno del lussureggiamento nella produzione di ibridi F₁.
- Per quanto riguarda lo studio della maschiosterilità in finocchio, specie del tutto orfana di studi di genetica di base e di genomica applicata, l'individuazione dei frammenti AFLP a 180 bp e 200 bp ha permesso l'identificazione di due marcatori strettamente associati e cosegreganti alla sterilità. Il frammento AFLP a 180 bp è risultato essere lo stesso marker ritrovato in carota utilizzato per testare la purezza di ibridi F₁. Il sequenziamento dell'amplicone a 180 bp ed il suo allineamento in Gene Banks validano ulteriormente l'associazione del marcatore al fenotipo sterile in finocchio visto il ruolo svolto da ANAC075 in *A. thaliana*.

6 Appendice

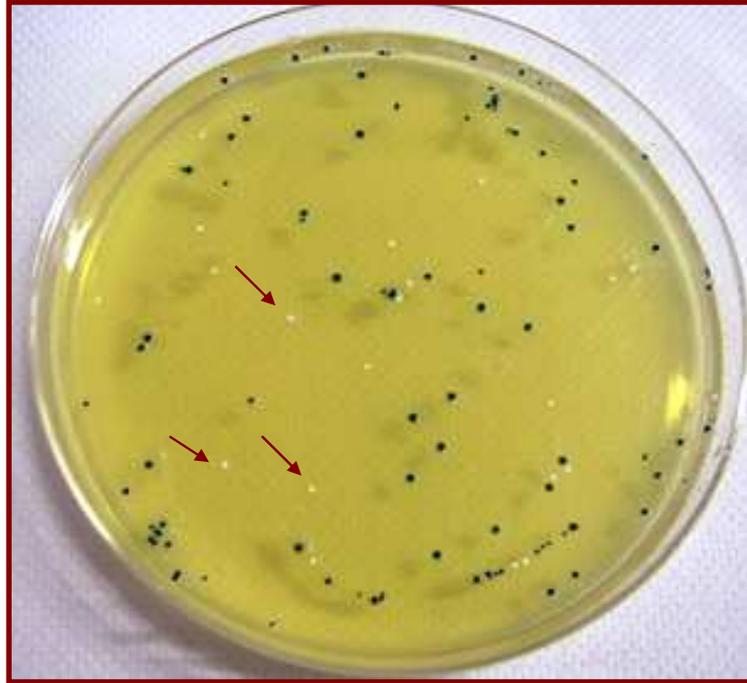


Figura 3: Esempio di piastra di clonaggio con colonie di *Escherichia coli* trasformate con un plasmide ricombinante (colonie bianche) e con un plasmide non ricombinante (colonie blu).

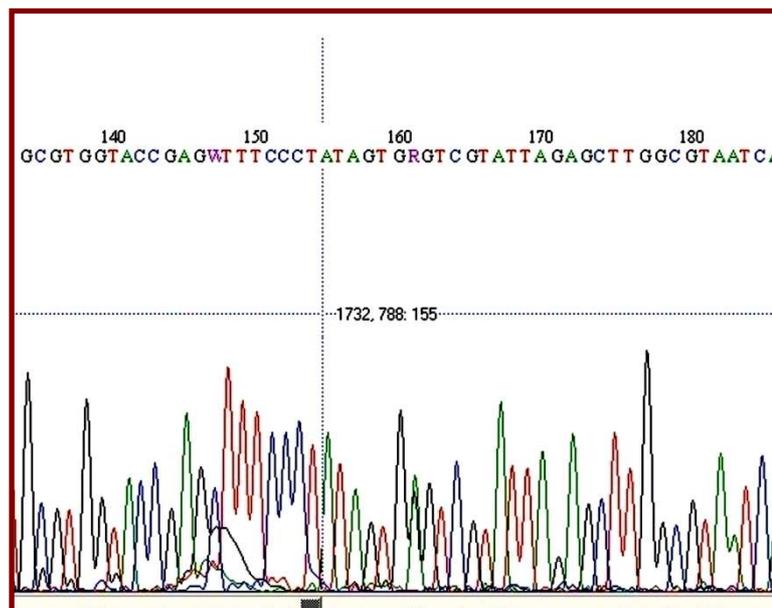


Figura 6: esempio di elettroferogramma ottenuto dalla reazione di sequenziamento di uno dei frammenti clonati con successo.

7 Bibliografia

- Banca dati Istat: www.istat/agricoltura/datiagri.it
- Banca dati Inran-Roma: www.inran.it
- Acciarri N.; (2001). Il miglioramento genetico del finocchio nelle Marche. *Informatore agrario*, 22: 41-44.
- Bastia T., Scotti N., Cardi T.; (2001). Organelle DNA analysis of *Solanum and Brassica* somatic hybrids by PCR with “Universal Primers”. *Theor Appl Genet*, 102:1265-1272.
- Blair M.W., Panaud O., McCouch S.R.; (1999). Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa L.*). *Theor Appl Genet*, 98:780-792.
- Cekic C., Battey N.H., Wilkinson M.J.; (2001). The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theor Appl Genet*, 103:540–546.
- Demesure B., Sodji N., Petit R.J.; (1995). A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol Ecol*, 4:129-131.
- Dieterich J.H.; Braun H.P.; Schmitz U.K.; (2003). Alloplasmic male sterility in *Brassica napus* (cms ‘Tounefortii-Stiewe’) is associated with a special gene arrangement around a novel atp9 gene. *Mol Gen Genomics*, 269:723–731.
- Ghislain M., Spooner D.M., Rodriguez F., Villam F.; (2004). Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor Appl Genet*, 108:881–890.

- Grzebelus D., Senalik D., Jagosz B., Simon P. W.; (2001). The use of AFLP markers for the identification of carrot breeding lines and F1 hybrids. *Plant Breeding*, 120: 526-528.
- Kanehisa M., Goto S., Hattori M., Aoki-Kinoshita K.F., Itoh M., Kawashima S., Katayama T., Araki M., Hirakawa M.; (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 34: D354-357.
- Kwang-Soo C., Young H.S., Seok K.Y., Gyu W.J.; (2006) . Selection of maintainer line in open-pollinated onion (*Allium cepa* L. cv. "Manchuhwang") using SCAR marker linked to cytoplasmic male sterile factor. *Korean Journal of Breeding*, (Vol. 37) 3: 133-137.
- Lekha D., Kumar A., Kathirvel M., Rao G.V., Nagaraju J.; (2000). DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays. *Forensic Science International*, 116: 63-68.
- Linke B., Nothnagel T., Börner T.; (2003). Morphological characterization of modified flower morphology of three novel alloplasmic male sterile carrot sources. *Plant breeding*, (Vol 118), issue 6: 543-548.
- Lössl A., Adler N., Horn R., Frei U., Wenzel G.; (1999). Chondriome-type characterization of potato: mt a, b, d, g, e and novel plastidial-mitochondrial configuration in somatic hybrids. *Theor Appl Genet*, 98:1-10.
- Matsui K., Mano Y., Taketa Y., Kawada N., Komatsuda T.; (2001). Molecular mapping of a fertility restoration locus (Rfm1) for cytoplasmic male sterility in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet*, 102: 477–482.
- Murakami S., Matsui K., Komatsuda T., Furuta Y.; (2004). AFLP-based STS markers closely linked to a fertility restoration locus (Rfm1) for cytoplasmic male sterility in barley. *Plant Breeding* 124, 133—136.

- Nakajima Y., Yamamoto T., Muranaka T., Oeda K.; (1999). Genetic variation of petaloid male-sterile cytoplasm of carrots revealed by sequence-tagged sites (STSs). *Theor Appl Genet*, 99:837–843.
- Nakajima Y., Yamamoto T., Muranaka T., Oeda K.; (2001). A novel orfB-related gene of carrot mitochondrial genomes that is associated with homeotic cytoplasmic male sterility (CMS). *Plant Molecular Biology*, 46: 99–107, 2001.
- Peleman J.D., Van Der Voort J.R.; (2003). Breeding by design. *Trends in plant Sciences*, 7:330-335.
- Peterson C.E., Simon P.W. ; (1986). Carrot breeding. Basset MJ (ed) *Breeding vegetable crops*. AVI Publ Westport Conn., pp 321–356.
- Pingitore M., Matthews B., Bottino P.J.; (1989). Analysis of the mitochondrial genome of *Dacus carota* with male sterile and male fertile cytoplasm. *J Hered*, 80: 143–145.
- Prevost A., Wilkinson M.J.; (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet*, 98:107-112.
- Rasmusson D.C., Phillips R.L.; (1997). Plant breeding progress and genetic diversity from de novo variation and elevated epistasis. *Crop Science*, 37: 303–310.
- Rohlf F. J., (1989). NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, vol 2.0, Exeter Software, Setauket, New York, USA.
- Saccardo F., et al; (2002). Finocchio ibrido F₁ da grumolo per migliorare qualità e resistenza agli stress. *Informatore agrario*, 20: 61-62.
- Sambrook J., Russel D.W.; (2001). *Molecular Cloning a laboratory manual*, III edition Vol. 3: A8.19-A8.24.

- Scotti N., Cozzolino S., Cardi T.; (2007). Mitochondrial DNA variation in cultivated and wild potato species (*Solanum spp.*). *Genome*, 50:706-713.
- Scotti N., Monti L., Cardi T.; (2003). Organelle DNA variation in parental *Solanum spp.* genotypes and nuclear-cytoplasmic interaction in *Solanum tuberosum* (+) *S. commersonii* somatic hybrids-backcross progeny. *Theor. Appl. Genet*, 108:87-94.
- Seefelder S., Ehrmaier H., Schweizer G.; (2000). Genetic diversity and phylogenetic relationships among accession of hop *humulus lupulus* as determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data. *Plant breeding*, 119:257-263.
- Siffelova G., Pavelkova M., Klabouchova A., Wiesner I.; (1998). RAPD fingerprinting of diploid *Lolium perenne* x hexaploid *Festuca arundinacea* hybrid genomes. *Biologia Plantarum, Praha: Biologicky ustav CSAV, 1959-1964.*
- Stein M., Nothnagel T.; (1995). Some remarks on carrot breeding (*Dacus carota sativus Hoffm.*). *Plant Breed*, 114: 1-11.
- Steinborn R., Linke B., Nothnagel. T, Boerner. T.; (1995). Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in alloplasmic forms of the genus *Dacus*. *Theor Appl Genet*, 91: 632–638.
- Vendramin G.; Bennici A., Anzidei M. (2004). Genetic stability and uniformità of *Foeniculum vulgare Mill.* Regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Science*, 166: 221-227.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M.; (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–4414.

- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.; (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.