

APPLICAZIONE DI MARCATORI MOLECOLARI PER LA CARATTERIZZAZIONE DI GENOTIPI DI *MYRTUS COMMUNIS* L.

Innocenza Chessa, Maria Nieddu, Patrizia Erre, Giovanna Francesca Cocco,
Giovanni Nieddu

Dipartimento di Economia e Sistemi Arborei, Università degli Studi di Sassari
Via Enrico De Nicola, 9 - 07100 SASSARI

Riassunto

Le indagini avviate in Sardegna sulla caratterizzazione molecolare della specie mirto (*Myrtus communis* L.) ha riguardato, in questa prima fase, una popolazione di linee varietali comprendente 38 selezioni, da proporre al mercato vivaistico per un'utilizzazione in ambito colturale. I risultati riportati in questa sede evidenziano l'efficacia dei marcatori molecolari ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) nell'identificare polimorfismi, che consentono una discriminazione dei genotipi e lo studio delle relazioni genetiche. L'applicazione dei marcatori cpSSR (Chloroplast Simple Sequence Repeat) è risultata di minore utilità, in quanto le informazioni ottenute non hanno fornito ulteriori indicazioni sulla variabilità genetica espressa dalla popolazione esaminata.

Parole-chiave: mirto, biodiversità, ISSR, cpSSR.

Abstract

The application of molecular markers technology to evaluate the genetic diversity within the species *Myrtus communis* L. has been aimed to analyse 38 selected genotypes, collected from different natural populations growing in Sardinia and prospected as improved varieties for myrtle cultivation. The results obtained showed the high efficiency in evidencing polymorphisms of ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) molecular marker, thus proving to be useful in the evaluation of genetic relationship among the selections. The application of cpSSR (Chloroplast Simple Sequence Repeat) marker gave less reliable results, since data obtained were not suitable for the genotypes fingerprinting.

Key-words: myrtle, biodiversity, ISSR, cpSSR.

Introduzione

I marcatori molecolari sono oggi considerati il più affidabile metodo di analisi della diversità genetica espressa dalle specie vegetali, affiancando ed integrando le tecniche di caratterizzazione convenzionali. La possibilità di una sicura identificazione dei genotipi, con l'applicazione delle tecniche di fingerprinting, ha consentito lo sviluppo di più accurate attività di conservazione della biodiversità vegetale e di gestione delle collezioni di germoplasma. I maggiori benefici per la tutela della biodiversità sono attribuibili all'identificazione di alleli rari, al monitoraggio costante dell'identità delle accessioni e al controllo della stabilità genetica, consentendo inoltre la rapida individuazione di eventuali mutazioni insorte nel corso della conservazione. La disponibilità di marcatori molecolari discriminanti è risultata di estrema utilità nel lavoro di selezione e miglioramento delle specie coltivate, trovando applicazione nelle attività di costituzione di nuove varietà e nell'attribuzione di certificazioni e riconoscimenti.

Non meno rilevanti risultano i vantaggi derivanti dall'uso delle tecnologie molecolari nello studio della variabilità genetica inter e intra specifica di popolazioni naturali. È noto che i disturbi ambientali di origine antropica e/o naturale, i cui effetti inducono una riduzione della biodiversità, possono modificare la struttura genetica delle popolazioni rendendo necessaria la predisposizione d'interventi di preservazione di materiali biologici rari e minacciati.

Nel caso di specie per le quali esiste un'utilità economica, attuale e/o potenziale, si è ipotizzata la necessità di avviare un processo di domesticazione e successiva elaborazione di modelli colturali (Chessa e Mulas, 2004), al fine di proteggere le specie in ambiente naturale. È il caso della specie mirto, per la quale sono state avviate da tempo specifiche indagini per la selezione di linee varietali, da proporre al mercato vivaistico per la promozione del comparto relativo alla produzione del tipico liquore di mirto (Mulas *et al.*, 1999a e b). Considerando che le specie spontanee rappresentano un serbatoio di biodiversità, a cui l'uomo ha da sempre attinto per la domesticazione e il miglioramento delle specie coltivate (Chessa, 2003), nel lavoro di individuazione e selezione di genotipi con caratteri distintivi si deve necessariamente tener conto del livello di variabilità genetica espresso dalla popolazione naturale di appartenenza (Chessa, 2004).

Allo stato attuale, la maggior parte delle attività di tutela e conservazione ha riguardato le risorse genetiche delle principali specie coltivate, mentre solo il 20% del materiale genetico nelle collezioni *ex situ* rappresenta le cosiddette specie minori, sottoutilizzate o non ancora domesticate (Padulosi, 1999). Si riscontra, pertanto, una significativa carenza di conoscenze sulla distribuzione della diversità genetica di tali specie, mentre è innegabile la loro importanza nel fornire la base genetica per il miglioramento delle specie coltivate o per la presenza di particolari caratteri (Hammer, 2003).

I recenti progressi delle tecniche analitiche hanno consentito la messa a punto di marcatori molecolari per alcune specie da frutto minori, con risultati di elevata utilità per identificare i genotipi e analizzarne le caratteristiche genetiche (Chessa e Nieddu, 2005). Anche per le specie della macchia mediterranea si sottolinea la necessità di migliorarne lo stato di conservazione, attraverso la caratterizzazione della variabilità genetica e fenotipica nell'ambito di collezioni, sia *ex situ* (Barazani *et al.*, 2003) sia *in situ* (Chessa *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda la specie mirto, le indagini sinora condotte hanno analizzato la variabilità intraspecifica mediante l'applicazione di marcatori AFLP (Bianchi *et al.*, 2002, Bruna *et al.*, 2004) di popolazioni naturali provenienti da diverse regioni italiane. Le prime indagini, avviate in Sardegna sulle caratteristiche genetiche di selezioni varietali di mirto, sono state condotte utilizzando la metodologia RAPD, risultata utile per lo screening di ampie collezioni, ma meno affidabile per una accurata identificazione dei genotipi. Pertanto, sono stati definiti protocolli d'analisi che prevedono l'uso di marcatori molecolari maggiormente selettivi ed informativi, quali i microsatelliti.

Nel presente lavoro si riporta una sintesi dei risultati sinora ottenuti dall'analisi delle caratteristiche genetiche della popolazione di selezioni varietali, attraverso l'applicazione di marcatori molecolari microsatelliti, sia nucleari sia cloroplastici. L'obiettivo è quello di fornire una caratterizzazione genetica delle varietà in esame che, affiancata alla caratterizzazione morfologica ed agronomica, costituisce un indispensabile strumento per la certificazione e l'acquisizione di riconoscimenti.

Materiali e Metodi

Il lavoro di caratterizzazione genetica è stato svolto su 38 selezioni (Tab. 1), provenienti dal campo collezione dell'azienda agraria sperimentale dell'Università di Sassari ubicata ad Oristano, località Fenosu.

Il DNA genomico è stato estratto partendo da 0.5 g di tessuto fresco, prelevato da foglie giovani, omogenato in azoto liquido e in presenza del buffer di estrazione CTAB (100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1,4 M NaCl e CTAB 2%), sulla base del protocollo proposto da Lodhi (1994). La purezza e la concentrazione del DNA sono state valutate mediante analisi spettrofotometrica dei campioni.

Per l'identificazione delle selezioni sono stati applicati due marcatori molecolari differenti: ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) e cpSSR (Chloroplast Simple Sequence Repeat).

Tabella 1 - Elenco delle selezioni varietali analizzate

ID	Origine	ID	Origine
RUM4B	Rumanedda (SS)	ORS2	Burcei (CA)
RUM13	Rumanedda (SS)	CPT5	Capoterra (CA)
SBD1	Muravera (CA)	RUM20	Rumanedda (SS)
MON5	Monti (SS)	LAC10	Laconi (NU)
PSF1	Sinnai (CA)	RUM4	Rumanedda (SS)
BUD1	Budoni (NU)	ORO2	Orosei (NU)
RUM6	Rumanedda (SS)	ORS1	Burcei (CA)
RUB	Rumanedda (SS)	MON4	Monti (SS)
RUM14	Rumanedda (SS)	RUM3	Rumanedda (SS)
MON2	Monti (SS)	LAC31	Laconi (NU)
CPT6	Capoterra (CA)	LAC3	Laconi (NU)
PSF4	Sinnai (CA)	RUM10	Rumanedda (SS)
BOS1	Bosa (NU)	ISL3	Isili (NU)
RUM12	Rumanedda (SS)	SBD2	Muravera (CA)
CUG11	Cuglieri (OR)	SAS1	Sassari (SS)
LAC11	Laconi (NU)	CPT4	Capoterra (CA)
BOS2	Bosa (NU)	TEL2	Telti (SS)
SIN2	Siniscola (NU)	LAC1	Laconi (NU)
ORS3	Burcei (CA)	RUM15	Rumanedda (SS)

Analisi ISSR - Sono stati utilizzati 9 primer ISSR, basati su ripetizioni di-nucleotidiche. L'amplificazione del DNA è stata condotta in PCR utilizzando 30 ng di campione per un volume totale di 20 µl contenente 8 µl Hot Master Mix 2.5X (Eppendorf) e 20 pmol di primer. Il protocollo di amplificazione ha previsto un'iniziale denaturazione per 2 min a 94 °C, seguita da 35 cicli di 1 min a 94 °C, 1 min a 48-54 °C in funzione del primer, 1 min a 65 °C ed un'estensione finale di 7 min a 65 °C. I prodotti della PCR sono stati analizzati su gel di poliacrilamide denaturante 5% (urea 7M, buffer TBE) ed evidenziati mediante colorazione in nitrato d'argento.

Analisi cpSSR - Per analizzare la variabilità nei loci microsatellite dei cloroplasti sono stati testati 10 primer: le coppie *ccmp2*, *ccmp3*, *ccmp4* e *ccmp5*, descritte da Weisling e Gardner (1999), e coppie *ccssr8*, *ccssr9*, *ccssr16*, *ccssr19*, *ccssr20* e *ccssr21*, identificate da Chung e Staub (2003). Le reazioni di amplificazione sono state effettuate su un volume finale di 20 µl utilizzando 50 ng di DNA campione, Hot Master Mix 2.5X e 0.2 µM di primer. E' stato applicato il seguente programma di amplificazione: 2 min a 94 °C; 35 cicli a 94 °C per 30 s, 50 °C per 30 s, 65 °C per 30 s; 65 °C per 7 min. I prodotti sono stati evidenziati seguendo la stessa metodologia utilizzata per gli ISSR.

Analisi dei dati - I profili elettroforetici ottenuti dallo scoring dei primer ISSR e cpSSR sono stati convertiti in una matrice binaria di valori 1 e 0, che rappresentano rispettivamente la presenza e l'assenza del marcatore. La successiva elaborazione statistica della matrice di similarità, condotta mediante il software NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1994), ha consentito di rappresentare graficamente le relazioni genetiche esistenti tra le selezioni mediante un dendrogramma. Le similarità genetiche sono state calcolate utilizzando il coefficiente di Dice ed il dendrogramma è stato costruito con il metodo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average).

Risultati

ISSR - Sono stati utilizzati complessivamente 9 primer ISSR, ma sono stati selezionati solo i 6 (Tab. 2) che hanno identificato profili riproducibili certi.

L'amplificazione del DNA genomico delle 38 accessioni ha prodotto complessivamente 136 marcatori di cui 110 polimorfici. Il numero di bande totali ottenute è variato da 31, per il

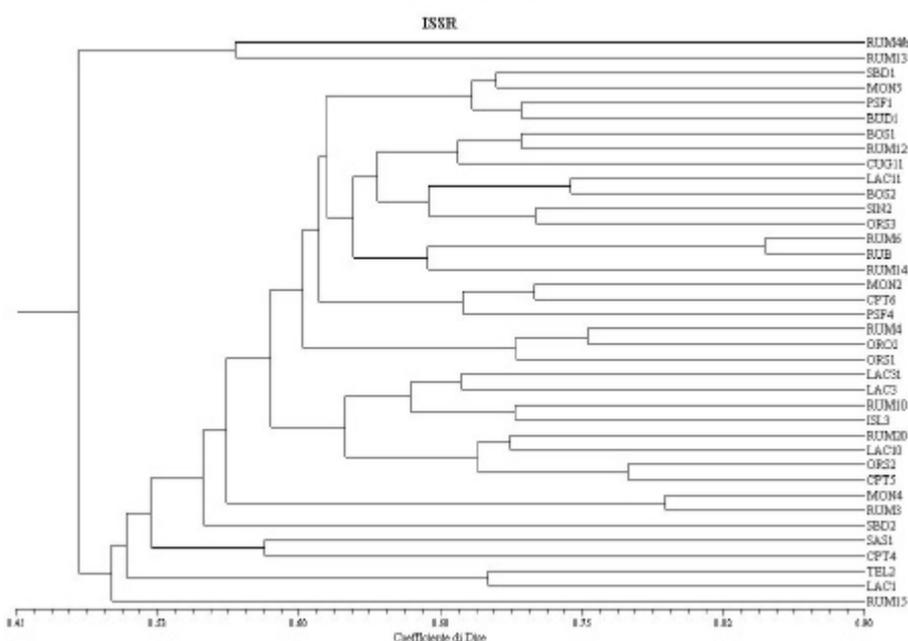
primer BC890, a 18 per i primer BC889 e BC891. Tutti i primer hanno evidenziato polimorfismi tra le selezioni. La percentuale di polimorfismo più alta, pari all'86%, è stata ottenuta con il primer BC888, mentre la percentuale media pari all'81% conferma l'efficacia del marcatore utilizzato (Tab. 2).

Tabella 2 – Elenco dei primer utilizzati per l'analisi ISSR. Numero totale di bande (NTB), numero totale di bande polimorfiche (NTP) e percentuale di polimorfismo (P%).

Codice primer	Sequenza 5'-3'*	NBT	NBP	%P
BC818	(CA)8G	22	17	77
BC836	(AG)8YG	26	20	77
BC888	BDB(CA)7	21	18	86
BC889	DBD(AC)7	18	14	78
BC890	VHV(GT)7	31	26	84
BC891	HVH(TG)7	18	15	83
totale		136	110	
media				81

*Y sta per pirimidina, B sta per non A, D per non C, H per non G, V per residuo non T.

Il dendrogramma ottenuto (Fig. 2) mostra una similarità tra i genotipi studiati che varia da un minimo di 0,48 ad un massimo di 0,85. I cluster visualizzabili sono principalmente due. Il primo, ad un livello di similarità pari a 0,57, comprende le due selezioni RUM4/B e RUM13, entrambe a bacca nera ed origine geografica comune. Il secondo cluster, ad un livello di



similarità pari 0,51, mostra numerosi sub-gruppi, nei quali è evidenziabile una dispersione delle selezioni. L'unica eccezione è costituita dal gruppo che comprende le selezioni RUM6, RUB e RUM14, nel quale si individuano le varietà a bacca bianca, raggruppate in un unico cluster con livello di similarità minima di 0,67.

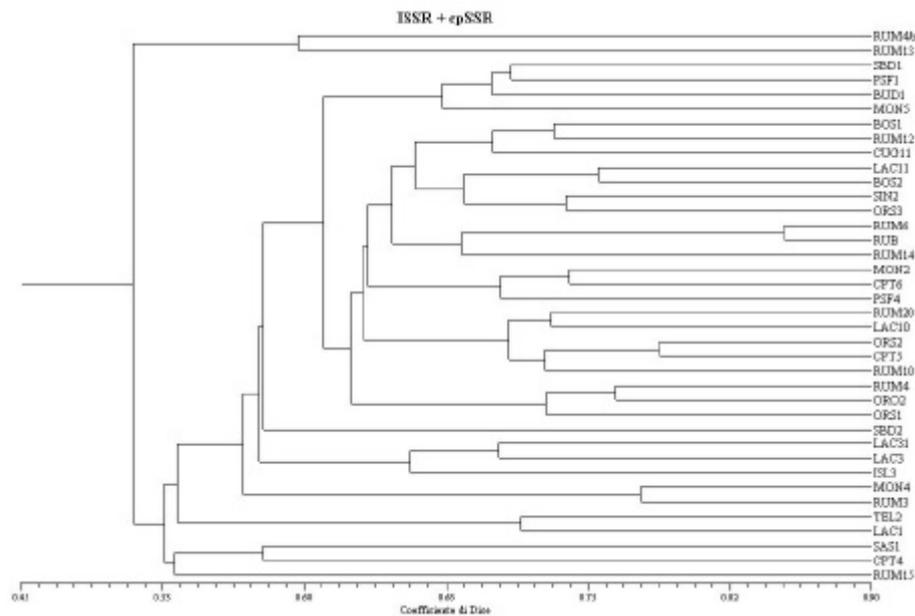
Figura 2 –Dendrogramma rappresentativo delle relazioni genetiche ISSR.

cpSSR - L'amplificazione del DNA con i 10 primer utilizzati per l'analisi dei cloroplasti SSR ha evidenziato polimorfismo soltanto a livello dei loci *ccmp2* e *ccssr9* (Tab. 3).

Tabella 3 – Microsatelliti dei cloroplasti selezionati (* R = (A o G), Y = (C o T))

Locus	Sequenza 5'-3'	Sequenza ripetuta
ccmp2	GATCCCGGACGTAATCCTG	(A) ₁₁
	ATCGTACCGAGGGTTCGAAT	
ccssr9	GAGGATACACGACAGARGGARTTG	(A) ₁₃
	CCTATTACAGAGATGGTGYGATT	

Il dendrogramma ottenuto combinando i dati ISSR con quelli cpSSR (Fig. 3) non è risultato significativamente differente dal dendrogramma relativo ai soli dati ISSR,



confermando i risultati già illustrati. I marcatori cpSSR sinora utilizzati non hanno, in realtà, fornito informazioni aggiuntive a quelle già evidenziate dalla metodologia ISSR. Il polimorfismo ottenuto con soli due loci cpSSR non è, infatti, sufficiente per definire in modo chiaro le relazioni genetiche tra le selezioni di mirto studiate.

Figura 3 - Dendrogramma delle relazioni genetiche ISSR e cpSSR.

Discussione e conclusioni

La metodologia ISSR, utilizzata nel presente lavoro, è risultata efficace per lo studio della variabilità genetica tra i genotipi di mirto in esame, consentendo un approfondimento delle conoscenze sulla caratterizzazione genetica di una popolazione ottenuta per selezione.

A differenza di quanto rilevato da precedenti indagini su popolazioni naturali che dimostrano un'elevata variabilità tra genotipi provenienti da aree geografiche separate (Bianchi *et al.*, 2002), l'analisi condotta su selezioni varietali della Sardegna ha evidenziato una similarità minima tra i genotipi pari a 0,48, indicativa di una non elevata ampiezza della base genetica. I coefficienti di similarità ottenuti non si discostano dai livelli riportati in altri studi condotti sulla variabilità genetica della specie (Bruna *et al.*, 2004), dai quali risulta una minore diversità tra individui mantenuti in collezione *ex situ* e derivanti da popolazioni della medesima area geografica.

Il risultato ottenuto è imputabile, oltre che all'appartenenza delle selezioni alla stessa regione, peraltro caratterizzata da isolamento geografico, anche dalla pressione selettiva esercitata nel corso del processo di domesticazione della specie. Infatti, la selezione per caratteri fenotipici comuni, quali quelli importanti ai fini della coltivazione, comporta inevitabilmente una riduzione della variabilità intraspecifica, rispetto a quella ipotizzabile per le popolazioni spontanee.

La caratterizzazione genetica, effettuata mediante l'utilizzo dei marcatori cpSSR, non ha fornito informazioni aggiuntive all'analisi ISSR, a causa del basso livello di polimorfismo ottenuto. È presumibile che lo studio di loci differenti o di un maggior numero d'individui, capaci di rappresentare la variabilità presente, consentirebbe una più accurata stima della diversità intraspecifica. Infatti, il limite della tecnica cpSSR risiede nella difficoltà di valutare il giusto livello di differenziazione all'interno di popolazioni di dimensioni ridotte e con elevata variabilità (Provan *et al.*, 2001).

L'applicazione delle più recenti metodologie per l'individuazione, la caratterizzazione morfologica e molecolare della variabilità genetica della specie in esame consentirà un'adeguata gestione delle risorse genetiche, anche nella prospettiva di una promozione degli usi tradizionali ed introduzione di prodotti innovativi.

Ringraziamenti

Si ringrazia l'Assessorato all'Agricoltura e Riforma Agro-Pastorale della Regione Autonoma della Sardegna per il supporto finanziario alla ricerca tramite il "Programma di ricerca per l'ottimizzazione di modelli colturali del mirto (*Myrtus communis* L.)".

Bibliografia

- Barazani O., Dudai N., Golan-Goldhirsh A., 2003. Comparison of mediterranean *Pistacia lentiscus* genotypes by Random Amplified Polymorphic DNA, chemical, and morphological analyses. *Journal of Chemical Ecology*, 29(8): 1939-52.
- Bianchi R., Ballero M., Statti G., Agrimonti C., 2002. Analysis of genetic variation in natural populations of *Myrtus communis* L., using AFLP markers. Proceedings of the XLVI Italian Society of Agricultural Genetics - SIGA Annual Congress.
- Bruna S., Mercuri A., Cervelli C., Baglia L., De Benedetti I., Schiva T., 2004. Caratterizzazione genetica di popolazioni di *Myrtus communis* L. mediante marcatori AFLP. *Italus Hortus*, 11(4): 332-335.
- Chessa I., 2003. Woody plant biodiversity in a Mediterranean island: status and perspective. Journée Franco-Italienne "Génomique des plants et fonction des cellules", 23 Mai, Paris.
- Chessa I., Erre P., Nieddu M., Satta D., Nieddu G., 2001. Applicazione di marcatori molecolari RAPD in una collezione di germoplasma sardo di fico (*Ficus carica* L.). *Italus Hortus* 8(5): 16-19.
- Chessa I., Nieddu G., 2005. Analysis of diversity in the fruit tree genetic resources from a Mediterranean island. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 267-276.
- Chessa I., Nieddu G., Tsipouridis C., 2000. Analisi in situ di biotipi di corbezzolo (*Arbutus unedo* L.) selezionati in Sardegna e in Grecia. Atti IV Congresso Nazionale Biodiversità "Germoplasma locale e sua valorizzazione", III: 789-792.
- Chung S., Staub J.E., 2003. The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 757-767.
- Lodhi M.A., Ye G.N., Weeden N.F., Reisch B.I., 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1): 6-13.
- Mulas M., Cani M.R., 1999a. Germplasm evaluation of spontaneous myrtle (*Myrtus communis* L.) for cultivar selection and crop development. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal and Aromatic Plants*, 6(3): 31-49.
- Mulas M., Cani M.R., Brigaglia N., Deidda P., 1999b. Study of myrtle (*Myrtus communis* L.) genetic resources to promote extensive crop as integration of spontaneous harvests. *Acta Horticulturae*, 502: 85-88.
- Provan J., Powell W., Hollingsworth P.M., 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(3): 142-147.
- Rohlf F.J., 1994. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80. Exeter Software, Setauket, NY.
- Weisling K., Gardner R.C., 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42: 9-19.