

ARTICOLI ORIGINALI

MINERVA BIOTEC 2012;24(Suppl. 1 al N. 1):3-10

Utilizzazione di marcatori molecolari SSR e AFLP per l'identificazione varietale in patata

C. VILLANO, R. AVERSANO, L. FRUSCIANTE, R. GARRAMONE, M. IORIZZO, D. CARPUTO

Obiettivo. La tracciabilità dei prodotti alimentari tramite la caratterizzazione varietale delle produzioni agricole è uno degli aspetti di maggior rilievo nel campo della valorizzazione del patrimonio agroalimentare italiano e della tutela del consumatore. Le moderne tecniche di biologia molecolare offrono strumenti analitici di grande efficacia nell'identificazione varietale. Tra i prodotti caratteristici dell'agricoltura italiana, la patata precoce, coltivata tipicamente in Campania, Puglia, Sicilia e Sardegna, riveste un ruolo di primaria importanza, ma è oggetto di frodi alimentari tramite il supplemento di materiale proveniente dall'Africa settentrionale o da Cipro. L'obiettivo di questa ricerca è stato l'ottenimento di un *fingerprinting* molecolare di varietà di patata comunemente utilizzate per la produzione extrastagionale.

Metodi. Il materiale genomico è stato estratto dai tuberi di 22 varietà, raccolte nelle zone di origine, e analizzato con otto microsatelliti e cinque combinazioni di primer AFLP.

Risultati. Dal confronto dei profili allelici è risultato che il numero minimo di *loci* SSR necessario per distinguere le varietà analizzate è stato cinque (STI0032, STG0001, STI0012, STM5127 e STM1106). L'analisi AFLP, invece, ha permesso di individuare 83 frammenti specifici per le quattro varietà maggiormente coltivate nei cicli extrastagionali e, in particolare, 34 per Sieglinde, 23 per Spunta, 15 per Elvira e 11 per Agria.

Conclusione. In conclusione, è stato possibile sviluppare nuovi marcatori molecolari specifici di varietà di patata precoce, utili per la tracciabilità molecolare e per garantire la veridicità delle indicazioni presenti sulle etichette dei prodotti.

PAROLE CHIAVE: Microsatelliti - Tracciabilità - Fingerprinting.

*Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali
Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia*

In un contesto di produzioni standardizzate per mercati sempre più di massa e globali, l'agricoltura è diventata "anonima" e il consumatore non conosce né l'origine degli alimenti, né le imprese produttrici. La creazione di marchi di qualità da parte dell'Unione Europea si è rivelata uno strumento efficace per proteggere il patrimonio agroalimentare italiano e tutelare il consumatore nella conoscenza dei prodotti tipici con forte valenza territoriale e grande tradizionalità. La tipizzazione delle produzioni agricole, in tal senso, è uno degli aspetti di maggior rilievo nel campo della valorizzazione dei prodotti alimentari, nonché della prevenzione delle frodi e della sicurezza alimentare¹. Essa è indispensabile per qualsiasi politica di qualità, dalle produzioni a denominazione d'origine ai prodotti tradizionali. Le produzioni di Qualità sono controllate a livello comunitario e nazionale. Fra le più importanti si possono ricordare le Indicazioni Geografiche (IGP) e le Denominazioni di Origine Protetta (DOP), regolamentate dal reg. CEE 2081/92, le Attestazioni di Specificità dal reg. CEE 2082/92 e i disciplinari DOC/DOCG/IGT. L'Unione Europea ha messo in atto numerose iniziative finalizzate al miglioramento della tracciabilità delle produzioni agroalimentari.

Le moderne tecniche di biologia molecolare offrono strumenti analitici di grande efficacia nell'identificazione di varietà ai fini della tracciabilità. In particolare, le tecniche basate sull'analisi del DNA presentano

Autore di contatto: D. Carputo, Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, (DiSSPAPA), Via Università 100, 80055 Portici, Napoli, Italia. E-mail: carputo@unina.it

molti vantaggi rispetto ai metodi tradizionali basati sulla valutazione di caratteri morfologici e biochimici, soggetti all'influenza delle condizioni ambientali e utilizzabili solo su prodotti non processati. Esse consentono di identificare i cosiddetti marcatori molecolari, sequenze di DNA che caratterizzano in modo inequivocabile un organismo. Basandosi direttamente su differenze (polimorfismi) nella sequenza nucleotidica del DNA, i marcatori molecolari non presentano effetti epistatici o pleiotropici e non soffrono l'interferenza dell'ambiente. Essi sono distribuiti lungo tutto il genoma e ciò permette di distinguere anche individui geneticamente simili e fenotipicamente indistinguibili. La maggior parte di essi è basata sull'uso della tecnica denominata *polymerase chain reaction* (PCR), che consente di amplificare milioni di volte, e in poche ore, sequenze specifiche di DNA. La PCR è un processo esponenziale molto sensibile; generalmente un quantitativo necessario di prodotto amplificato è ottenuto dopo soli 30 cicli di amplificazione. Tra i marcatori maggiormente impiegati figurano gli AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e gli SSR (*Simple Sequence Repeat*), vantaggiosi nella caratterizzazione varietale (*fingerprinting*) e individuale (*genotyping*) grazie all'elevato grado di polimorfismo in grado di essere rilevato da entrambi ².

Tra i prodotti dell'agricoltura italiana, la patata riveste un ruolo di primaria importanza. In Italia, grazie alle condizioni ambientali riscontrabili in alcune aree costiere meridionali, è possibile usufruire di una produzione di tuberi pressoché ininterrotta durante tutto l'anno differenziata in tre raccolti: patata comune (da giugno a ottobre) e patata extrastagionale, che può essere bisestile (da dicembre a febbraio) o precoce (da marzo a giugno). La quota principale del prodotto nazionale è costituita dalla patata comune, molto diffusa nelle regioni settentrionali, mentre tipica coltura remunerativa dell'Italia meridionale è la patata precoce, coltivata soprattutto in Campania, Sicilia, Puglia e Sardegna per le sue peculiari esigenze climatiche. Queste quattro regioni italiane coltivano il 93% della superficie nazionale e danno luogo al 94% della produzione complessiva di patata precoce. Dagli anni Ottanta a oggi, la Sicilia ha aumentato le proprie superfici coltivate di circa il 50%, diventando la regione leader nella coltivazione della patata precoce con i suoi quasi 10000 ha, pari a metà dell'intera superficie nazionale. Le produzioni unitarie hanno manifestato un rilevante incremento passando da 16 t/h del triennio

1987-1989 alle 21 t/h dell'ultimo triennio 2007-2009 (dati ISTAT). La produzione extrastagionale precoce è considerata un prodotto tipico con caratteristiche qualitative peculiari, come il basso contenuto di sostanza secca. Essa ha anche caratteristiche culinarie speciali che hanno indotto il Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali a inserire alcune di queste produzioni in un elenco di prodotti tipici (<http://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/202>), tra essi la patata novella Sieglinde di Galatina, della quale è in corso il riconoscimento della DOP da parte della Associazione produttori "Patate di Galatina" con la sede nel comune di Alliste (LE). L'esigenza dell'identificazione varietale nasce anche dal fatto che nella produzione nazionale talvolta è presente materiale proveniente dall'Africa settentrionale o da Cipro. Per valorizzare e, allo stesso tempo, salvaguardare la produzione nazionale occorre dunque definire un sistema di tracciabilità affidabile, ossia capace di fornire al consumatore le informazioni sul prodotto acquistato, tutelando, allo stesso tempo, i produttori pertinenti ai Consorzi di produzione tipica.

Obiettivo di questa ricerca è stato quello di effettuare un *fingerprinting* molecolare di varietà di patata comunemente utilizzate per la produzione precoce. I marcatori utilizzati hanno permesso l'identificazione di alleli polimorfici tra le varietà analizzate, confermando la validità degli strumenti genomici nell'autenticazione varietale.

Materiali e metodi

Materiale vegetale

Sono state utilizzate ventidue varietà di patata, delle quali sette (Agata, Agria, Antea, Arinda, Elvira, Sieglinde e Spunta) raccolte presso tredici aziende agricole site in Campania, Puglia e Sicilia (Italia) e quindici (Arrow, Asterix, Badia, Bartina, Dayana, Elfe, Frisia, Inova, Liseta, Marabel, Primura, Terragold, Veronie, Vivaldi e Volumia) provenienti dalla banca del germoplasma del DiSSPAPA.

Isolamento del DNA e analisi molecolari

Per ciascuna varietà, il DNA è stato estratto da tre repliche biologiche di tuberi a maturità fisiologica previamente liofilizzati, seguendo il protocollo di Wulff *et al.*³ Il DNA totale è stato analizzato con otto

microsatelliti di tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Tabella I), scelti dalla banca dati SSR di patata del Centro Internazionale della Patata (<http://research.cip.cgiar.org/confluence/display/IPD/SSR+Marker>). La reazione PCR è stata realizzata in un volume finale di 20 µL contenente 20 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 1,6 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM *primer forward* marcato 5'-Hex (esa-cloro-6-carbossifluoresceina) o 5'-Fam (6-carbossifluoresceina), 0,4 µM *primer reverse*, 1 unità di *Taq* polimerasi (Invitrogen Life Technologies) e 30 ng di DNA. Il ciclo di amplificazione PCR utilizzato è stato realizzato seguendo le seguenti tre fasi: 1) cinque cicli di tipo *touch down* (con decremento della temperatura di *annealing* di 1°C ad ogni ciclo di amplificazione) a 94 °C per 45s, Ta °C + 5 °C per 60s, 72 °C per 30s; 2) 30 cicli di amplificazione a 94 °C per 45s, Ta °C per 60s, 72 °C per 30s; 3) una fase di elongazione finale a 72 °C per 20 min. I profili SSR sono stati analizzati tramite elettroforesi capillare con il *Genetic Analyzer 3130* (Applied Biosystems) utilizzando il programma *Peak Scanner* versione 1.0 (Applied Biosystems). Per verificare la riproducibilità dei dati ottenuti, tutti gli esperimenti sono stati compiuti in triplicato. Le varietà Agria, Elvira Sieglinde e Spunta sono state sottoposte a genotipizzazione anche mediante l'AFLP *Analysis System-I* (Invitrogen Life Technologies), cui sono state apportate alcune modifiche. Il DNA genomico (125 ng) è stato digerito in una miscela di reazione contenente due enzimi di restrizione *EcoRI* e *MseI*. La miscela è stata incubata a 37 °C per una notte e, in seguito, a 70 °C per 15 min per l'inattivazione delle endonucleasi di restrizione. Il DNA digerito è stato miscelato agli adattatori oligonucleotidici *EcoRI* e *MseI* e alla T4 DNA ligasi (Invitrogen Life Technologies), quindi incubato per 2 ore a 20°C. Per la reazione di pre-amplificazione, 20 µl di ligato diluito 1:10 e primer di pre-amplifica-

zione *EcoRI* e *MseI* sono stati sottoposti al seguente programma di amplificazione: 20 cicli a 94 °C per 30s, 56 °C per 60s e 72 °C per 60s. I prodotti della reazione sono stati diluiti 1:30 con TE 1x. Per l'amplificazione selettiva la miscela di componenti di reazione (20 µl) è stata preparata utilizzando i primer *EcoRI* marcati con i fluorocromi Hex o Fam, 4,5 µl di primer *MseI*, 1U di *Taq* polimerasi, 20 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 1,6 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs e 5 µl di DNA pre-amplificato diluito 1:30. La reazione di amplificazione PCR ha previsto 1 ciclo di 94 °C per 30s, 65 °C per 30s, 72 °C per 60s, 12 cicli di tipo *touch-down* con decremento della temperatura di *annealing* di 0.6 °C per ciclo, e 23 cicli a 94 °C per 30s, 56 °C per 60s e 72 °C per 60s. Il prodotto della reazione d'amplificazione è stato diluito con un fattore di diluizione 1:5 e miscelato con il *GeneScan 500 ROX Size Standard* (Applied Biosystem). Complessivamente, le amplificazioni selettive sono state condotte con cinque combinazioni di primer *EcoRI* e *MseI*: E-ACT/M-CAT; E-ACT/M-CTT; E-AGC/M-CTT; E-AGC/M-CTA e E-AGC/M-CTG. I profili AFLP sono stati analizzati tramite elettroforesi capillare con *Genetic Analyzer 3130* (Applied Biosystems) utilizzando il programma *Gene Mapper* versione 4.0 (Applied Biosystems).

Analisi dei dati

Tutte le varietà che hanno mostrato un unico allele SSR amplificato sono state considerate omozigoti per il *locus* corrispondente. Per ogni microsatellite sono stati individuati il numero di alleli effettivi, l'eterozigosità e il potere di discriminazione. In particolare, l'eterozigosità (H) è stata calcolata mediante la formula Neis ⁴:

$$H = n * (n - 1) * (1 - \sum P_i^2)$$

dove P_i è la frequenza dell'allele i e n è il numero di

TABELLA I. — *Marcatore molecolari SSR selezionati. Per ogni marcatore sono stati riportati i rispettivi codici identificativi, i motivi ripetuti, la sequenza e la dimensione allelica in paia di basi del marcatore e la localizzazione cromosomica.*

Locus SSR	Motivo ripetuto	Sequenza primer (5'→3')	Dimensione allelica (bp)	Cromosoma
STM1053	(TA) ₄ (ATC) ₅	FW_TCTCCCCATCTTAATGTTTC RV_CAACACAGCATAACAGATCATC	170-196	III
STM1052	(AT) ₁₄ GT (AT) ₄ (GT) ₆	FW_CAATTCGTTTTTTCATGTGACAC RV_ATGGCGTAATTGATTTAATACGTAA	214-263	IX
STM1106	(ATT) ₁₃	FW_TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG RV_ATGCGAATCTACTCGTCATGG	145-211	X
STM5114	(ACC) ₇	FW_AATGGCTCTCTGTATGCT RV_GCTGTCCCAACTATCTTTGA	297-322	II
STM5127	(TCT) ₅	FW_TCAAGAATAGGCAAAACCA RV_CTTTTCTGACTGAGTTGCCTC	248-291	I
STG0001	(CT) ₁₀	FW_CAGCCAACATTTGTACCCCT RV_ACCCCCACTTGCCATATTTT	137-163	XI
STI0012	(ATT) _n	FW_GAAGCGACTTCCAAAATCAGA RV_AAAGGGAGGAATAGAAACCAAAA	183-234	IV
STI0032	(GGA) _n	FW_TGGGAAGAATCCTGAAATGG RV_TGCTCTACCAATTAACGGCA	127-148	V

alleli. Il potere di discriminazione (PD) per ogni *locus* è stato calcolato mediante la seguente formula:

$$PD=1-\sum P_i^2$$

dove P_i è la frequenza del genotipo i . I dati ottenuti dalla lettura dei profili elettroforetici sono stati immessi in una matrice binaria riportante per ciascun campione, l'assenza (0) e la presenza (1) dell'allele. Per la valutazione della distanza genetica è stato utilizzato il coefficiente di Dice. La matrice di similarità è stata analizzata con il metodo UPGMA (*Unweighted Paired Group Method with Arithmetic mean*) mediante il software NTSYS-PC⁵ e il dendrogramma corrispondente. Al fine di effettuare un'analisi esaustiva delle relazioni tassonomiche riscontrate tra le varietà esaminate è stata utilizzata la banca dati dei pedigree di patata della Wageningen University & Research (<http://www.plantbreeding.wur.nl/potatopedigree/>). I dati ottenuti dalla lettura dei profili elettroforetici AFLP sono stati immessi in una matrice binaria riportante nei diversi campioni, l'assenza (0) e la presenza (1) dei frammenti. La similarità tra i generici individui i e j , è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$SM_{ij}=(a+d)/(a+b+c+d)$$

in cui a è il numero di bande presenti in entrambi gli individui, b è il numero di bande presenti in i ed assenti in j , c è il numero di bande presenti in j ed assenti in i , d indica il numero di bande assenti sia in i che in j ⁶.

Risultati

Il *fingerprinting* molecolare è stato condotto mediante un set di otto microsatelliti di patata, che han-

no mostrato polimorfismo in tutti i *loci* considerati. In totale sono stati analizzati 40 alleli, con una media di $5\pm 1,03$ alleli per *locus* e $2,3\pm 0,55$ (media±errore standard) per varietà. Due alleli (172 bp e 298 bp ai *loci* STM1053 e STM5114, rispettivamente) sono stati riscontrati in tutte le ventidue varietà analizzate, altri due (132 e 190 bp ai *loci* STG0001 e STI0012) in due varietà, (Sieglinde e Spunta, rispettivamente) e i restanti trentasei alleli hanno mostrato un livello di polimorfismo variabile. In particolare, il *locus* che ha presentato il minor numero di alleli polimorfici (due) è stato STM1053, mentre quello che ne ha presentati di più (otto) è stato STG0001. La dimensione dei microsatelliti amplificati è stata compresa tra 107 bp (STI0032) e 298 bp (STM5114). Il valore medio dell'eterozigosità è stato $0,81\pm 0,07$, con il valore più basso (0,35) del *locus* STM1053 e il più alto (0,99) dei *loci* STM1106 e STM1052. Il PD è stato molto alto ($\geq 0,95$) in tutti i *loci* considerati, a rilevare un'alta capacità discriminante complessiva per l'intero set di *loci* SSR saggiati (Tabella II). Il numero totale di polimorfismi SSR osservati in ciascuna varietà analizzata è mostrato in Tabella III. Il numero di alleli identificati è variato da 15 (Bartina) a 22 (Agria) con una media di $18,4\pm 0,96$ per varietà. I gruppi di alleli amplificati in ciascuna varietà mediante le otto coppie di primer SSR sono stati classificati in tipologie di profili, indicate con le lettere dell'alfabeto latino (Tabella III): ai *loci* aventi alleli identici, è stata assegnata la stessa lettera. Tale sistema di classificazione ha permesso di individuare le coppie di *primer* in grado di discriminare univocamente una varietà dalle restanti grazie al suo specifico profilo allelico. Al *locus* STG001 sono stati osservati quindici profili (A-O), tredici in STI0012 (A-M), dodici

TABELLA II. — Risultati delle analisi di otto loci microsatelliti di patata su 22 varietà di patata. Per ciascun locus sono riportati le temperature ottimali di annealing (T_a), il numero, la dimensione e la frequenza assoluta degli alleli, il numero di alleli polimorfici e i valori di eterozigosità (He) e del potere di discriminazione (PD).

Locus SSR	T_a (°C)	Alleli, no.	Alleli polimorfici, no.	Alleli in bp (frequenza assoluta)	He	PD
STM1053	55	2	1	169 (7), 172 (22)	0,36	0,95
STM1052	57	3	3	210 (17), 219 (7), 228 (14)	0,99	0,95
STM1106	56	4	4	137 (4), 141 (7), 154 (2), 157 (16)	0,99	0,95
STM5114	53	5	4	284 (3), 286 (10), 289 (17), 292 (7), 298 (22)	0,73	0,95
STM5127	55	6	6	241 (19), 244 (20), 250 (2), 253 (4), 271 (8), 274 (9)	0,76	0,95
STG0001	55	8	8	120 (6), 125 (3), 127 (11), 129 (5), 132 (1), 135 (14), 139 (12), 143 (18)	0,98	0,96
STI0012	58	7	7	165 (7), 168 (18), 171 (16), 174 (8), 184 (12), 187 (3), 190 (1)	0,98	0,95
STI0032	54	5	5	107 (13), 110 (6), 116 (3), 119 (17), 122 (15)	0,74	0,95

TABELLA III. — Schema riassuntivo della dimensione degli alleli (in paia di basi) identificati mediante l'analisi di otto loci SSR in 22 varietà di patata precoce. Per ciascun locus è riportata la tipologia di profilo (Pr.) allelico (A-O) osservata. Dettagli in materiali e metodi.

Varietà	Locus																Alleli no.
	STI0032	Pr.	STM1053	Pr.	STM5127	Pr.	STM5114	Pr.	STG0001	Pr.	STI0012	Pr.	STM1052	Pr.	STM1106	Pr.	
Agata	107, 119	F	169, 172	B	241, 244, 271	C	289, 292, 298	J	129, 139, 143	O	165, 168, 171, 174	M	210	C	141	C	19
Agria	107, 116, 119, 122	K	169, 172	B	241, 244	A	286, 289, 298	E	127, 139, 143	L	165, 168, 171, 184	L	210, 219, 228	E	157	A	22
Antea	107, 119	F	172	A	241, 244, 271	C	289, 298	C	127, 139, 143	L	168, 171, 174	F	210, 219	F	154, 157	F	18
Arinda	107, 119, 122	C	172	A	241, 244	A	286, 289, 298	E	120, 125, 135	N	168, 174	I	210, 219	F	157	A	17
Arrow	110, 119, 122	H	172	A	241, 244, 253	H	289, 298	C	135, 139, 143	I	168, 171, 184	H	210, 228	B	157	A	18
Asterix	107, 119	F	172	A	241, 244, 271	C	286, 298	F	127, 135, 139, 143	F	165, 168, 171	G	210	C	137, 141	D	18
Badia	116, 119, 122	L	172	A	241, 244, 274	B	286, 289, 298	E	127, 139, 143	L	168, 171, 174, 184	L	228	D	157	A	19
Bartina	116, 122	D	172	A	241, 244, 274	B	289, 298	C	120, 135, 139	D	171, 174	B	210	C	157	A	15
Dayana	119, 122	E	172	A	241, 244, 271	C	284, 298	D	129, 135, 143	A	171, 174, 187	D	210, 228	B	157	A	17
Elfe	107, 110, 119, 122	A	172	A	241, 244	A	286, 292, 298	A	129, 135, 143	A	168, 184, 187	A	219, 228	A	157	A	19
Elvira	107, 110	J	172	A	241, 250	K	292, 298	H	120, 135, 139	D	168, 171, 184	H	210, 228	B	157	A	16
Frisia	107, 119, 122	C	169, 172	B	241, 244	A	289, 298	C	120, 127, 135, 143	K	165, 171, 184	K	210, 228	B	157	A	19
Inova	107, 119	F	172	A	241, 244, 250, 274	L	289, 292, 298	J	120, 127, 135, 143	K	165, 168, 171	G	210	C	157	A	19
Liseta	107, 119	F	169, 172	B	241, 244	A	284, 289, 298	I	135, 143	M	168, 171, 184	H	210, 228	B	137, 141, 157	G	19
Marabel	107, 119, 122	C	172	A	241, 244	A	286, 292, 298	A	125, 127, 139, 143	C	168, 184, 187	A	219, 228	A	157	A	19
Primura	119, 122	E	172	A	244, 271, 274	E	286, 289, 298	E	129, 135, 143	A	168, 171, 174	F	210	C	141	C	17
Sieglinde	107	I	172	A	241, 253, 271, 274	I	286, 289, 298	E	127, 132, 143	J	168, 171, 184	H	210, 228	B	137, 141	D	19
Spunta	110, 119, 122	H	169, 172	B	241, 244, 274	J	289, 298	C	127, 135, 143	H	165, 184, 190	J	210, 219, 228	E	157	A	20
Terragold	107, 119, 122	C	172	A	241, 244, 253, 271	D	286, 289, 298	E	129, 135, 139	E	165, 168, 174	E	210	C	157	A	19
Veronie	122	G	169, 172	B	244, 253, 274	G	286, 289, 292, 298	G	127, 135, 143	H	168, 184	I	228	D	137, 141	D	18
Vivaldi	110, 122	B	169, 172	B	241, 244, 274	B	284, 289, 292, 298	B	139, 143	B	168, 171	B	210, 228	B	141, 157	B	19
Volumia	119, 122	E	172	A	241, 244, 271, 274	F	289, 298	C	120, 125, 139, 143	G	168, 171, 184	H	219, 228	A	154	E	19

in STI0032 e STM5127 (A-L), nove in ST5114 (A-J), sette in STM1106 (A-G), sei in STM1052 (A-F) e due in STM1053. Mediamente il numero di profili per locus è stato 9,5, mentre il numero di profili per varietà è stato inferiore a 0,5 (dati non mostrati). Dal confronto dei profili allelici è risultato che il numero minimo di loci necessario per distinguere le ventidue varietà analizzate è cinque (STI0032, STG0001, STI0012, STM5127 e STM1106). Per valutare le relazioni esistenti tra i campioni in base alla loro distanza genetica, i dati generati dall'analisi SSR sono

sottoposti ad analisi *cluster* ed è stato prodotto un dendrogramma. La topologia ha indicato la presenza di gruppi di genotipi con elevata similarità genetica. Nel dendrogramma mostrato in figura 1, è stato possibile distinguere due *cluster* principali: il *Cluster* I, che comprende le varietà Veronie e Sieglinde, e il *Cluster* II, che raggruppa tutte le altre varietà e a sua volta costituito da due sotto-gruppi, dei quali uno comprende le varietà Bartina, Terragold, Arinda, Dayana, Primura, Asterix, Agata e Antea e l'altro Elfe, Marabel, Agria, Badia Volumia, Vivaldi, Arrow,

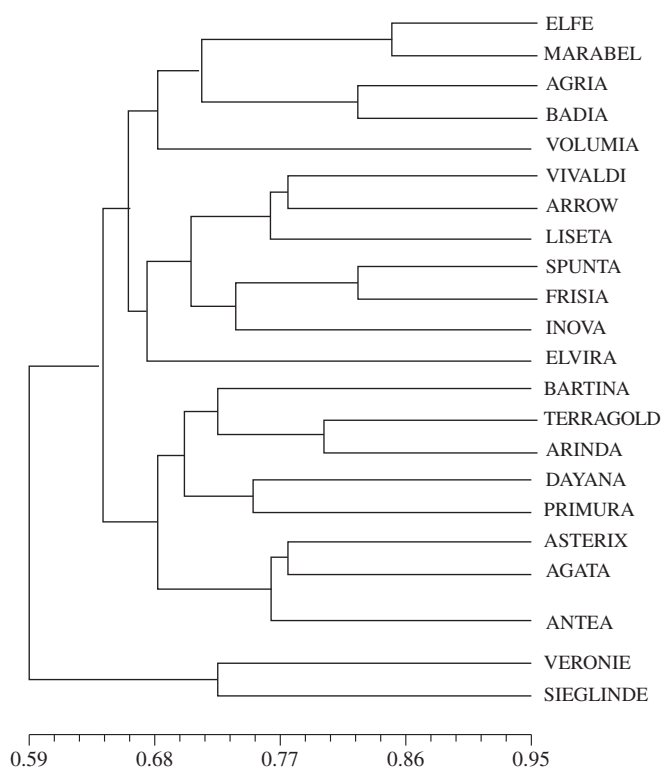


Figura 1. — Dendrogramma costruito per le 22 varietà di patata precoce analizzate mediante otto marcatori SSR.

Liseta, Spunta, Frisia, Inova e Elvira. Tramite le analisi del pedigree è stato possibile caratterizzare ogni varietà identificando progenitori in comune presenti tra le varietà coltivate. Nel primo *cluster* le due varietà Veronie e Sieglinde presentano un unico progenitore in comune (Juli), e molti più progenitori

comuni con le altre varietà appartenenti al secondo cluster. Nel primo sotto-gruppo del *cluster 2*, invece, non sono state evidenziate correlazioni genealogiche tranne che per Arinda, presente nel pedigree di Primura come parentale. Nel secondo sotto-gruppo, invece, sono stati individuati parentali in comune tra Elfe e Marabel (Hansa) e tutti gli altri componenti presentano molti progenitori in comune, tra cui i più frequenti sono Saskia e Katahdin; le uniche varietà che non si correlano al resto del gruppo sono Agria e Badia.

Per quanto concerne l'analisi AFLP, è stato eseguito lo studio dei profili elettroforetici e il confronto degli elettroferogrammi per tutte le combinazioni di *primer* selettivi. Per ognuna di essa sono stati individuati gli alleli totali amplificati, il cui numero è variato da 61 (E-ACT/M-CAG) a 81 (E-ACT/M-CAT) e il numero di alleli polimorfici, variabile tra 26 (E-ACT/M-CAG) e 41 (E-ACT/M-CAT) (Tabella IV). L'analisi dei frammenti polimorfici ha permesso di identificare marcatori specifici per ognuna delle quattro varietà analizzate: nel particolare, 34 frammenti specifici consentono di discriminare Sieglinde, 23 Spunta, 15 Elvira e 11 Agria.

Discussione

Il rispetto della normativa europea sull'etichettatura degli alimenti richiede che sia accertata l'identità dei prodotti al fine di prevenire casi di frodi dovute alla sostituzione di una parte del prodotto con un altro di diversa origine. Tra i metodi analitici usati per l'autenticazione di specie animali o vegetali in prodotti alimentari, quelli basati sull'analisi del DNA hanno il vantaggio di essere sicuri e rapidi nell'accertamento

TABELLA IV. — Risultati dell'analisi mediante marcatori AFLP su quattro varietà di patata precoce. Per ciascuna combinazione di *primer* sono riportati il numero di frammenti totali, il numero e la percentuale dei frammenti polimorfici e il numero di frammenti specifici per ciascuna varietà analizzata.

Combinazione di primer	Frammenti totali, no.	Frammenti polimorfici, no (%)	Frammenti specifici, no.			
			SIEGLINDE	SPUNTA	ELVIRA	AGRIA
E-ACT/M-CTT	77	39 (50,6)	7	1	4	0
E-ACT/M-CTG	74	37 (50)	5	4	3	1
E-ACT/M-CAT	81	41 (50,6)	5	7	2	1
E-ACT/M-CAC	62	29 (46,8)	6	6	0	0
E-ACT/M-CAG	61	26 (42,6)	7	2	1	6
E-AGC/M-CTG	64	28 (43,7)	4	3	5	3
Totale	419	200 (47,7)	34	23	15	11

dell'identità genetica. Nell'ambito della tracciabilità genetica dei materiali vegetali nella filiera agro-alimentare, tra i marcatori maggiormente impiegati figurano gli AFLP e gli SSR. Gli AFLP sono stati utilizzati per l'autenticazione di molte specie vegetali tra cui *Brassica*⁷, olivo⁸, carciofo⁹ e di materie prime di origine animale spesso utilizzate per l'adulterazione di prodotti alimentari¹⁰. I microsatelliti, invece, sono stati applicati per la caratterizzazione varietale di altre specie vegetali come la vite¹¹, il noce¹² e il pomodoro¹³. In ambito forense la genotipizzazione attraverso l'utilizzo di marcatori microsatelliti è ormai una prassi comune e ampiamente riconosciuta. In patata, diversi tipi di marcatori molecolari sono stati usati al fine di esaminare la diversità genetica o semplicemente per il *fingerprinting* varietale. Tra i tanti si annoverano gli RFLP¹⁴, i RAPD¹⁵, gli AFLP^{16,17} e gli I-SSR¹⁸. I marcatori molecolari utilizzati in questo lavoro sono stati scelti tra quelli ritenuti più affidabili per la caratterizzazione e l'identificazione delle cultivar, analizzabili con grande precisione mediante tecniche semi-automatizzate e in grado di produrre risultati affidabili e ripetibili nel tempo. I microsatelliti, in particolare, sono marcatori d'elezione per la tracciabilità genetica dei materiali vegetali nelle filiere agro-alimentari, grazie alla loro capacità di amplificare corti DNA-stampo, un requisito fondamentale per l'analisi del DNA estratto da matrici alimentari.

Più di 200 SSR sono stati identificati partendo da sequenze nucleotidiche di patata contenenti motivi ripetuti. Milbourne *et al.*¹⁹ hanno sviluppato 112 marcatori SSR, la cui validazione su un set di sei genotipi di patata, ha permesso di selezionarne 98 altamente polimorfici. Feingold *et al.*²⁰, invece, hanno individuato 94 microsatelliti, 61 utilizzati per il mappaggio e 30 per la caratterizzazione genetica di 30 cultivar di patate. Con la pubblicazione del genoma completo di patata²¹, il numero di sequenze contenenti motivi ripetuti è aumentato enormemente. L'ultimo riepilogo delle statistiche SSR del *Solanaceae Genome Resource* (<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/analyses/ssr/summary>) documenta 10.000 sequenze con più di 16.000 SSR potenzialmente utili (ripetizioni di 2-6 nucleotidi) per lo studio della diversità genetica in patata. Tuttavia, questi SSR sono molto diversi in termini di qualità, posizione sul genoma e capacità di discriminazione. Recentemente, Ghislain *et al.*²² hanno descritto un nuovo "Kit per l'accertamento dell'identità genetica di patata" costituito da 24 marcatori SSR in grado

di discriminare il 94% delle varietà sud americane (oltre 700). Tale kit è particolarmente utile per standardizzare la selezione di SSR e per l'assegnazione delle dimensioni ai microsatelliti, permettendo, in tal modo, l'analisi comparativa di dati generati in modo indipendente. Nel presente studio abbiamo usato 8 dei 24 marcatori SSR messi a punto da Ghislain *et al.*²², identificando profili allelici varietà-specifici utili per la loro autenticazione genetica. I valori elevati di eterozigotità riscontrati e il numero medio di alleli per *locus* hanno dimostrato che il set di marcatori testato risulta estremamente efficiente nel distinguere la collezione di varietà esaminate. Valori simili sono stati riportati in letteratura da altri autori. In particolare, Milbourne *et al.*²³, in un lavoro di caratterizzazione molecolare di 16 varietà di patata mediante 17 SSR, hanno riportato un numero medio di alleli per *locus* di 5,7. Ghislain *et al.*²², invece, hanno evidenziato 6,8 alleli per *locus*, in media, in un campione più ampio di genotipi (30 varietà di patata proveniente dal Sud America). Ruiz de Gallatera *et al.*²⁴, infine, hanno calcolato un numero medio di alleli per *locus* più basso (3,24) in 19 ecotipi spagnoli di patata. L'oscillazione di tali valori è da ricondurre certamente alla base genetica delle varietà messe a confronto e alla capacità discriminante dei *loci* saggiati. Quest'ultima, che è una misura della capacità informativa di un marcatore, nel presente studio si è attestato su valori molto alti, non scendendo mai al di sotto di 0,95. Tali valori si avvicinano a quelli riportati in letteratura, ove alcuni esempi simili riportano i valori del potere di discriminazione oscillanti tra 0,64 e 0,97²⁵, da 0,79 a 0,91²⁶.

Gli AFLP, ancora oggi, sono i marcatori molecolari più utilizzati per il *fingerprinting* e il *genotyping* molecolare nelle piante superiori. L'elevato grado di polimorfismo che tali marcatori sono in grado di rilevare e la loro elevata riproducibilità, rendono gli AFLP uno strumento valido per l'autenticazione varietale non solo in patata. Meneghetti *et al.*²⁷, ad esempio, tramite l'uso di AFLP sono riusciti a distinguere 132 accessioni di 3 differenti cultivar di vite (Malvasia nera di Brindisi/Lecce, Negroamaro e Primitivo) e a correlare le loro origini geografiche alle differenze genetiche. In questa ricerca, mediante le analisi AFLP sono state esaminate quattro varietà di patata, scelte perché rappresentative della coltivazione extra-stagionale in Puglia, Sicilia e Campania. Le combinazioni AFLP utilizzate si sono rivelate efficienti e hanno permesso di individuare alleli polimorfici specifici in tutte le varietà prese in esame. La

creazione di marchi di qualità e la messa a punto di nuove tecniche genomiche per la caratterizzazione varietale possono essere uno strumento indispensabile per proteggere la tipicità dei prodotti alimentari. In tale contesto, la tracciabilità genetica consente di controllare un determinato materiale vegetale in tutta la sua filiera di produzione. Le indagini molecolari condotte sul pomodoro S. Marzano, sull'IGP Melanurca Campana, sull'Olio DOP di Collina di Brindisi, sul DOP Pane di Altamura²⁸ e sull'IGP Patata della Sila sono casi studio di tracciabilità molecolare di prodotti a denominazione d'origine. Questi sono solo una parte dei 142 prodotti italiani a Denominazione di Origine Protetta e degli 84 prodotti italiani ad Indicazione Geografica Protetta.

Conclusioni

In questa ricerca è stato possibile sviluppare marcatori molecolari SSR e AFLP specifici di varietà di patata precoce, confermando la validità degli strumenti genomici nell'autenticazione varietale. Gli alleli SSR e AFLP potranno essere registrati in un *database* di marcatori molecolari per permettere lo sviluppo d'informazioni cumulative sul *fingerprinting* varietale in patata. I risultati ottenuti, inoltre, saranno un utile strumento per la certificazione genetica e la tracciabilità molecolare dei prodotti alimentari derivati dalla lavorazione della patata.

Bibliografia

- Luykx DMAM, van Ruth SM. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chem* 2008;107:897-911.
- Aversano R, Carputo D, Frusciante L. La patata. Bologna: Edizioni Script; 2011.
- Wulff EG, Torres S, Vigil EG. Protocol for DNA extraction from potato tubers. *Plant Mol Biol Rep.* 2002;20:187a-187e.
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* 1978;89:583-90.
- Rolf FJ. NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.50. Exeter Publ Ltd. New York; 1989.
- Sneath PHA, Sokal RR. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman; 1973. p. 573.
- Li MT, Li ZY, Zhang CY, Qian W, Meng JL. Reproduction and cytogenetic characterization of interspecific hybrids derived from cross between *Brassica carinata* and *B. rapa*. *Theor Appl Genet* 2005;110:1284-9.
- Pafundo S, Agrimonti C, Marmioli N. Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms. *J Agr Food Chem* 2005;53:6995-7002.
- Mauro R, Portis E, Acquadro A, Lombardo S, Mauromicale G, Lanteri S. Genetic diversity of globe artichoke landraces from Sicilian small-holdings: implications for evolution and domestication of the species. *Conserv Genet* 2009;10:431-40.
- Zhang J, Zhang X, Dediu L, Victor C. Review of the current application of fingerprinting allowing detection of food adulteration and fraud in China. *Food Control* 2011;22:1126-35.
- Salmaso M, Valle RD, Lucchin M. Genepool variation and phylogenetic relationships of fan indigenous north-east Italian grapevine collection revealed by nuclear and chloroplast SSRs. *Genome.* 2008;51:838-55.
- Foroni I, Rao R, Woeste K. Characterization of *Juglans regia* L through SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the 'Sorrento landrace'. *J Hort Sci Biotech* 2005;80:49-53.
- Caramante M, Rao R, Monti LM, Corrado G. Discrimination of 'San Marzano' accessions: A comparison of minisatellite, CAPS and SSR markers in relation to morphological traits. *Sci Horticult* 2009;120:560-4.
- Akkaya MS, Bhanawat AA, Cregan PB. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 1992;132:1131-9.
- Ghislain M, Zhang D, Fajardo D, Huamán Z, Hijmans R. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. *Genet Resour Crop Ev* 1999;46:547-55.
- Kim JH, Joung H, Kim HY, Lim YP. Estimation of genetic variation and relationship in potato (*Solanum Tuberosum* L.) cultivars using AFLP markers. *Amer J of Potato Res* 1998;75:107-12.
- Spooner DM, Núñez J, Rodríguez F, Naik PS, Ghislain M. Nuclear and chloroplast DNA reassessment of the origin of Indian potato varieties and its implications for the origin of the early European potato. *Theor Appl Genet* 2005;110:1020-6.
- Bornet B, Branchard M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol Biol Rep* 2001;19:209-15.
- Milbourne D, Meyer R, Collins AJ, Ramsay LD, Gebhardt C, Waugh R. Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat *loci* in potato. *Mol Gen Genet* 1998;259:233-45.
- Feingold S, Lloyd J, Norero N, Bonierbale M, Lorenzen J. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor Appl Genet* 2005;111:456-66.
- Potato Genome Sequencing Consortium. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. To insert individual citation into a bibliography in a word-processor, select your preferred citation style below and drag-and-drop it into the document. *Nature* 2011;475:189-95.
- Ghislain M, Núñez J, del Rosario Herrera M, Pignataro J, Guzman F, Bonierbale M *et al.* Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Mol Breed* 2009;23:377-88.
- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird E, Bonar N, Provan J *et al.* Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol Breed* 1997;3:127-36.
- Ruiz de Galarreta JI, Barandalla L, Lorenzo R, Gonzalez J, Rios DJ, Ritter E. Microsatellite variation in potato landraces from island of La Palma. *J Agric Res* 2007;5:186-92.
- Reid A, Kerr EM. A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method for potato cultivars. *Plant Genet Res.* 2007;5:7-13.
- Moisan-Thiert M, Marhadour S, Kerlan MC, Dessenne N, Peramant M, Gokelaere T *et al.* Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR). *Potato Res* 2005;48:191-200.
- Meneghetti S, Costacurta A, Morreale G, Calò A. Study of Intra-Varietal Genetic Variability in Grapevine Cultivars by PCR-Derived Molecular Markers and Correlations with the Geographic Origins. *Mol Biotechnol* 2012;50:72-85.
- Rao R, Caramante M, Blanco A, Lanteri S, Lucchin M, Mazzucato A. Innovazioni genetiche per l'identificazione e la protezione di prodotti tipici italiani. *Ital J Agron* 2009;3:93-9.