



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

FACOLTA' DI AGRARIA

DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE AGRARIE

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE
IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE**

Caratterizzazione genetica di genotipi di *Beta vulgaris* L. con marcatori molecolari SCAR e SNP

RELATORE : Prof. MASSIMO SACCOMANI

CORRELATORI: Dr. ENRICO BIANCARDI (CRA-CIN, Rovigo)

Dr. PIERGIORGIO STEVANATO

LAUREANDO : FABIO STELLIN

Matricola n. 382243 AG

ANNO ACCADEMICO 2009 – 2010

INDICE

	Pag.	
1	RIASSUNTO	3
2	INTRODUZIONE	5
2.1	Premessa	5
2.2	Le origini della resistenza alla rizomania	6
2.3	La scoperta del primo tipo di resistenza	9
2.4	Verso i primi risultati significativi	11
2.5	Le origini della resistenza “tipo Holly”	13
2.6	Probabile origine delle resistenze	16
2.7	Fisiologia ed ereditabilità delle resistenze	19
2.8	Analisi molecolare delle diverse fonti di resistenza	21
2.9	Selezione assistita da marcatori molecolari	22
3	SCOPO DEL LAVORO	25
4	MATERIALI E METODI	26
4.1	Materiale vegetale	26
4.2	Estrazione DNA	26
4.3	Amplificazione dei marcatori SCAR mediante PCR	27
4.4	Elettroforesi su gel di agarosio	28
4.5	Saggio SNP	28
4.6	Progettazione Primer e Sonde	29
4.7	Preparazione Oligomix	30
4.8	Real Time-PCR ‘STEP ONE’	31
4.9	Lettura in “Allelic Discrimination”	35
5	RISULTATI E DISCUSSIONE	37
5.1	Messa a punto analisi marcatori SCAR_1 e SCAR_2	37
5.2	Messa a punto analisi SNP_1	38
5.3	Analisi comparativa marcatori SCAR e SNP	40
6	BIBLIOGRAFIA	44

1 Riassunto

La produttività della barbabietola da zucchero in Italia è fortemente limitata da condizioni di stress biotico e abiotico ed è tuttora del 40% inferiore alla media produttiva europea. E' pertanto prioritario l'impiego di fonti di resistenza genetica agli stress ambientali, da utilizzare nel miglioramento genetico. Il lavoro di tesi ha avuto come obiettivo l'individuazione di marcatori molecolari associati alla resistenza alla rizomania da utilizzare nei programmi di selezione assistita. A tal fine è stata effettuata, su due genotipi di barbabietola, rispettivamente resistenti e suscettibili alla rizomania, l'analisi comparativa di tre marcatori molecolari (SCAR_1, SCAR_2 e SNP_1) che mappano sul locus Rz1. L'analisi di associazione tra il fenotipo e i marcatori molecolari, ha permesso l'identificazione di una stretta correlazione fra la manifestazione fenotipica della resistenza alla rizomania e una variante allelica dello SNP_1. Pertanto, questo marcatore molecolare potrà essere utilizzato nella selezione assistita per produrre linee parentali e ibridi di barbabietola altamente produttivi in terreno infetto da rizomania.

Parole chiave: barbabietola, marcatori molecolari, rizomania

Abstract

The productivity of sugar beet in Italy is strongly limited by biotic and abiotic stress conditions and is still 40% lower than the average European yield. The use of sources of genetic resistance to these stresses it is a priority for the sugar beet genetic improvement. The aim of this work was to develop molecular markers linked to rhizomania resistance to be used in marker assisted breeding programmes. To achieve this aim, four molecular markers (SCAR_1, SCAR_2 e SNP_1) mapping on the Rz1 locus have been tested on two sugar beet genotypes, respectively characterized by resistance and susceptibility to rhizomania. The analysis of association between the phenotype and molecular markers, has allowed the identification of a strict relationship between the rhizomania resistance and one allelic variant of the SNP_1. Therefore, this marker might be used in marker assisted selection to produce superior sugar beet parental lines and hybrids.

Key words: sugar beet, molecular markers, rhizomania

2 INTRODUZIONE

2.1 Premessa

La coltura della barbabietola da zucchero nel nostro paese interessa una superficie di circa 70 mila ettari. L'area più importante, circa 40 mila ettari, è situata al Nord dove sono attivi tre dei quattro zuccherifici rimasti dopo la riforma comunitaria del 2007. Al Centro-Sud è presente l'impianto di Termoli. La produzione nazionale è pari a 500 mila tonnellate a fronte di un fabbisogno interno di 1,6 milioni di tonnellate. La produttività della barbabietola da zucchero in Italia è fortemente limitata da condizioni di stress biotico e abiotico ed è tuttora del 40% inferiore alla media produttiva europea. Fra gli stress biotici, la rizomania della barbabietola è una delle principali limitazioni alla produttività della coltura. In Italia, i dati disponibili indicano una diffusione sul 60% dei terreni coltivati, con una minore presenza al Centro e nel Meridione. La malattia è causata dal virus BNYVV (Beet Necrotic Yellow Vein Virus), trasmesso dal fungo *Polymyxa betae*. I danni alla produzione di saccarosio sono ingenti e possono causare fino al 100% di perdita del raccolto (Biancardi et al., 2002). L'introggressione e il miglioramento della resistenza genetica alla rizomania nelle attuali varietà coltivate è considerato uno dei presupposti fondamentali per l'aumento della competitività della bieticoltura nazionale. Questo sarà possibile adottando metodi innovativi di selezione assistita da marcatori molecolari che, rispetto alle metodologie tradizionali, consentono una maggiore rapidità e precisione dei programmi di selezione.

2.2 Le origini della resistenza alla rizomania

Il termine rizomania è formato dalle parole latine "rhizo" e "mania", a loro volta derivate dal greco "ρίζα" e "μανία", che significano rispettivamente radice e tendenza anormale. La parola composta indica pertanto uno sviluppo anormale delle radici, inteso sia come sede di comparsa sia come intensità (Lindley e Moore, 1866; Canova, 1980).



Figura 1. Fittone di barbabietola da zucchero con grave infezione di rizomania.

La manifestazione, comune anche in altre piante, può avere origine da cause abiotiche o da attacchi di parassiti come virus, batteri, micoplasmi, funghi, nematodi ecc. (Canova, 1958, 1980).

Per quanto riguarda la barbabietola, il termine rizomania sembra sia stato utilizzato per la prima volta da Munerati e Zapparoli, 1915, nel descrivere una pianta di *Beta vulgaris* L. subsp. *maritima* L.(Arcang.), qui di seguito indicata come bietola marittima, che presentava un abbondante sviluppo del capillizio radicale.

Il termine è stato utilizzato per altre piante (vite, edera, lauro ecc.) dal Lindley and Moore's Treasury of Botany, 1866, ma ignorato sia dal Jackson's Glossary of Botanic Terms, 1916, che dal Dictionary of Botanical Equivalents, scritto da Artschwager e Smiley, 1921. Nel suo voluminoso trattato "Pflanzen Teratologie", Penzig, 1921, descrisse manifestazioni simili (fillomania, petalomania, bastomania ecc.) senza menzionare la rizomania. L'utilizzo o meno della lettera h e della diversa accentuazione (*rhizomània* o rizomanìa) è controverso (Winner, 1984). E' noto che la lettera h della parola "*rhizo*" è stata aggiunta nella derivazione latina, dato che tale lettera non esiste nell'alfabeto greco (Winner, 1984). La parola che include h (come nella versione inglese o francese) è formalmente corretta, se si considera la sua origine latina.

Ma *rhizomània* è un termine generico che indica anomalie in differenti parti di diverse piante, e solo nel 1958 è stata utilizzata la sua forma italiana riferita alla specifica malattia della barbabietola da zucchero (Canova, 1958). Per questo motivo la versione italiana (uguale nel tedesco e nello spagnolo) "rizomanìa", usata da Canova prima e dopo la scoperta degli agenti patogeni, è indubbiamente più corretta (Steudel, 1984; Winner, 1984, 1988).

In Europa, manifestazioni di: I) radicosità eccessiva; II) basso grado polarimetrico; III) scarso sviluppo fogliare dopo periodi d'elevata umidità del terreno, sono stati per lungo tempo imputati a ciò che in Italia si definisce "stanchezza del terreno".

Nel 1946, si osservò in Italia l'espansione di una sindrome sconosciuta, che fu al momento chiamata "fenomeno dei bassi titoli" (Piolanti *et al.*, 1957). Gli stessi autori registrarono nel 1954 l'apparizione dei sintomi sopra elencati, incluse le macchie clorotiche sulle foglie, in differenti località della provincia di Vicenza (Albettone, Longare, Noventa ecc.). Si ritiene che i sintomi citati, confusi spesso con quelli causati dal nematode a cisti *Heterodera schachtii* Schm., siano da considerare

causati dalla rizomania, intesa nel significato attuale del termine (A. Graf, comunicazione personale).

In accordo con Graf, la malattia potrebbe essersi diffusa in buona parte dell'Europa molto prima dell'identificazione del patogeno.

Con l'inizio di ricerche sistematiche svolte dall'Istituto di Patologia Vegetale dell'Università di Bologna, Canova intuì la complessa natura dell'agente patogeno. Negli anni seguenti, Bongiovanni, 1964, segnalò la sporadica presenza di bietole che evidenziavano tali sintomi in molti comprensori delle province di Venezia, Padova, Vicenza, Rovigo, Ferrara, Bologna ecc. Bongiovanni, patologo dell'Associazione Nazionale Bieticoltori, fu così in grado di suggerire le prime misure di profilassi: I) evitare i ristagni d'acqua nel terreno; II) utilizzare varietà italiane con elevato grado polarimetrico; III) effettuare raccolte precoci nei campi infetti; IV) evitare la diffusione della malattia mediante la tara terra.

Ghillini *et al.*, 1965, confermarono l'origine biotica della malattia con l'identificazione di un fungo plasmodioforale implicato nel processo infettivo. Il fungo era simile a *Polymyxa betae*, recentemente classificato da Keskin presso l'Università di Göttingen (Keskin *et al.*, 1962; Keskin, 1964; Ghillini e D'Ambra, 1971).

Le cause della malattia furono finalmente chiarite con l'isolamento del virus coinvolto nella patologia (Canova 1966a, 1966b). Infatti, Canova stabilì che la malattia era dovuta ad un'inusuale simbiosi fungo-virus.

Questa relazione, che assegnava a *Polymyxa betae* la funzione di conservazione, diffusione ed inoculo e al virus quella di reale agente patogeno (moltiplicazione e proliferazione radicale) fu confermata più tardi da altri autori (Alghisi e D'Ambra, 1966; D'Ambra, 1967). Il virus fu in seguito classificato Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) da Tamada e Baba, 1973.

Con l'identificazione degli agenti patogeni e la messa a punto di sistemi immunoenzimatici (ELISA) per l'analisi del virus (Clark e Adams, 1977),

la malattia fu localizzata in molte aree di coltivazione a clima temperato (Asher, 1993).

Negli anni 70, si è assistito ad una rapida espansione della rizomania anche in zone prima considerate immuni, talvolta in singolare e forse non casuale concomitanza con la diffusione delle varietà monogermi genetiche (Savitsky, 1950; Graf, comunicazione personale).

L'ultimo autore riteneva che l'utilizzo della monogermia genetica avesse inizialmente causato un indebolimento delle varietà coltivate nei confronti di molte malattie, tra le quali la cercospora (Skaracis e Biancardi, 2000). Infatti, la semina di genotipi più suscettibili potrebbe avere aggravato situazioni di scarsa nocività della malattia nei confronti delle varietà plurigermi.

Con la conferma della scarsa efficacia dei sistemi tradizionali di difesa (Bongiovanni, 1965; Alghisi e D'Ambra, 1970), apparve chiaro che le speranze di successo potevano basarsi solo sulla ricerca di resistenze genetiche.

2.3 La scoperta del primo tipo di resistenza

Per quanto è dato di sapere, la valutazione di varietà commerciali in campi infetti iniziò nel 1958 (Bongiovanni e Lanzoni, 1964) e fu condotta a Vighizzolo (Padova), Cona e Cavarzere (Venezia). Queste esperienze possono essere considerate la prima prova dell'esistenza di variabilità genetica utile per la resistenza alla rizomania.

Le prime verifiche a pieno campo iniziarono nel 1966 presso la società sementiera Maribo (Gentili e Poggi, 1986) su un campo infetto ad Albaredo d'Adige (Verona). La Maribo utilizzò in prevalenza genotipi d'origine italiana dotati di discrete doti produttive in terreni infetti da BNYVV (Johansson, 1985). Tra i materiali all'epoca più impiegati, si ricorda la varietà plurigerme diploide Alba P, costituita dalla società

Alba di Ponte San Nicolò (Padova). A quel tempo, nella citata società, la selezione individuale era eseguita su bietole coltivate su terreni in rotazione biennale, risultati in seguito infetti da rizomania (Usai, comunicazione personale). E' probabile quindi che per una durata indeterminata sia stata svolta una discretamente efficace, anche se inconscia, selezione massale per la resistenza alla malattia.

Lo stesso tipo di resistenza è stato probabilmente utilizzato nella costituzione delle varietà Monodoro (Hilleshøg) e Ritmo (Maribo), registrate in Italia nel 1979 e 1982 rispettivamente. E' opinione diffusa che anche altre società sementiere europee fecero inizialmente uso di questi genotipi.

Le esperienze presso la Sezione dell'ISCI di Rovigo iniziarono nella primavera 1977, con la semina di famiglie diploidi su un terreno infetto nei pressi di San Pietro in Casale (Bologna). La selezione individuale era svolta sulle radici che sopravvivevano all'inverno, in quanto meno danneggiate dalla malattia. In alcuni casi fu possibile utilizzare altri parametri di selezione come il grado rifrattometrico (Brix).

La conservazione e la riproduzione delle bietole madri fu di difficile attuazione a causa dello sviluppo di marciumi secondari. Perciò fu normalmente impossibile il campionamento della polpa dalle bietole malate per analisi più complete.

L'anno dopo fu individuata la famiglia RO236 dotata di buona resa di zucchero in terreno malato. La famiglia discendeva da selezioni di Munerati ed aveva diverse somiglianze con l'Alba P (buona resistenza alla cercospora, sensibilità alla prefioritura, scarsa produzione di radici). L'analisi della segregazione dei due genotipi fornì risultati simili e dimostrò il carattere quantitativo di questa resistenza, in seguito indicata come "tipo Alba" (Lewellen e Biancardi, 1990; Biancardi, 1999). Selezioni massali furono eseguite su diverse linee monogermi maschiosterili (CMS) e sui relativi mantenitori (O-Type).

La linea CMS MS2-R, ottenuta nel 1983 dopo due cicli di selezioni individuali in presenza della malattia, fu incrociata con l'impollinante RO236, denominato RO401 nel 1981. Nell'anno 1985, l'ibrido RO401 x MS2-R fu provato, assieme ad altri ibridi sperimentali e commerciali, in un terreno sano a Rovigo e in condizioni di rizomania a San Pietro in Casale (Bologna). I risultati furono soddisfacenti e dimostrarono il carattere additivo di questo tipo di resistenza (Biancardi *et al.*, 1988; Lewellen e Biancardi, 1990). Nel 1988, ulteriori miglioramenti permisero il rilascio dell'impollinante RO401, utilizzato per la costituzione di diverse varietà commerciali (Arco, Briosaros, Forum ecc.).

2.4 Verso i primi risultati significativi

Nel 1980, la SES Italiana con sede a Massalombarda (Ravenna) decise di aumentare il proprio impegno nella ricerca di varietà resistenti alla cercospora e alla rizomania, da destinare in primo luogo al mercato interno.

Fu seminato il seguente materiale: I) famiglie caratterizzate da resistenza alla cercospora, derivate da selezioni di Munerati; II) famiglie americane con caratteristiche analoghe e provenienti da stazioni dell'USDA; III) 5 coppie di linee CMS/O-Type equivalenti; IV) varietà commerciali usate in Italia e nel Nord Europa. A parte gli standard, il materiale era tutto diploide per rendere più spedito il programmato ciclo di selezione. La prova fu seminata nella primavera del 1980 in 2 campi situati a San Martino in Argine (Bologna) e a Villa Serraglio (Ravenna). La prova di San Martino in Argine (BO) evidenziò un'infezione di rizomania grave e discretamente omogenea, che permise la selezione degli individui migliori entro le migliori tesi.

Le bietole di 5 famiglie plurigermi, fra cui la 2281, furono scelte sia in base allo sviluppo, al portamento e al colore verde intenso delle foglie,

sia per le radici bene sviluppate e con minori sintomi esterni ed interni della malattia.

Il restante materiale presente nella prova fu quasi completamente distrutto. Le 15-20 madri scelte per ciascuna famiglia, che rappresentavano non più del 3% della popolazione originaria, furono sottoposte a vernalizzazione.

All'inizio del 1981, furono impostati 5 gruppi di fruttificazione in isolamento spaziale, in cui le madri plurigermi fertili di ciascuna selezione ibridarono 2 portaseme maschiosterili (CMS) F1 sensibili alla rizomania ed alla cercospora, ma con buona attitudine combinativa. Furono così ottenuti 10 ibridi.

L'anno seguente fu stipulato un accordo con l'Institut Technique de la Betterave (ITB) di Parigi per valutare gli ibridi in terreni infetti nei pressi di Pithiviers (Loiret). La scelta di eseguire la prova in Francia era soprattutto d'ordine tecnico, poiché la rizomania in quella zona era risultata grave e soprattutto distribuita nei campi in maniera molto omogenea. Altri fattori, forse legati al clima, determinavano la comparsa sulle foglie di una colorazione gialla, bene correlata con la sensibilità alla malattia. L'Istituto francese era inoltre molto interessato nella ricerca di validi rimedi ad un'epidemia, che iniziava a diffondersi rapidamente anche in quel paese.

Nel luglio dell'1982, le osservazioni sui materiali in prova dimostrarono l'ottimo comportamento di alcuni ibridi. I dati di produzione confermarono le osservazioni svolte in Italia sull'ibrido costituito dall'impollinante 2281-R1 e dal CMS suscettibile. Gli altri ibridi sperimentali non superarono i testimoni Alba P e Dimono.

Il seme dell'ibrido 2281-R1, prodotto nel 1982 in quantità maggiore, permise l'anno dopo la semina, sempre da parte dell'ITB, di 3 prove agronomiche, di cui 2 in terreno infetto ed una in terreno sano. Furono inoltre eseguite 2 prove simili in Italia: una in campo malato e l'altra in

campo sano (De Biaggi, 1985). I risultati confermarono la possibilità concreta di combattere la rizomania per via genetica.

Queste esperienze furono considerate molto interessanti dai bieticoltori francesi. Quindi, l'ibrido resistente Rizor, ricavato dall'impollinante 2281-R1, fu subito raccomandato per la coltivazione nelle zone francesi interessate da rizomania. Anche i bieticoltori italiani e l'industria saccarifera mostrarono un grande interesse per questi risultati.

La prima versione del Rizor evidenziava comunque diversi difetti: I) tendenza anomala alla prefioritura; II) qualità tecnologica bassa; III) potenzialità produttiva da migliorare specialmente in terreni sani; IV) insufficiente resistenza alla cercospora.

Nel periodo 1983-1987, la varietà Rizor fu iscritta nei registri ufficiali dei più importanti paesi europei e diede buoni risultati anche in Giappone e negli USA. Il programma di miglioramento della varietà Rizor fu attuato, fino al 1987, con i normali metodi selettivi integrati con l'infezione artificiale delle singole piante e con le analisi ELISA (De Biaggi, 1987). Si cominciò anche ad impiegare la micropropagazione *in vitro* delle piante migliori. Con questi sistemi, nel 1987, la SES ottenne 2 nuove linee impollinanti derivate dalla 2281-R1, che incrociate con CMS sensibili produssero gli ibridi siglati SES-IR2 e SES-IR3, dotati di prestazioni produttive superiori alla versione Rizor originale.

2.5 Le origini della resistenza “tipo Holly”

La rizomania è stata identificata per la prima volta in California nel 1983 (Duffus *et al.*, 1984). Sintomi tipici della malattia sono stati osservati per diversi anni, ma i sintomi furono probabilmente confusi, come in Italia, con quelli del nematode a cisti.

Falk e Duffus, 1977, segnalono per la prima volta la presenza di *P. betae* in California. Sulla base di esperienze europee e giapponesi, i sintomi facevano presumere si trattasse di rizomania.

Nel 1983, in una prova di campo a Salinas, California, dedicata a ricerche sulla resistenza al nematode a cisti *H. schachtii*, si notarono i sintomi fogliari del BNYVV. Foglie e radici furono analizzate nel laboratorio di virologia di Salinas, facendo uso di un antisiero fornito da Tamada e Baba (1973). Fu così identificato il BNYVV.

Le industrie saccarifere furono subito informate. Si sottoposero ad analisi campioni di foglie e di terreno provenienti dalle diverse zone di coltivazione. Le analisi evidenziarono che la rizomania era diffusa nelle zone costiere fino alle località desertiche della California meridionale. I primi casi d'infezione sembravano seguire la direzione dell'acqua di irrigazione e dei venti dominanti. La prima ipotesi fu che il percorso seguisse la successione temporale della raccolta delle bietole. Questa inizia a metà estate dalle zone meridionali della San Joaquin Valley, proseguendo in direzione nord (Sacramento, delta del fiume San Joaquin), spostandosi poi verso sud lungo le valli costiere e nelle zone interne e desertiche della California, dove gli estirpamenti avvengono in dicembre. Un secondo ciclo di raccolte inizia da metà marzo nella parte centrale della valle del San Joaquin e dura fino a giugno. In entrambi gli schemi di raccolta, le bietole sono trasportate negli zuccherifici di Mendota, Manteca, Salinas (Spreckels Sugar), Tracy (Holly Sugar) e Santa Maria (Union Sugar). Evidenze empiriche suggerivano che il BNYVV fosse presente in California da numerosi anni.

Dato che la rizomania era più grave in diverse remote località (valle meridionale di Santa Clara, Paso Robles ecc.) sembrava che il terreno trasportato dalle macchine di raccolta fosse la causa principale di questa diffusione.

Il momento esatto e i siti d'introduzione della rizomania sono sconosciuti.

La ricerca ha evidenziato che il BNYVV individuato in America è identico a quello italiano e di altre nazioni europee (Koenig, 1995).

Come nel caso citato di inconsapevole selezione massale per la resistenza alla rizomania avvenuto in Italia, il programma di miglioramento dell'USDA a Salinas aveva probabilmente prodotto alcune linee resistenti. Ciò può essere avvenuto per la resistenza identificata in alcune linee di Salinas, come Y439 (Y39, C39R), Y547 (Y47, C47R) (Lewellen e Biancardi, 1990; Lewellen, 1985).

A Tracy, la società saccarifera Holly (Holly Hybrids) possiede un centro di miglioramento genetico. Nell'estate del 1983, Erichsen (Lewellen *et al.*, 1987) osservò in una prova varietale che lo sviluppo delle bietole era molto ridotto, ad eccezione di tre ibridi sperimentali. Ciascun ibrido era costituito da diversi impollinanti incrociati con lo stesso CMS monogerme. Fu chiaro che il comportamento dei tre ibridi era dovuto al parentale femminile. Il test ELISA eseguito sui campioni di radici confermò la presenza del BNYVV. Gli ibridi produssero mediamente 70 t/ha di radici, mentre l'ibrido suscettibile USH11 aveva una resa di 12 t/ha (Lewellen *et al.*, 1987).

Nel 1985 e 1986, ibridi sperimentali simili furono valutati a Salinas in presenza di rizomania. A confronto con varietà provenienti dall'Europa e dal Giappone, gli ibridi confermarono l'alto livello di resistenza della linea monogerme Holly. Come nella prova originale condotta a Tracy nel 1983, singole piante degli ibridi Holly segregavano chiaramente in classi di resistenti e suscettibili, suggerendo uno schema di segregazione causato da un singolo gene dominante.

Nel 1986, riselezioni e riproduzioni della linea CMS resistente e del suo O-Type furono vendute alle società sementiere negli USA e in Europa. Successivamente fu stabilito che la resistenza era trasmessa da un singolo allele dominante chiamato *Rz* (Lewellen *et al.*, 1987; Lewellen, 1988).

L'allele *Rz* è ora largamente utilizzato in molti ibridi commerciali in tutto il mondo. Come importanza, diffusione ed impiego, questo carattere è superato solo dalla monogermia genetica.

La coppia CMS/O-Type dotata di resistenza alla rizomania presentava un habitus florale particolare e diversi problemi di qualità del seme. Inoltre, era caratterizzata da scarsa produzione di seme (a causa della depressione da inbreeding) e da bassa tolleranza al gelo. I piantoni seminati per la vernalizzazione nell'Oregon erano spesso persi a causa del freddo. In qualche campo, l'unico seme raccolto era costituito dai fuori tipo e da genotipi suscettibili. Le rese di seme dopo la lavorazione erano molto basse.

Inizialmente i selezionatori temettero che queste caratteristiche negative fossero correlate con la resistenza alla rizomania. Fortunatamente, quest'ipotesi non fu confermata. Ovviamente, i primi ibridi resistenti alla rizomania prodotti con la linea CMS Holly evidenziarono problemi di produzione di seme. Per porre rimedio a tali difetti, i selezionatori avviarono cicli di reincrocio con materiali a diversa base genetica.

L'effetto protettivo della resistenza Alba, in termini di produzione di zucchero, è minore rispetto alle fonti monogenetiche Rizer e Holly. La combinazione di questi meccanismi di resistenza può essere vantaggiosa per arrivare a livelli superiori di protezione al BNYVV (Lewellen e Biancardi, 1990). Questa combinazione di diverse fonti di resistenza sembra essere impiegata nell'ultima generazione di cultivar resistenti alla cercospora e alla rizomania, che producono molto bene anche in condizioni di terreno sano. Comunque, l'effetto eterotico non è chiaramente evidente nelle combinazioni ibride tra le fonti Rizer ed Holly.

2.6 Probabile origine delle resistenze

L'associazione tra la resistenza di tipo Alba e i materiali di Munerati è confermata dalle seguenti evidenze: I) come in altri casi di aziende produttrici di seme di barbabietola, la società Alba Immobiliare, fondata nel 1933, operava principalmente con materiali provenienti da Rovigo, soprattutto prima della seconda guerra mondiale; II) caratteristiche e modelli di segregazione simili al tipo Alba sono stati identificati, come sopra riportato, nel germoplasma costituito da Munerati; III) la varietà Alba P evidenziava un elevato livello di resistenza alla cercospora. Come affermano Skaracis e Biancardi, 2000, questa resistenza deriva da ibridazioni con popolazioni di bietola marittima raccolte da Munerati nei pressi di Porto Levante (Rovigo).

La registrazione della genealogia del pool diploide plurigerme codificato 2281, in cui fu identificato il gene *Rz*, non era completa negli anni dal 1960 al 1975.

Era però convinzione di De Biaggi e dei genetisti della SES che la linea 2281 derivasse da qualche famiglia di Munerati, selezionata per un certo periodo nei centri pubblici e privati negli USA (Lewellen, 1992) e poi acquisita dalla SES Italia nei vari accordi di scambio di materiali genetici. La presunta origine italiana della famiglia 2281 sembra essere confermata dalla lieve resistenza alla cercospora, evidente nella varietà Rizer e soprattutto nel relativo impollinante.

Anche i tentativi di ricostruire la storia del germoplasma fonte della resistenza Holly non hanno avuto successo. Il germoplasma californiano era generalmente dotato di una base genetica ristretta a causa dell'intensa selezione per la resistenza alle malattie e alla prefioritura.

I materiali europei erano superiori per grado polarimetrico, qualità tecnologica, resistenza alla prefioritura e regolarità nella forma della radice.

Derivando da un lungo lavoro di selezione, sono stati utili per migliorare il pool genetico americano. Tali varietà erano state ottenute prima del 1976; molte erano poliploidi o triploidi con citoplasma maschiosterile.

Nel materiale in cui il gene *Rz* fu identificato, piante diploidi fertili e multigermi furono incrociate a coppie con linee O-Type monogermi. Le piante F2 erano poi selezionate per la monogermia e il carattere O-Type. Il lavoro di selezione si svolse a Tracy, California, in condizioni d'isolamento pollinico. La progenie in cui il gene *Rz* fu trovato era autosterile, tuttavia produsse una quantità di seme sufficiente.

All'interno degli incroci iniziali e delle seguenti selezioni per la monogermia e per il carattere O-Type, fu svolto un secondo ciclo di screening. Ogni monogerme O-Type selezionato e il relativo CMS erano moltiplicati separatamente. Le piante ottenute da ciascun CMS, corrispondenti ad un O-Type monogerme, erano incrociate con ciascuno di tre tester multigermi, incluso l'impollinante dell'ibrido commerciale suscettibile HH37.

La prova varietale del 1983 si svolse in terreno poi risultato infetto da rizomania. Quindi, il gene *Rz* doveva derivare da una delle due fonti sopra citate.

La linea CMS fu costituita a Sheridan, Wyoming e a Tracy, California, fu selezionata per la sua elevata produttività e per la resistenza al curly top. La base genetica era complessa e non ne era nota l'origine.

Il programma di miglioramento della Holly Sugar Company era basato sulla valutazione dell'attitudine combinativa di singole piante o di coppie di piante provenienti da un'ampia popolazione di base (Helmerik *et al.*, 1965).

Anche se i parentali monogermi e le altre fonti furono valutati per la resistenza alla rizomania senza risultati, non è da escludere che il gene *Rz* fosse presente con frequenza molto bassa nei materiali monogermi. Data la rarità del gene *Rz* nel germoplasma americano (Lewellen *et al.*,

1987; Lewellen e Biancardi, 1990) molti genetisti ipotizzano che tale gene sia derivato da bietola marittima.

Lavori recenti hanno evidenziato che le resistenze alla cercospora e alla rizomania sono facilmente reperibili in bietola marittima (Lewellen e Whitney, 1993; Lewellen, 2000).

2.7 Fisiologia ed ereditabilità delle resistenze

Il carattere multigenico (additivo) di resistenza nella varietà Alba P sono evidenziati dai modelli di segregazione delle progenie derivate. Sebbene manchino i test di allelismo, è possibile che la resistenza quantitativa sia simile a quella di alcune linee di bietola marittima (Lewellen e Biancardi, 1990). Analizzando il miglioramento ottenuto in 3-4 cicli di selezione ricorrente su differenti genotipi dotati di resistenza di tipo Alba, l'ereditabilità di questo carattere è risultata buona (Lewellen e Biancardi, 1990). Ma ulteriori progressi sono difficili nelle successive fasi di selezione.

Analisi istologiche svolte sulla sezione longitudinale della radice di genotipi Alba evidenziano una diffusione del BNYVV attraverso i fasci xilematici (R. Resca, comunicazione personale). Queste osservazioni suggerivano che la diminuzione dei sintomi e la buona produzione in presenza della malattia era dovuta ad una reazione attiva della pianta nei confronti del patogeno. Per questa ragione, come per le altre due resistenze monogeniche alla rizomania, il termine "resistenza" è più appropriato di "tolleranza, tolleranza parziale ecc" (van der Plank, 1975; Winner, 1988).

La resistenza di tipo Rizor era in origine definita come monogenica e dominante, perché gli ibridi erano prodotti usando un CMS suscettibile come portaseme. La presenza negli ibridi di piante recessive e quindi non resistenti era minima, ma non trascurabile.

Fu subito evidente la difficoltà di fissare la resistenza in forma omozigote. Si cominciò a considerare la presenza di un secondo gene *e/o* di *minor genes* in grado di modificare l'espressione del carattere.

Nel 1983, fu svolto uno studio in collaborazione con Giunchedi, ricercatore presso l'Università di Bologna. L'obiettivo era quello di chiarire le modalità di espressione della resistenza genetica. Si osservò che *P. betae* infettava le radici traslocando all'interno il BNYVV. Ciò avveniva sia nei genotipi suscettibili, sia negli impollinanti di Rizor, sia negli ibridi resistenti (Faccioli e Giunchedi, 1974; Giunchedi *et al.*, 1985). Il virus si muoveva attraverso i tessuti xilematici delle radici, ma il passaggio attraverso i vasi delle radici di Rizor era ostacolato e molto rallentato. Non è stato possibile accertare i meccanismi fisiologici che riducevano la diffusione di BNYVV nei tessuti radicali (De Biaggi *et al.*, 1985; Giunchedi *et al.*, 1987; 1988). Fu osservato inoltre che il ciclo riproduttivo di *P. betae* in Rizor appariva impedito, in quanto gli zoosporangi erano individuabili solo in rarissimi casi. Ciò portava ad un minor numero di contaminazioni fungine per ciclo (Merdinoglu *et al.*, 1987).

I meccanismi di resistenza per il gene Holly sono collegabili alla riduzione delle replicazioni del BNYVV nei tessuti.

Wisler *et al.*, 1999, evidenziarono che gli ibridi *Rzrz* avevano, rispetto alle cultivar suscettibili (*rzrz*), una concentrazione di virus minore. Gli autori confermarono che *Rz* non era completamente dominante e che la concentrazione del virus e le prestazioni produttive hanno la seguente relazione: $Rzrz < Rzrzrz < rzrz$. Questa relazione genotipo- concentrazione di virus è ampiamente utilizzata dai genetisti nello screening per la selezione della resistenza alla rizomania. Questi test sembrano efficaci per ottenere l'accumulo di geni modificatori che aumentano l'espressione del gene *Rz*. I geni modificatori sembrano essere simili a quelli presenti nel tipo Alba.

2.8 Analisi molecolare delle diverse fonti di resistenza

L'argomento è stato recentemente affrontato da Scholten e Lange, 2000. Alcune delle fonti di resistenza identificate da Lewellen, 1997, derivavano da accessioni di bietola marittima. Scholten *et al.*, 1999, evidenziarono che la resistenza di WB42 (C79-3 e C48) era strettamente legata al gene *Rz*, ma ad un locus differente. Il gene della resistenza WB42 fu poi rinominato *Rz2*. L'allele *Rz2*, in prove effettuate in serra, induce una minore concentrazione di virus nelle radici rispetto all'allele *Rz* (Scholten *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 1993).

La linea C79-5, dotata di resistenza proveniente dalle accessioni R104 di Salinas (Lewellen, 1997), portava un fattore di resistenza allo stesso locus di *Rz* (Scholten *et al.*, 1997). R104 era una linea di Salinas derivata da accessioni di bietole annuali e selvatiche fornite da Biancardi nel 1987.

La resistenza derivata da C79-4 (Lewellen, 1997) e la resistenza derivata da PI206407 evidenziava uno stretto legame con il gene *Rz* che mappava probabilmente allo stesso locus di *Rz* (Scholten *et al.*, 1997). PI206407 era un'accessione di barbabietola d'origine turca (Lewellen, 1991), ma l'unico genotipo dotato di resistenza era una bietola da costa.

Barzen *et al.*, 1995 mapparono un gene probabilmente derivato da bietola marittima e attivo contro la rizomania. Questo carattere è conosciuto come resistenza di tipo Holly, il cui allele dominante è stato denominato *Rr1* e corrisponde al gene *Rz* identificato da Lewellen *et al.*, 1987. In un set di 10 differenti linee dotate di resistenza di tipo Holly, Barzen *et al.*, 1997, hanno verificato che gli stessi marcatori erano sempre presenti. Ciò suggerì agli autori che il frammento cromosomico con il gene di resistenza poteva essere stato trasferito alla bietola coltivata dalla bietola marittima. Due altre linee resistenti, derivate da Rizor, evidenziarono le stesse caratteristiche delle linee di tipo Holly. Gli

autori conclusero che le fonti di resistenza Rizer e Holly sono espresse probabilmente dal medesimo allele. Giorio *et al.*, 1997, usando varietà differenti, ma derivate dalla medesima fonte comune, ottennero risultati analoghi.

2.9 Selezione assistita da marcatori molecolari

In passato si è assistito alla difficoltà di migliorare i caratteri di resistenza alla rizomania sopra citati attraverso il ricorso a metodi tradizionali di miglioramento genetico (Biancardi *et al.*, 2010). Per superare tali difficoltà, ci si sta orientando su programmi di miglioramento genetico assistito da marcatori genetici.

Tra i vantaggi di queste tecniche vi è quello di rendere più rapido, preciso e meno costoso il lavoro di selezione. Ciò anche grazie al supporto di nuove tecnologie genomiche ad alta processività (high-throughput) che consentono il monitoraggio tempestivo e simultaneo su migliaia di individui delle modificazioni indotte dai procedimenti di miglioramento genetico. Per numerose specie coltivate queste procedure hanno già consentito di ottenere la marcatura genetica di caratteristiche importanti relazionate alla produttività, alla resistenza alle fitopatie e alla morfologia e sviluppo dell'apparato radicale (McGrath *et al.*, 2007; Stevanato *et al.*, 2009).

Precedenti studi, svolti dal Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università degli Studi di Padova, su progenie segreganti ottenute dall'incrocio fra parentali contrastanti rispetto alla condizione allelica della resistenza alla rizomania, hanno portato allo sviluppo di marcatori SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) denominati SCAR_1 e SCAR_2 e SNP_1 che mappano sul locus Rz1.

Data la vicinanza fra questi marcatori e la fonte di resistenza alla rizomania Rz1 sono necessarie ulteriori ricerche per accertare il legame tra questi marcatori e la manifestazione fenotipica della resistenza alla rizomania.

I marcatori SNP sono fra quelli che saranno più utilizzati in barbabietola. I polimorfismi dei nucleotidi sembrano avere caratteristiche del marcatore genetico ideale, infatti sono abbondanti nel genoma e facilmente riproducibili in diversi laboratori. Gli SNPs possono essere molto utili per studi di genetica di popolazione e per individuare le tracce della selezione; sono molto frequenti e, singolarmente, determinano effetti rilevanti sul fenotipo di un individuo. È ormai stabilito che gruppi di queste piccole variazioni, sommandosi, causano la suscettibilità o la resistenza a molte malattie. Gli SNPs sono variazioni di sequenza del DNA, dovute all'alterazione di un singolo nucleotide (A, T, C o G) nella sequenza del genoma, possono presentarsi sia in sequenze intergeniche che all'interno della struttura di un gene, ovvero li possiamo trovare nelle regioni: codificanti, introniche, promotrici e non tradotte. Un primo tipo di classificazione riguarda proprio la loro presenza in regioni codificanti o meno. Dal momento che solamente una piccola percentuale del genoma codifica per proteine, la maggior parte degli SNPs si trova nelle regioni non codificanti ("non-coding SNPs"), tuttavia quelli che si trovano nelle regioni effettivamente espresse ("coding SNPs") sono di particolare interesse in quanto hanno una maggiore probabilità di alterare la funzione biologica di una proteina. Gli SNPs all'interno di un gene, in ogni caso, non necessariamente modificano la sequenza aminoacidica codificata, dal momento che il codice genetico è degenerato. Si possono distinguere due diversi tipi di SNPs in base all'effetto che provocano sulla proteina:

- SNPs sinonimi che non determinano modificazioni nella sequenza aminoacidica, ossia la terza base del codone può variare senza determinare modifiche nell'aminoacido;

- SNPs non sinonimi che determinano invece la sostituzione aminoacidica nella sequenza proteica.

Anche gli SNPs che cadono nella sequenza non codificante (introne) possono modificare l'espressione genica influenzando ad esempio lo splicing o il legame del DNA ai fattori di trascrizione.

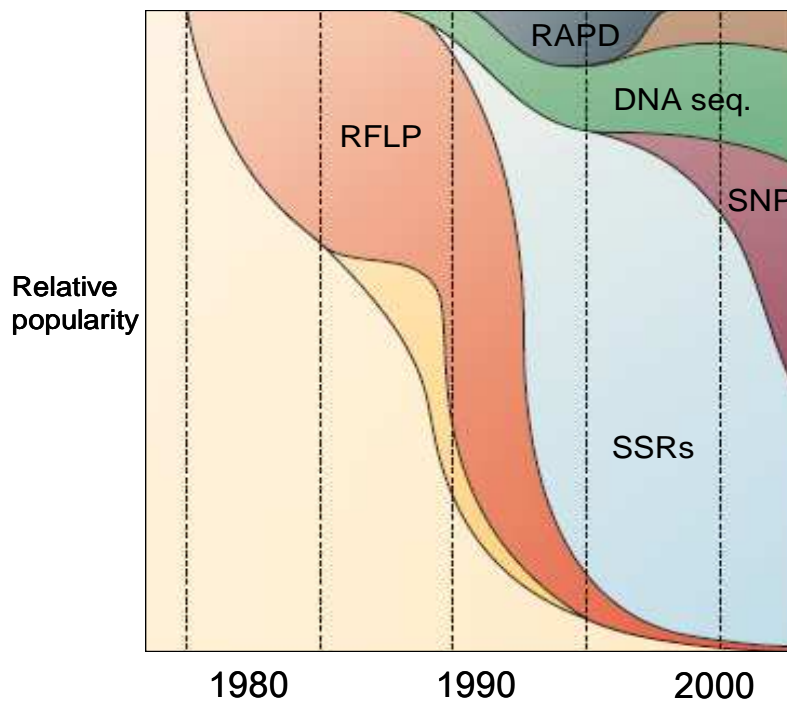


Figura 2. Diffusione dei principali marcatori molecolari (*Nature Review Genetics* 2004, 5: 63-69; SNP: Single Nucleotide Polymorphism; SSR: Simple Sequence Repeat; Random Amplification Polymorphic DNA, RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism).

Come rappresentato nella figura 2, gli SNPs costituiscono i marcatori molecolari che saranno più utilizzati e studiati in futuro. Lo sviluppo di un pannello di marcatori SNP potrà consentire l'identificazione di specifici marcatori associati alla resistenza alla rizomania da utilizzare per la selezione assistita nei programmi di miglioramento genetico.

3 SCOPO DEL LAVORO

La barbabietola da zucchero è notoriamente una coltura la cui produttività e redditività sono fortemente ridotte dall'azione di stress biotici e abiotici, che intervengono nelle diverse fasi del suo ciclo colturale. Pertanto, l'introduzione nelle varietà coltivate di tratti specifici di resistenza è stata ed è tuttora una delle strade più utilizzate per affrontare di volta in volta e risolvere in tutto o in parte le perdite legate ai fattori di stress.

Lo scopo della tesi è stato quello di mettere a punto un metodo innovativo di selezione attraverso l'utilizzo di marcatori molecolari per la resistenza alla rizomania, ovvero uno dei più importanti stress biotici della barbabietola da zucchero. A tal fine abbiamo posto a confronto un set di marcatori molecolari, SCAR e SNP, mappati sul locus Rz1, per identificare quelli strettamente legati alla manifestazione fenotipica della resistenza alla rizomania.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Materiale vegetale

Per il lavoro di tesi, sono stati esaminati 96 individui di barbabietola da zucchero del genotipo RzM2, omozigote resistente alla rizomania e 96 individui del genotipo 1BM90,DM8, omozigoti suscettibile, resi disponibili dalla società sementiera Lion Seeds (UK). Su questi individui è stata condotta l'analisi comparativa di tre marcatori molecolari (SCAR_1, SCAR_2 e SNP_1) mappati sul locus Rz1.

4.2 Estrazione DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando il DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) secondo le indicazioni del produttore. I campioni di tessuto vegetale (100 mg) sono stati triturati in azoto liquido mediante l'utilizzo di mortaio e pestello. Al tessuto vegetale finemente triturato sono stati aggiunti 400 µl del tampone di lisi (AP1) e 40 µl dell'enzima RNAasi forniti dal kit. Il campione è stato posto in un bagno termostatico a 65 °C per 10 minuti per indurre la reazione di lisi e la degradazione delle molecole di RNA. La precipitazione delle proteine e dei polisaccaridi è stata ottenuta con successiva aggiunta di 130 µl del tampone AP2 fornito dal kit. Il lisato è stato posto su una microcolonna contenente una membrana di resina (QIAshredder) inserita su un tubo di raccolta da 2 ml e centrifugato per 2 minuti a 14000 rpm per consentire l'allontanamento dei prodotti di precipitazione. All'eluato trasferito in un nuova provetta sono stati aggiunti 1.5 volumi di tampone AP3 (rapporto 1:1.5). 650 µl della soluzione sono stati posti in una microcolonna DNAeasy dove il tampone AP3 favorisce il legame del DNA alla membrana di silice.

Dopo centrifugazione per 1 minuto a 8000 rpm la microcolonna DNAeasy, contenente il DNA, è stata sottoposta a lavaggio con 500 µl di tampone AW e ricentrifugato per 1 min a 14000 rpm. Il DNA è stato infine eluito con acqua distillata (100 µl) mediante centrifugazione per 1 minuto a 14000 rpm, quantificato per via spettrofotometrica utilizzando un Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany) e conservato a -80 °C.

4.3 Amplificazione dei marcatori SCAR mediante PCR

Per le analisi molecolari, sono stati esaminati 2 marcatori SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), precisamente SCAR_1 e SCAR_2, resi disponibili dal Dott. Marco De Biaggi (Aurora S.p.A.). Questi marcatori mappano nel locus Rz1 (Stevanato et al., comunicazione personale).

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in un volume di 15 µL, contenente tampone per PCR 1X costituito da 200 mM Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mM KCl, MgCl₂ 1,8 mM, dNTP 150 µM, 5 pmoli di ogni primer (0,2 µM), 0.8U Taq DNA Polimerasi e 0,8 µL di DNA template (contenenti circa 100 ng di DNA totale).

I campioni sono stati amplificati secondo la seguente procedura di amplificazione, ripetuta per 35 cicli, che prevede le seguenti fasi :

1. denaturazione a 94°C per 20'';
2. annealing a 54°C per 25'';
3. estensione a 72°C per 50'';
4. estensione finale a 72°C per 5'.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte utilizzando il termociclatore TC-512 della Techne (Techne Inc., Burlington, NJ, U.S.A.).

4.4 Elettroforesi su gel di agarosio

Un volume di 12 µl costituito da 10 µl di campione e 2 µl di tampone di caricamento Loading dye solution (Applied Biosystem Inc. Foster City, CA, U.S.A.) è stato separato su gel di agarosio al 2% con bromuro di etidio a 90 volt per due ore. Per verificare la dimensione delle bande, è stato utilizzato un marcatore di peso molecolare noto della Qiagen (GelPilot 1 kb Plus Ladder, 100-10000 bp).

La corsa elettroforetica è avvenuta su cella di sequenza orizzontale Sub-Cell System (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.).

La migrazione dei frammenti di DNA è stata evidenziata mediante uso di raggi ultravioletti.

Il bromuro di etidio incorporato nel DNA una volta eccitato dai raggi UV emette fluorescenza, rendendo visibili le bande corrispondenti alla posizione assunta dai frammenti al termine della separazione elettroforetica.

4.5 Saggio SNP



Figura 3. Real Time-PCR “StepOne” dell’Applied Biosystems

Il test prevede l’amplificazione in real-time PCR di campioni di DNA. La reazione di PCR richiede l’impiego di primer (inneschi) localizzati

nell'intorno di due mutazioni in esame (SNP_1 e SNP_2), entrambe localizzate nel locus Rz1 (Stevanato et al., comunicazione personale) e di due sonde (probe) fluorescenti, una specifica per l'allele di resistenza e l'altra specifica per l'allele di suscettibilità. Le sonde presentano un fluorocromo alle estremità 5'.

L'analisi della fluorescenza, effettuata per lettura in tempo reale o all'end-point, permette di discriminare i tre possibili genotipi (soggetto omozigote resistente, soggetto eterozigote, soggetto omozigote suscettibile).

4.6 Progettazione Primer e Sonda

Per la progettazione di primer e sonde abbiamo utilizzato uno specifico software, denominato "*Primer Express*". Tale programma fornisce una serie di primer e sonde opportune per la sequenza desiderata.

I primer che il programma elabora devono rispettare una serie di parametri:

- avere una T_m compresa tra 58°C e 60°C;
- non contenere più di due G/C nelle ultime 5 basi;
- l'ultimo nucleotide del *forward* non deve essere una G;
- qualora si utilizzi la sonda complementare, il nucleotide del *primer reverse* più vicino al 5' della sonda non deve essere una G;
- non devono essere presenti più di 3 G consecutive;
- amplificare una sequenza lunga 50-150 basi.

Le sonde vengono progettate sulla base di alcune linee guida in modo da:

- presentare una quantità di G + C pari al 40%-60%;
- evitare estese regioni complementari ai *primer* e ripetizioni dello stesso nucleotide;
- avere una temperatura di *melting* di almeno 5° C superiore rispetto alla T_m dei *primer*, in genere compresa tra 68° e 70°C (questo perché durante la fase di estensione a 72°C i *primer* vengono estesi per cui la loro T_m aumenta, mentre la sonda non può essere estesa a causa della presenza del fosfato alla sua estremità 3', perciò la sua T_m non aumenta: la sonda potrebbe quindi staccarsi dal DNA laddove la temperatura di estensione superasse la sua T_m);
- possedere un nucleotide diverso dalla G in posizione 5'.

4.7 Preparazione Oligomix

Ciascuna Oligomix contiene i 2 primer, forward e reverse, e le 2 sonde, una per l'allele di resistenza ed una per l'allele di suscettibilità. Le sonde sono coniugate all'estremità 5' con una molecola fluorescente: la sonda per la resistenza presenta un massimo d'eccitazione per valori di lunghezza d'onda di 500-510 nm ed un massimo di emissione a 540 nm (fluorocromo FAM); la sonda per la suscettibilità presenta invece un massimo d'eccitazione a 520-530 nm ed un massimo di emissione a 560 nm (fluorocromo VIC). Entrambe le sonde sono inoltre coniugate al 3' con un quencher. La TaqMan Master Mix contiene: DNA polimerasi, i dNTPs, il tampone di reazione ed il Passive Reference (Rox).

Di seguito si riportano le quantità di oligomix utilizzate per ciascun campione, come specificato da 'Guide Applied Biosystem' :

- 10,3 µl di H₂O
- 0,31 µl di Primer Forward

- 0,31 µl di Primer Reverse
- 0,31 µl di sonda 'Probe' 1 (FAM)
- 0,31 µl di sonda 'Probe' 2 (VIC)
- 12,5 µl di Taq Man Master Mix

La concentrazione dei primer e delle sonde è pari a 10 µM.

Con un kit per SNP Assay, comprendente i 2 primer e le 2 sonde, si possono effettuare circa 3200 reazioni.

L'oligomix è stata distribuita in piastre da 48 pozzetti, in ognuno dei quali sono stati messi 24 µl, più 1 µl di DNA da testare.

Per ogni piastra 8 pozzetti sono stati utilizzati come controlli, di cui 2 negativi contenenti oligomix senza aggiunta di DNA e 6 positivi suddivisi come indicato di seguito:

- 2 contenenti DNA (precedentemente testato) omozigote resistente,
- 2 con DNA omozigote suscettibile,
- 2 con DNA eterozigote

Le piastre sono state progettate in modo da avere la massima conducibilità termica per ogni preciso ciclo di PCR e per poter dare risultati riproducibili e specifici. Ogni piastra è stata infine coperta con un film adesivo allo scopo di evitare contaminazioni tra pozzetti adiacenti, conseguenti all'evaporazione del contenuto determinata dalle elevate temperature applicate durante la PCR.

4.8 Real Time-PCR 'STEP ONE'

La sonda TaqMan ci permette di monitorare la reazione di amplificazione grazie all'attività 5' esonucleasica della Taq polimerasi

sul DNA bersaglio. Questa sonda è marcata con due fluorofori, un reporter e un quencer, e sono progettate in modo da ibridarsi in una sequenza interna ai primer di amplificazione. Quando la sonda è intatta la fluorescenza emessa dal primo fluoroforo viene assorbita dalla seconda molecola. Durante la fase di estensione della reazione di PCR la sonda viene tagliata dalla Taq solo quando essa è ibridata al target: il taglio determina il distacco del fluoroforo reporter la cui fluorescenza non viene più assorbita dal quencer, ma emessa.

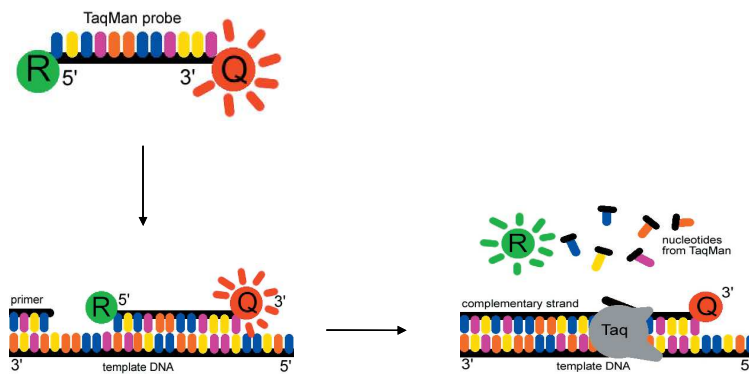


Figura 4. Reazione di amplificazione sonda TaqMan.

Durante la reazione un laser o una lampada eccitano i campioni che emettono così fluorescenza; questa viene rilevata da uno spettrofotometro a fluorescenza, che consente l'analisi contemporanea di 48 campioni per ogni reazione di PCR.

Queste sono le condizioni di reazione seguite, secondo il protocollo di Real Time-PCR 'Step one':

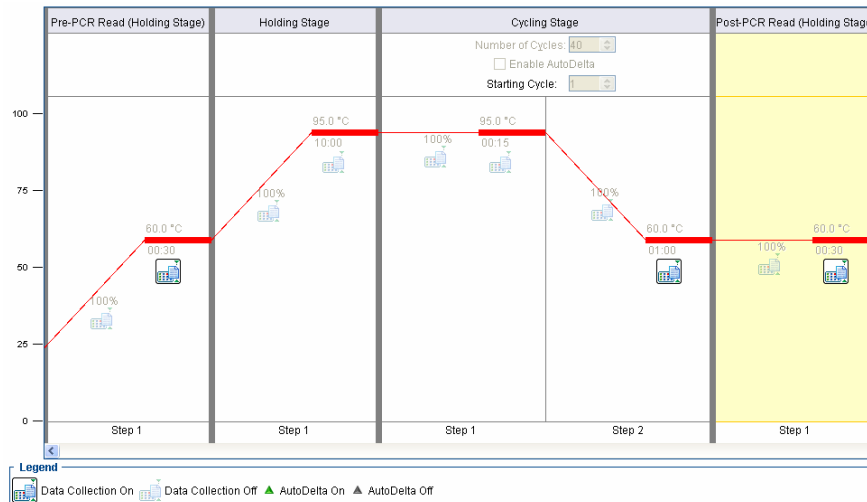


Figura 5. Profilo termico di amplificazione.

Pre-PCR (Holding stage):

95 °C per 10 minuti

Cycling stage:

95 °C per 15 secondi

60 °C per 1 minuto

Ripetute per 40 cicli

Post-PCR (Holding stage):

60 °C per 30 secondi

Per normalizzare le fluttuazioni di fluorescenza non relative alla reazione di amplificazione, viene utilizzato un fluoroforo di riferimento interno (ROX), chiamato anche 'passivo', presente nel buffer di reazione. Il software calcola, grazie ad un apposito algoritmo, un valore denominato Rn usando la seguente equazione:

$$\Delta R_n = (R_{n+}) - (R_{n-})$$

$$\text{dove } R_{n+} = \frac{\text{Intensità di emissione del reporter}}{\text{Intensità di emissione del ROX}}$$

$$\text{e } R_{n-} = \frac{\text{Intensità di emissione del reporter (in assenza di stampo)}}{\text{Intensità di emissione del ROX (in assenza di stampo)}}$$

I valori di ΔR_n riflettono la quantità di sonda fluorescente degradata e aumentano esponenzialmente durante la reazione. La fluorescenza viene rivelata ad ogni ciclo e i dati vengono registrati su un diagramma di amplificazione. Sull'asse delle ordinate vengono riportati i valori di ΔR_n e sull'asse delle ascisse il tempo rappresentato dal numero di cicli. Nei primi cicli di amplificazione i valori di ΔR_n si mantengono tendenzialmente costanti (baseline).

Il diagramma di amplificazione viene analizzato nella fase logaritmica, che corrisponde all'aumento esponenziale di concentrazione del prodotto. L'analisi è eseguita assegnando arbitrariamente un valore di soglia in funzione della variabilità della baseline. L'algoritmo determina una soglia che viene calcolata sommando il valore del segnale medio della baseline nei primi 15 cicli più 10 deviazioni standard. Il numero del ciclo durante il quale la fluorescenza di ciascun campione raggiunge questa soglia è detto C_t ed è qui che inizia la fase di amplificazione esponenziale.

Il C_t è inversamente proporzionale al numero di copie di sequenze target presenti all'inizio della reazione; il diagramma di amplificazione viene spostato a destra se la quantità di target iniziale diminuisce: ciò può accadere perché sono necessari più cicli di amplificazione per la degradazione di una quantità sufficiente di sonda e quindi per la produzione di una sufficiente quantità di fluorescenza da raggiungere la soglia.

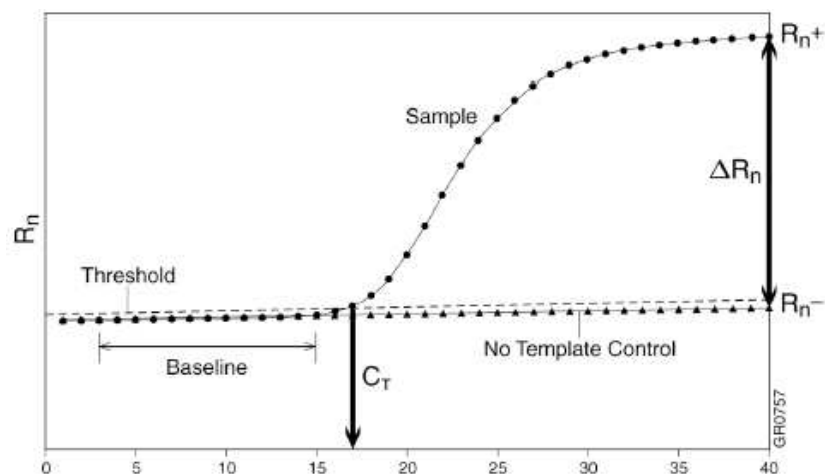


Figura 6. Diagramma di amplificazione.

4.9 Lettura in “Allelic Discrimination”

In “Allelic Discrimination Plot” si ottiene, in presenza dei tre diversi genotipi, un grafico del tutto simile a quello riportato in Figura 7. Sull’asse delle ordinate vengono indicati i valori di fluorescenza relativa all’allele di resistenza, e sull’asse delle ascisse i dati per l’allele di suscettibilità.

Si determinano conseguentemente dei raggruppamenti (clusters) per i segnali di fluorescenza, come indicato di seguito:

- Omozigoti resistenti (allele 1/1)
- Eterozigoti (entrambi gli alleli 1/2)
- Omozigoti suscettibili (allele 2/2)
- NTD (campioni bianchi contenenti solo oligomix senza DNA)

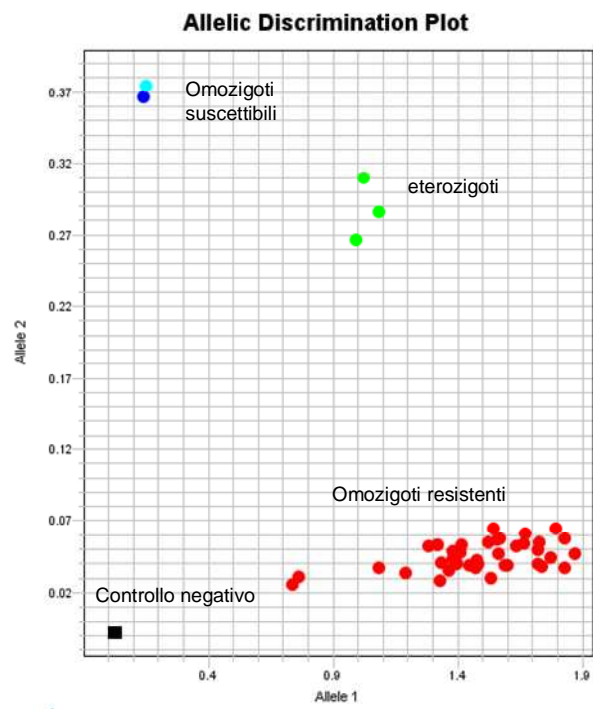


Figura 7. Allelic Discrimination Plot.

5 RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Messa a punto analisi marcatori SCAR_1 e SCAR_2

Nel presente lavoro di tesi, sono stati testati 96 individui del genotipo RMZ2 e 96 individui del genotipo 1BM90,DM8, classificati rispettivamente come individui omozigoti resistenti e suscettibili alla rizomania. Su questi individui è stata eseguita l'analisi di due marcatori SCAR, denominati SCAR_1 e SCAR_2. Studi preliminari effettuati presso il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie hanno evidenziato che entrambi i marcatori SCAR_1 e SCAR_2 mappano sul locus Rz1. I campioni di DNA sono stati amplificati mediante reazioni di PCR. Per l'ottimizzazione del protocollo di amplificazione, sono stati testati 6 DNA di controllo, 2 per ciascun genotipo atteso (omozigote recessivo, omozigote dominante ed eterozigote) assieme a dei controlli negativi. Le reazioni di PCR hanno dato esiti positivi su tutti i campioni di DNA ad eccezione dei controlli negativi che non hanno evidenziato alcuna banda. Gli amplificati apparivano privi di bande aspecifiche e, se pur di intensità differente da campione a campione, del peso molecolare atteso. Si è proceduto, pertanto, all'analisi dei marcatori SCAR_1 e SCAR_2 sui 96 individui del genotipo RMZ2 e 96 individui del genotipo 1BM90,DM8. In figura 8, è riportato il profilo elettroforetico dei marcatori SCAR_1 e SCAR_2 su individui resistenti (RZM2) e suscettibili (1BM90,DM8) alla rizomania.

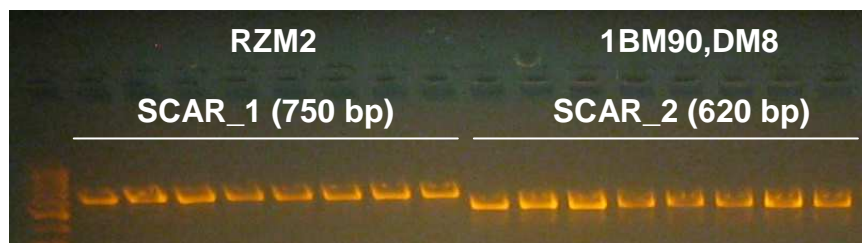


Figura 8. Esito PCR per la ricerca dei marcatori SCAR_1 e SCAR_2 su individui resistenti (RZM2) e suscettibili (1BM90,DM8).

5.2 Messa a punto analisi marcatore SNP_1

E' stata effettuata l'analisi dello SNP_1, marcatore che mappa sul locus Rz1, sull'intera popolazione di barbabietola precedentemente analizzata con gli SCAR_1 e SCAR_2, mediante il saggio di discriminazione allelica TaqMan in Real Time PCR. Questa metodologia consente di determinare in una singola reazione lo stato allelico omozigote/eterozigote del marcatore in esame. Per la messa a punto dell'analisi, è stata richiesta in una prima fase l'impiego di 6 DNA di controllo, 2 per ciascun genotipo atteso (omozigote recessivo, omozigote dominante ed eterozigote). Ciascun DNA è stato testato in doppio (per un totale di 12 datapoints). In figura 9, è riportato il diagramma di amplificazione ottenuto per un campione omozigote resistente, un campione eterozigote ed un campione suscettibile alla rizomania. Nel caso degli omozigoti resistenti e suscettibili, vengono rilevati i segnali di fluorescenza relativi rispettivamente all'allele di resistenza e all'allele di suscettibilità. Nel caso degli eterozigoti, vengono rilevati nello stesso diagramma di amplificazione i segnali di fluorescenza dei due alleli.

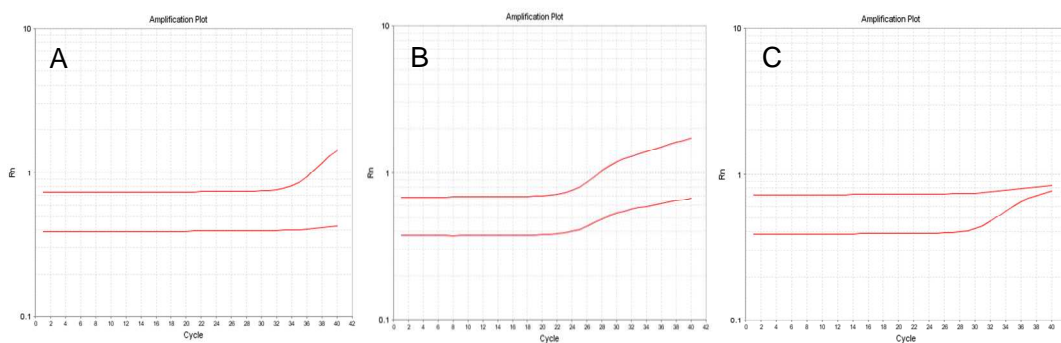


Figura 9. Diagramma di amplificazione ottenuto per un campione omozigote resistente (A), un campione eterozigote (B) ed un campione suscettibile (C) alla rizomania.

Il test ha fornito il risultato atteso (assegnazione corretta dei genotipi per la totalità dei 6 DNA) e, pertanto, si è proceduto all'esecuzione del test sulla totalità dei campioni estratti (192 campioni). Il set up delle reazioni di discriminazione allelica è stato eseguito in piastre da 48 pozzetti. Per ciascuna piastra sono stati inseriti 3 controlli positivi e 1 controllo negativo. Le corse sono state effettuate mediante l'impiego della Real Time "StepOne" dell'Applied Biosystems e i dati analizzati con il software SDS che consente di raggruppare gli individui analizzati in relazione allo stato allelico del marcatore SNP_1 come riportato in figura 10.

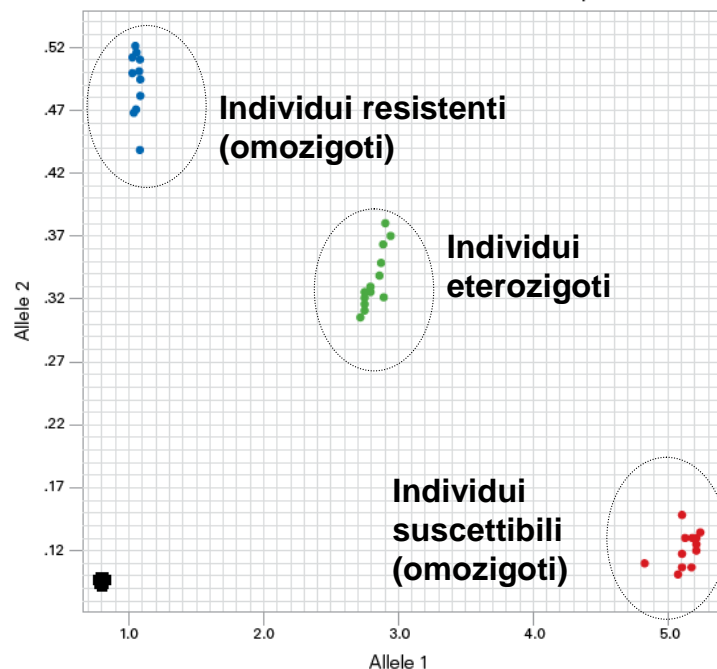


Figura 10. Esito Real Time PCR per la ricerca del marcatore SNP_1.

5.3 Analisi comparativa marcatori SCAR e SNP

Nelle tabelle 2 e 3 sono riportati i risultati relativi all'analisi comparativa dei marcatori molecolari SCAR e SNP su 96 individui del genotipo RMZ2 e 96 individui del genotipo 1BM90,DM8, classificati rispettivamente come individui resistenti e suscettibili alla rizomania.

Tabella 2. Analisi comparativa dei marcatori molecolari SCAR e SNP negli individui di barbabietola da zucchero del genotipo RMZ2 con fenotipo resistente alla rizomania.

Cod. campione	SCAR_1 (allele resistenza)	SCAR_2 (allele suscettibilità)	SNP_1 (allele resistenza)	SNP_1 (allele suscettibilità)	Cod. campione	SCAR_1 (allele resistenza)	SCAR_2 (allele suscettibilità)	SNP_1 (allele resistenza)	SNP_1 (allele suscettibilità)
1	1	0	1	0	49	1	0	1	0
2	0	0	1	0	50	1	0	1	0
3	1	0	1	0	51	1	0	1	0
4	1	0	1	0	52	1	0	1	1
5	1	0	1	0	53	0	0	1	0
6	1	0	1	0	54	1	0	1	0
7	0	0	1	0	55	0	0	1	0
8	1	0	1	0	56	1	0	1	0
9	0	0	1	0	57	0	0	1	0
10	1	0	1	0	58	1	0	1	0
11	1	0	1	0	59	0	0	1	0
12	0	0	1	0	60	1	0	1	0
13	1	0	1	0	61	1	0	1	0
14	1	0	1	0	62	0	0	1	0
15	1	0	1	0	63	1	0	1	0
16	0	0	1	0	64	0	0	1	0
17	0	0	1	0	65	1	0	1	0
18	1	0	1	0	66	1	0	1	0
19	1	0	1	0	67	1	0	1	0
20	0	0	1	0	68	1	0	1	0
21	1	0	1	0	69	0	0	1	1
22	1	0	1	0	70	0	0	1	0
23	1	0	1	0	71	1	0	1	0
24	1	0	1	0	72	1	0	1	0
25	1	0	1	0	73	0	0	1	0
26	0	0	1	0	74	0	0	1	0
27	0	0	1	0	75	1	0	1	0
28	0	0	1	0	76	1	0	1	0
29	0	0	1	0	77	1	0	1	0
30	0	0	1	0	78	0	0	1	0
31	1	0	1	0	79	0	0	1	0
32	1	0	1	0	80	0	0	1	0
33	1	0	1	0	81	1	0	1	0
34	1	0	1	0	82	1	0	1	0
35	0	0	1	0	83	1	0	1	0
36	0	0	1	0	84	1	0	1	0
37	0	0	1	0	85	1	0	1	0
38	0	0	1	0	86	1	0	1	0
39	1	0	1	0	87	0	0	1	0
40	1	0	1	1	88	0	0	1	0
41	1	0	1	0	89	1	0	1	0
42	1	0	1	0	90	1	0	1	0
43	1	0	1	0	91	1	0	1	0
44	1	0	1	0	92	0	0	1	0
45	1	0	1	0	93	0	0	1	0
46	0	0	1	0	94	0	0	1	0
47	0	0	1	0	95	0	0	1	0
48	0	0	1	0	96	1	0	1	0

Tabella 3. Analisi comparativa dei marcatori molecolari SCAR e SNP negli individui di barbabietola da zucchero del genotipo 1BM90,DM8 con fenotipo suscettibile alla rizomania.

Cod. campione	SCAR_1 (allele resistenza)	SCAR_2 (allele suscettibilità)	SNP_1 (allele resistenza)	SNP_1 (allele suscettibilità)	Cod. campione	SCAR_1 (allele resistenza)	SCAR_2 (allele suscettibilità)	SNP_1 (allele resistenza)	SNP_1 (allele suscettibilità)
1	0	1	0	1	49	0	1	0	1
2	0	1	0	1	50	0	0	0	1
3	0	0	0	1	51	0	1	0	1
4	0	1	0	1	52	0	1	0	1
5	0	0	0	1	53	0	1	0	1
6	0	1	0	1	54	0	1	0	1
7	0	0	0	1	55	0	0	0	1
8	0	0	0	1	56	0	1	0	1
9	0	1	0	1	57	0	0	0	1
10	0	1	0	1	58	0	1	0	1
11	0	1	0	1	59	0	0	0	1
12	0	0	0	1	60	0	0	0	1
13	0	0	0	1	61	0	1	0	1
14	0	1	0	1	62	0	0	0	1
15	0	0	0	1	63	0	0	0	1
16	0	1	0	1	64	0	1	0	1
17	0	0	0	1	65	0	0	0	1
18	0	0	0	1	66	0	0	0	1
19	0	1	0	1	67	0	1	0	1
20	0	0	0	1	68	0	0	0	1
21	0	1	0	1	69	0	1	0	1
22	0	1	0	1	70	0	1	0	1
23	0	1	0	1	71	0	1	0	1
24	0	1	0	1	72	0	1	0	1
25	0	1	0	1	73	0	0	0	1
26	0	0	0	1	74	0	1	0	1
27	0	1	0	1	75	0	0	0	1
28	0	0	0	1	76	0	1	0	1
29	0	1	0	1	77	0	1	0	1
30	0	1	0	1	78	0	1	0	1
31	0	1	0	1	79	0	1	0	1
32	0	1	0	1	80	0	0	0	1
33	0	1	0	1	81	0	1	0	1
34	0	0	0	1	82	0	0	0	1
35	0	1	0	1	83	0	1	0	1
36	0	1	0	1	84	0	1	0	1
37	0	1	0	1	85	0	1	0	1
38	0	1	0	1	86	0	0	0	1
39	0	0	0	1	87	0	1	0	1
40	0	1	0	1	88	0	0	0	1
41	0	0	0	1	89	0	1	0	1
42	0	1	0	1	90	0	0	0	1
43	0	0	0	1	91	0	1	0	1
44	0	0	0	1	92	0	1	0	1
45	0	1	0	1	93	0	1	0	1
46	0	0	0	1	94	0	1	0	1
47	0	0	0	1	95	0	1	0	1
48	0	1	0	1	96	0	0	0	1

Dall'analisi delle tabelle 2 e 3 sopra riportate, si evidenzia che la chiamata allelica ottenuta con lo SNP_1 è perfettamente corrispondente al fenotipo atteso. L'analisi SNP mostra che gli individui da 1 a 96 del genotipo RzM2 risultano resistenti alla rizomania in quanto evidenziano tutti l'allele di resistenza. Su questi genotipi non è stato rilevato precedentemente nessun sintomo di infezione (Dott. Marco De Biaggi, comunicazione personale). Inoltre, gli individui da 1 a 96 del genotipo 1BM90,DM8 sono risultati tutti suscettibili. Su questi individui sono stati infatti rilevati in prove precedenti i sintomi della rizomania quali iperproliferazione del capillizio radicale e ingiallimento della parte fogliare.

L'analisi dello SNP_1 ha evidenziato la presenza nell'ambito del genotipo resistente alla rizomania "RzM2" di tre individui (40, 52 e 69) che mostrano, oltre all'allele di resistenza, anche quello legato alla suscettibilità. Questi tre individui eterozigoti possono essere considerati dei fuori-tipo e quindi da eliminare in quanto il fenotipo atteso è "omozigote resistente". L'impiego del marcatore SNP_1 è, pertanto, di particolare interesse perché potrà consentire la definitiva fissazione genetica in omozigosi delle linee parentali resistenti alla rizomania con l'eliminazione delle piante segreganti.

Da un punto di vista statistico, l'analisi degli SNP evidenzia una frequenza osservata di individui resistenti alla rizomania uguale alla frequenza attesa. L'analisi degli SCAR non evidenzia invece una corrispondenza significativa tra la frequenza osservata e quella teorica. Il χ^2 è infatti risultato significativo ($P < 0,05$) come appare dalla tabella 4. Pertanto, questi marcatori si sono rivelati poco affidabili per la identificazione della resistenza alla rizomania a differenza di quanto osservato con lo SNP_1.

Tabella 4. Test non parametrico (χ^2) per valutare la significatività della divergenza fra le frequenze osservate e quelle attese nell'ambito degli individui di barbabietola da zucchero con fenotipo resistente e suscettibile.

	O (Freq. osservata)	C (Freq. attesa)	χ^2	P
SNP_1 (allele resistenza)	96	96	0	ns
SNP_1 (allele suscettibilità)	96	96	0	ns
SCAR_1 (allele resistenza)	58	96	15,0	P<5%
SCAR_2 (allele suscettibilità)	62	96	12,0	P<5%

In definitiva, il saggio SNP risulta "preferibile" perché la sua determinazione costa meno rispetto agli SCAR (0,8 euro vs. 2,0 euro per campione), consente la discriminazione allelica simultanea

(identificazione omozigoti ed eterozigoti) e può essere testato su piattaforme ad elevata processività come riportato da Varshney et al., 2007.

L'impiego del marcatore SNP_1, che consente di controllare adeguatamente la discendenza della resistenza alla rizomania, apporterà sicuri vantaggi al lavoro di selezione. Infatti, l'identificazione della base genetica che sottende questo carattere potrebbe permettere la sua introgressione in genotipi dotati di buone caratteristiche produttive.

In conclusione, l'utilizzo del saggio SNP messo a punto con il lavoro di tesi permetterà di discriminare in modo univoco e riproducibile i genotipi resistenti omozigoti, resistenti eterozigoti e suscettibili alla rizomania. Tale approccio è applicabile su larga scala in programmi di miglioramento genetico orientati alla massimizzazione della resistenza alla rizomania.

6 BIBLIOGRAFIA

Alghisi, P. & V. D'Ambra, 1966. Ricerche sulla rizomania della bietola. *Rivista di Patologia Vegetale* 2: 3-41.

Alghisi, P. & V. D'Ambra, 1970. Fumigazioni di terreno rizomane e suoi effetti su colture successive. *Notiziario sulle malattie delle piante* 3, 3-12.

Artschwager, E. & E.M. Smiley, 1921. *Dictionary of Botanical Equivalents*. William & Wilkins, Baltimore, pp.137.

Asher, M.J.C., 1993. Rhizomania. In: D.A. Cooke & R.K. Scott (Eds.), *The Sugar Beet Crop*. Chapman & Hall, London, pp.311-346.

Barzen, E., W. Mechelke, E. Ritter, E. Schulte-Kappert & F. Salamini, 1995. An expanded map of the sugar beet genome containing RFLP and RAPD loci. *Theor Appl Genet* 90: 189-193.

Barzen, E., R. Stahl, E. Fuchs, D.C. Borchardt & F. Salamini, 1997. Development of coupling-repulsion-phase SCAR markers diagnostic for the sugar beet *Rr1* allele conferring resistance to rhizomania. *Mol Breed* 3: 231-238.

Biancardi, E., D. Biondani & A. Graf, 1988. Einige Effecte bei der Selection von Zuckerrüben auf Widerstandfähigkeit gegenüber Rizomania. *Bodenkultur* 39: 251-257.

Biancardi, E., 1999. Miglioramento genetico. In: B. Casarini, E. Biancardi & P. Ranalli (Eds.), *La Barbabietola da Zucchero in Ambiente Mediterraneo*. Edagricole, Bologna, pp.57-145.

Bongiovanni, G.C., G. Gallarate & G. Piolanti, 1958. *La Barbabietola da Zucchero*. Edagricole, Bologna, pp.636.

Bongiovanni, G.C., 1964. La diffusione della rizomania in Italia. *Informatore Fitopatologico* 10: 263-265.

Bongiovanni, G.C. & L. Lanzoni, 1964. La rizomania della bietola. *Progresso Agricolo* 2: 209-220.

Bongiovanni, G.C., 1965. Prove di lotta a pieno campo con un fumigante clorurato contro la rizomania della bietola. *Notiziario sulle Malattie delle Piante* 72: 55-64.

Canova, A., 1958. Appunti di patologia della barbabietola. *Informatore Fitopatologico* 9: 390-396.

Canova, A., 1966 a. Ricerche virologiche nella rizomania della bietola. *Annali Accademia Nazionale di Agricoltura* 78: 37-46.

Canova, A., 1966 b. Si studia la rizomania della bietola. *Informatore Fitopatologico* 10: 235-239.

Canova, A., 1980. Rizomania. In: *Enciclopedia Agraria Italiana*, Vol. 10, Reda, Roma, pp.1172.

Clark, M.F. & A.M. Adams, 1977. Characteristics of the microtiter plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34: 475-483.

D'Ambra, V., 1967. Ricerche sulla *Polymyxa betae* Keskin. *Rivista di Patologia Vegetale* 3: 217-226.

De Biaggi, M., 1985. Varietà e rizomania. *Terra e Vita* 1: 97-99.

De Biaggi, M., 1987. Methodes de selection - Un cas concret. *Proc IIRB* 50: 157-161.

Duffus, J.E., E.D. Whitney, R.C. Larsen, H.Y. Liu & R.T. Lewellen, 1984. First report in Western hemisphere of rhizomania of sugar beet caused by beet necrotic yellow vein virus. *Plant Disease* 68: 251.

Faccioli, G. & L. Giunchedi, 1974. On the viruses involved on rhizomania disease of sugarbeet in Italy. *Phytopath Medit* 13: 10-16.

Falk, B.W. & J.E. Duffus, 1977. The first report of *Polymyxa betae* in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 61: 492-494.

Gentili, P. & G. Poggi, 1986. Ritmo, esperienze italiane contro rizomania e cercospora. *Maribo Italia, Pubblicazione tecnica* 25, pp.24.

Ghillini, C.A., P. Alghisi & V. D'Ambra, 1965. Segnalazione di un plasmodioforale nelle radici di *Beta vulgaris* var. *saccharifera*. *Agricoltura delle Venezie* 19: 241-243.

Ghillini, C.A. & V. D'Ambra, 1971. Conoscenze e problemi relativi alla rizomania della bietola. *Industria Saccarifera Italiana* 6: 183-188.

Giorio, G., M. Gallitelli & F. Carriero, 1997. Molecular markers linked to rhizomania resistance in sugar beet, *Beta vulgaris*, from two different source maps to the same linkage group. *Plant Breed* 116: 401-408.

Giunchedi, L., M. De Biaggi, C. Poggi Pollini, 1985. Evolution of ELISA technique for the screening of rhizomania tolerant sugar beet genotypes. *Proc IIRB* 48: 385-390.

Giunchedi, L., M. De Biaggi & C. Poggi Pollini, 1987. Correlation between tolerance and Beet Necrotic Yellow Vein Virus in sugar beet genotypes. *Phytopath Medit* 26: 23-28.

Giunchedi, L. & C. Poggi Pollini, 1988. Immunogold-silver localization of Beet Necrotic Yellow Vein Virus antigen in susceptible and moderately resistant sugar beets. *Ibid* 27: 1-6.

Helmerick, R.H., R.E. Finkner & C.W. Doxtator, 1965. Paired-plant crosses in sugar beets. *J American Soc Sugar Beet Technologists* 13: 548-554.

Jackson, B.D., 1916. A Glossary of Botanic Terms. Duckworth, London, pp.428.

Johansson, E., 1985. Rhizomania in sugar beet: a threat to beet growing that can be overcome by plant breeding. Sveriges Utsädesförenings Tidskrift 95: 115-121.

Keskin, B., A. Gaertner & W.H. Fuchs, 1962. Über eine die Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournef. befallenden Plasmodiophoraceae. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 75: 275-279.

Keskin, B., 1964. *Polymyxa betae* ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournef., besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. Archiv für Mikrobiologie 49: 348-374.

Koenig, R., P. Lüddecke & A.M. Haerberle, 1995. Genome differences between beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) sources from different parts of the world. Proc IIRB 58: 271-278.

Lewellen, R.T., 1985. Registration of sugarbeet germplasm lines with multiple disease resistance: C39, C39R, C39R-6, C47, C47R, C93, and C94. Crop Sci 35: 596-597.

Lewellen, R.T., I.O. Skoyen & A.W. Erichsen, 1987. Breeding sugarbeet for resistance to rhizomania: evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance of resistance. *Ibid* 50: 139-156.

Lewellen, R.T., 1988. Selection for resistance to rhizomania in sugar beet. Abstr 5th International Congress Plant Pathology, Kyoto, Japan, 455.

Lewellen, R.T. & E. Biancardi, 1990. Breeding and performance of rhizomania resistant sugar beet. Proc IIRB 53: 79-87.

Lewellen, R.T., 1991. Registration of rhizomania-resistant germplasm of *Beta vulgaris*. Crop Sci 31: 244-245.

Lewellen, R.T., 1992. Use of plant introductions to improve populations and hybrids of sugarbeet. In: Use of Plant Introductions in Cultivar Development, Part 2, CSSA Special Publication 20: 117-136.

Lewellen, R.T. & E.D. Whitney, 1993. Registration of germplasm lines developed from composite crosses of sugarbeet x *Beta maritima*. Crop Sci 33: 882—883.

Lewellen, R.T., 1997. Registration of 11 sugarbeet germplasm lines with resistance to rhizomania. *Ibid* 37: 1026.

Lewellen R.T. 2000. Registration of rhizomania resistant sugarbeet x *Beta vulgaris* subsp. *maritima* germplasms C26, C27, and C51. *Ibid* 40: 1513-1515.

Lindley, J. & T. Moore, 1866. The Treasury of Botany and Glossary of Botanical Terms. Longmans Green, London, pp.1564.

Merdinoglu, D., O. Lemaire & S. Wiedmann, 1987. Approches nouvelle danc la selection pour les resistances a la rhizomanie. Proc IIRB 50: 265-273.

Munerati, O. & T.V. Zapparoli, 1915. Di alcune anomalie della *Beta vulgaris* L. Atti R. Accademia dei Lincei XXV: 1236-1239.

Paul, H., B. Henken, O.E. Scholten & W. Lange, 1993. Use of zoospores of *Polymyxa betae* in screening beet seedlings for resistance to beet necrotic yellow vein virus. Netherlands J Plant Path, 99 (Suppl. 3): 151-160.

Penzig, O., 1921. Pflanzen-Teratologie. Verlag Gebrüder Borntraeger, Berlin, pp.1453.

Piolanti, G., L. Lanzoni & G.C. Bongiovanni, 1957. Osservazioni sul fenomeno dei bassi titoli delle bietole in alcune province venete. Il Giornale del Bieticoltore 12: 2.

Savitsky, V.F., 1950. Monogerm sugar beets in the United States. Proc American Soc Sugar Beet Technologists 7: 331-338.

Scholten, O.E., R.C. Jansen, L.C.P. Keiser, T.S.M. De Bock & W. Lange, 1996. Major genes for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta vulgaris*. Euphytica 91: 331-339.

Scholten, O.E., R.M. Klein-Lankhorst, D.G. Esselink, T.S.M. De Bock & W. Lange, 1997. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to resistance against beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta* accessions. Theor Appl Genet 94: 123-130.

Scholten, O.E., T.S.M. De Bock, R.M. Klein-Lankhorst & W. Lange, 1999. Inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in *Beta vulgaris* conferred by a second gene for resistance. Theor Appl Genet 99: 740-746.

Scholten, O.E. & W. Lange, 2000. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: a review. Euphytica 112: 219-231.

Skaracis, G.N. & E. Biancardi, 2000. Breeding for cercospora resistance in sugar beet. In: *Cercospora beticola* Sacc. Biology, Agronomic Influence and Control Measures in Sugar Beet. Advances in Sugar Beet Research, IIRB, Bruxelles, Vol 2, pp.177-195.

Steudel, W., 1984. Pflanzenschutz einst und jetzt – Ein wissenschaftshistorischer Rückblick. In: Geschichte der Zuckerrübe, 200 Jahre Anbau und Züchtung. Verlag Albert Bartens, Berlin, pp.67-82.

Tamada, T. & T. Baba, 1973. Beet Necrotic Yellow Vein Virus from rhizomania affected sugar beet in Japan. Ann Phytopathol Soc Japan 39: 325-332.

Van der Plank, J.E., 1975. Principles of Plant Infection. Academic Press, New York, pp.216.

Varshney, R.K., Chabane, K., Hendre, P.S., Aggarwal, R.K., Graner A., 2007. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Science* 173: 638-649.

Winner, C., 1984. Viröse Wurzelbärtigkeit (Rizomania) der *Beta*-Rübe als Herausforderung für Forschung und Resistenzzüchtung. *Zuckerindustrie* 109: 113-120.

Winner, C., 1988. Terminologische Fragen in der Rizomaniaforschung. *Ibid* 113: 597-600.

Wisler, G.C., R.T. Lewellen, J.L. Sears, H.Y. Liu & J.E. Duffus, 1999. Specificity of TAS-ELISA for beet necrotic yellow vein virus and its application for determining rhizomania resistance in field-grown sugar beet. *Plant Dis* 83: 864-870.