

ESEMPI DI ANALISI DEI PARENTALI CON MARCATORI MICROSATELLITI IN VITE

Grando M.S., Malossini U., Stefanini M.

Istituto Agrario di San Michele - San Michele all'Adige (TN) - Italia

Abstract

Examples of parental analyses by microsatellites in grapevine

Capillary electrophoresis fluorescence-based technology and fragment sizing software were applied in order to type grape cultivars at microsatellite loci described by Thomas and Scott (1993) and Bowers et al. (1996). To follow genetic relationships, nine varieties obtained by the breeding activity of Rebo Rigotti (1891-1971), which are still conserved and evaluated in our Institute, were investigated as well as the pedigree of the Rhine Riesling crosses: Bacchus, Optima, Müller-Thurgau, Scheurebe, Ehrenfelser, Kerner, Rotberger, Rieslaner and Incrocio Manzoni 6.0.13. Mendelian inheritance of automatically sized alleles proved to be easily scorable. Inconsistencies with the genotypes of cultivars thought to be the parents are discussed.

Key-words: DNA typing, microsatellites, parentage analysis, Vitis vinifera L. crosses.

Riassunto

Al fine di caratterizzare le cultivar di vite ai loci microsatelliti descritti da Thomas e Scott (1993) e da Bowers et al. (1996) è stata utilizzata la tecnica della separazione mediante elettroforesi capillare dei microsatelliti marcati per la rilevazione con fluorescenza. Si è impiegato quindi un software specifico per l'analisi dei frammenti. Per verificare le relazioni di parentela, sono state studiate nove varietà ottenute per incrocio da Rebo Rigotti (1891-1971), conservate e valutate presso l'Istituto Agrario di San Michele all'Adige, così come le seguenti discendenze di Riesling renano: Bacchus, Optima, Müller-Thurgau, Scheurebe, Ehrenfelser, Kerner, Rotberger, Rieslaner ed Incrocio Manzoni 6.0.13. L'ereditabilità Mendeliana degli alleli esaminati automaticamente ha dimostrato l'efficacia ed il facile utilizzo di questa tecnologia. Per quanto riguarda le relazioni di parentela, non tutti gli Incroci esaminati possiedono alleli microsatelliti compatibili con quello dei genitori dichiarati.

Parole chiave: analisi del DNA, microsatelliti, analisi dei parentali, incroci di Vitis vinifera L.

¹Comunicazione presentata ad Agro-Bio-Frut, Cesena 9 maggio 1997

La maggior parte dei vitigni che oggi sono importanti economicamente risulta nota da diversi secoli. Tuttavia solo da pochi decenni i passaggi di breeding appaiono documentati, per cui l'origine di molte cultivar rimane ancora sconosciuta.

Un metodo efficace per tipizzare i numerosi vitigni e per l'analisi dei pedigrees è attualmente fornito dai marcatori del DNA SSR (Simple Sequences Repeats) o microsatelliti. La trasmissione degli alleli SSR da una generazione all'altra, di tipo Mendeliano co-dominante facilita lo studio delle strutture familiari e della storia genetica delle varietà.

Negli ultimi anni sono state descritte numerose sequenze microsatelliti del genoma di piante coltivate. Nel caso della vite, le regioni di DNA fiancheggianti i microsatelliti, ricavate dall'analisi del genoma di una *Vitis vinifera*, sono risultate conservate anche in altre specie dello stesso genere (Thomas e Scott 1993, Bowers *et al.* 1996). Tra i vitigni più diffusi è stato osservato un discreto polimorfismo nella lunghezza delle regioni microsatelliti, con loci che presentano anche più di 10 varianti alleliche e questo ha suggerito lo sviluppo di un sistema di identificazione universale delle cultivar di vite, basato sull'analisi di un limitato ma altamente informativo numero di SSRs.

Come esempio della variabilità dei genotipi evidenziabile con analisi ai loci microsatelliti, sono riportati e discussi in questa occasione i pedigrees di alcune cultivar di *V. vinifera* ottenute da incrocio nell'ambito di diversi programmi di miglioramento genetico realizzati in Europa nei primi anni '50. Un gruppo di varietà ha in comune il genitore Riesling renano, l'altro è costituito dalle linee prodotte e selezionate da Rebo Rigotti presso il nostro Istituto, con l'obiettivo di migliorare la piattaforma ampelografica esistente all'epoca in provincia di Trento.

Materiali e metodi

Foglie giovani per l'estrazione del DNA sono state prelevate dalle varietà riportate in Tabella 1 appartenenti alla Collezione Ampelografica o a vigneti di conservazione e confronto dell'Istituto Agrario di San Michele all'Adige. Le regioni microsatelliti VVS1, VVS2, VVS4, VVS5 (Thomas e Scott, 1993) e VVMD5, VVMD6, VVMD7 e VVMD8 (Bowers *et al.* 1996) sono state amplificate attraverso la PCR in volumi di 25 µl con 100 ng di DNA, 0.25 µM di ciascun primer, 200 µM di ciascun dNTP, 1.5 mM MgCl₂ e 0.5 U di AmpliTaq Gold (Perkin Elmer). Un oligonucleotide di ciascun paio di primers era marcato con fosforamiditi (Abi Prism): TET (verde) per il primer VVS1, 6-FAM (blu) per i primers VVS2, VVS5 e VVMD7, HEX (giallo) per i primers VVS4, VVMD5, VVMD6 e VVMD8. Le reazioni sono state condotte usando un Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer) e le seguenti condizioni: 12 min a 95°C quindi 30 cicli di denaturazione (45 s a 94°C), annealing (30 s a 51°C), estensione (1 min e 30 s a 72°C) e uno step finale di 7 min a 72°C. Le amplificazioni sono state confermate tramite elettroforesi in gel di agarosio al 2%. L'analisi dei prodotti di PCR è stata

successivamente condotta con un Genetic Analyzer ABI Prism 310 ed il software GeneScan (Perkin Elmer). Per la separazione in elettroforesi capillare, è stato usato il polimero POP4. Prima dell'iniezione, 0,5 µl di 4 diversi campioni di PCR sono stati mescolati insieme a 12 µl di formamide deionizzata e 0,5 µl di standard interno

Tab. 1. Incroci di *Vitis vinifera* e parentali analizzati in questo studio.

Cultivar	Pedigree
Müller-Thurgau	Riesling x Silvaner
Ehrenfelser	Riesling x Silvaner
Scheurebe	Silvaner x Riesling
Rieslaner	Silvaner x Riesling
Bacchus	(Silv. x Riesl.) x Müller-Thurgau
Optima	(Silv. x Riesl.) x Müller-Thurgau
Kerner	Schiava grossa x Riesling
Rotberger	Schiava grossa x Riesling
Incrocio Manzoni 6-0-13	Riesling x Pinot bianco
Pinot bianco	
Riesling renano	
Schiava grossa	
Silvaner	
I.R. 95-5	Cabernet franc x Merlot
I.R. 125	Cabernet franc x Merlot
I.R. 97-2	Cabernet franc x Marzemino gentile
I.R. 123-3	Cabernet franc x Marzemino gentile
I.R. 123-4	Cabernet franc x Marzemino gentile
I.R. 107-2	Merlot x Marzemino gentile
I.R. 107-3 "Rebo"	Merlot x Marzemino gentile
I.R. 102-3	Verdot x Pinot nero
I.R. 103-2	Verdot x Teroldego
Cabernet franc	
Carmenère	
Marzemino	
Merlot	
Petit Verdot	
Pinot nero	
Teroldego	

(GeneScan 500 TAMRA - rosso) e poi denaturati 2 min a 95°C. Per permettere la risoluzione del picco dello standard di 400 bp, il tempo di corsa è stato impostato a 24 min, mentre il dimensionamento degli alleli è stato ottenuto con l'opzione Local Southern Method.

Risultati e discussione

Le taglie degli alleli determinate attraverso l'analisi automatica dei frammenti sono risultate leggermente diverse da quelle calcolate in altri laboratori con la separazione in elettroforesi su gel di agarosio o di acrilammide (Grando e Frisinghelli, 1998).

Tuttavia, rapportando i dati, i genotipi determinati ai loci microsatelliti analizzati corrispondono completamente a quelli già descritti per le stesse cultivar (es. Cabernet franc, Merlot, Riesling renano). Tutte le regioni SSR esaminate mostrano una segregazione Mendeliana. Ciò indica che questi marcatori del DNA sono ereditabili ed utili per l'analisi genetica e l'analisi dei pedigree.

Incroci del Riesling renano

I genotipi di nove cultivar discendenti dal Riesling renano e quelli dei parentali noti sono riportati in Tabella 2. Tre pedigree mostrano delle discordanze rispetto agli alleli posseduti dai genitori. Il caso del Müller-Thurgau conferma quanto è stato discusso più di una volta sulla base di evidenze molecolari (Buscher *et al.* 1994, Thomas *et al.* 1994, Regner *et al.* 1996). I nostri risultati escludono però il Silvaner non solo dai parentali del Müller-Thurgau ma anche da quelli delle varietà Scheurebe ed Ehrenfelser. L'analisi alle regioni microsatelliti conferma invece il Riesling renano come genitore in tutti i casi esaminati.

Silvaner è identificato nella parentela di Rieslaner, Optima e Bacchus. In questi ultimi due incroci si può osservare inoltre che i genotipi mostrano gli alleli di due diversi Silvaner: la varietà relativa al caso Müller-Thurgau e quella attualmente diffusa come Silvaner. Un più probabile parentale del Müller-Thurgau è stato recentemente individuato da Regner (comunicazione personale) nello Chasselas de Courtillier. Gli alleli di questa varietà, determinati anche nel presente studio, sono effettivamente compatibili con il genotipo del Müller-Thurgau. I genotipi di Kerner e Rotberger sono entrambi il risultato della segregazione degli alleli di Riesling e Schiava grossa. Per quanto riguarda l'incrocio Manzoni 6.0.13, la sua parentela è stata più volte messa in dubbio ed è stata suggerita invece l'origine per autofecondazione del Riesling renano o la discendenza da Riesling r. x Chardonnay. Le analisi dei microsatelliti e anche di marcatori RAPD (Grando *et al.* 1997) escludono l'autofecondazione mentre provano che l'incrocio Manzoni 6.0.13 può essere realmente derivato da Riesling x Pinot.

Tab. 2. Genotipi di alcuni incroci del Riesling renano e delle varietà parentali a 8 loci microsatelliti

(-) rappresenta l'allele nullo o l'assetto omozigote

Varietà	VVS1	VVS2	VVS4	VVS5	VVMD5	VVMD6	VVMD7	VVMD8
Riesling	186 -	139 148	166 -	83 98	222 230	204 206	247 255	137 141
Silvaner	176 186	148 150	166 -	123 144	222 228	187 204	241 245	135 137
Müller-Thurgau	179 186	139 148	166 171	83 107	222 224	197 204	245 255	137 141
Chasselas de C.	179 186	148 152	166 171	107 144	224 232	197 206	241 245	137 152
Pinot bianco	179 186	133 148	166 171	119 144	224 234	197 -	237 241	135 137
Ehrenfelser	186 -	139 148	166 171	98 107	222 224	187 204	237 255	137 141
Scheurebe	186 -	139 148	166 -	98 107	222 234	204 206	245 247	141 162
Rieslaner	186 -	148 -	166 -	98 144	222 -	204 206	241 247	137 -
Bacchus	186 -	148 -	166 171	107 123	222 224	204 206	241 245	137 141
Optima	179 186	148 -	166 -	83 123	222 -	197 206	245 247	141 -
I. Manzoni 6-0-13	186 -	148 -	166 -	83 144	222 224	197 206	241 247	137 -

Incroci Rigotti

I vitigni parentali confrontati e gli Incroci Rigotti hanno mostrato genotipi caratteristici agli 8 loci microsatelliti, mentre biotipi della stessa varietà non sono risultati distinguibili. Per quanto riguarda le relazioni di parentela, non tutti gli Incroci Rigotti possiedono alleli microsatelliti compatibili con quello dei presunti parentali (Tab. 3).

In particolare, è stato possibile determinare che il tipo di Cabernet franc utilizzato da Rigotti è il Carmenère, mentre il parentale Verdot, considerato per gli I.R. 102-3 e 103-2 non corrisponde al Petit Verdot ora diffuso. L'osservazione più interessante è emersa però dagli Incroci Rigotti indicati come discendenti del Marzemino gentile.

In tutti questi casi, i genotipi ai loci microsatelliti confermano l'apporto del genitore femminile (Carmènere o Merlot) mentre non presentano la segregazione attesa degli alleli del Marzemino.

L'analisi delle altre varietà ha portato all'osservazione che il Teroldego potrebbe, combinato con i parentali femminili, originare i genotipi evidenziati per questi Incroci Rigotti.

Di fatto, Rebo Rigotti realizzò numerosi incroci anche con il Teroldego ma le selezioni ottenute non risultano attualmente conservate. Per chiarire le effettive relazioni genetiche di queste varietà e in particolare della cv. "Rebo" è stato quindi impostato uno studio della variabilità intravarietale presente nel Marzemino a livello delle regioni SSR. Le prime analisi, condotte su alcune accessioni di Marzemino presenti nella Collezione del nostro Istituto e in vigneti della zona Trentina, non hanno però individuato alcuna differenza ai loci microsatelliti, confermando totalmente il genotipo della cultivar inizialmente considerata per l'analisi dei pedigrees.

Tab. 3. Genotipi di alcuni "Incroci Rigotti" e delle varietà parentali a 8 loci microsatelliti

(-) rappresenta l'allele nullo o l'assetto omozigote

Varietà	VVS1		VVS2		VVS4		VVS5		VVMD5		VVMD6		VVMD7		VVMD8	
Cabernet f.	177	-	135	144	165	173	119	121	222	236	197	204	237	260	141	152
Carmenère	177	-	135	144	166	173	107	121	222	234	204	-	237	260	141	-
Merlot	177	186	135	148	166	173	119	148	222	232	197	204	237	245	137	152
I.R. 107-2	177	179	133	135	166	173	107	148	222	232	204	206	245	-	135	137
I.R. 107-3	177	-	148	152	171	173	148	-	224	232	197	204	237	-	135	137
Marzemino	177	186	129	-	166	173	107	148	222	228	197	206	237	260	135	137
Teroldego	177	179	133	152	171	173	107	148	222	224	197	206	237	245	135	-

Bibliografia

- Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R., Meredith C.P., 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39: 628-633.
- Büscher N., Zyprian E., Bachmann O., Blaich R., 1994. On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Vitis*, 33: 15-17.
- Grando M.S., Frisinghelli C., 1998. Grape microsatellite markers: sizing of DNA alleles and genotype analysis of some grapevine cultivars. *Vitis* 37: 79-82.
- Grando M.S., Frisinghelli C., Malossini U., 1997. Analisi molecolare dei parentali dell'Incrocio Manzoni 6-0-13. *L'Enotecnico*, 12: 89-92.
- Regner F., Steinkellner H., Turetschek E., Stadlhuber A., Glössl J., 1996. Genetische Charakterisierung von Rebsorten (*Vitis vinifera*) durch Mikrosatelliten Analyse. *Mitt. Klosterneuburg*, 46: 52-60.
- Rigotti R., 1955. Sperimentazione sulla vite. In "Esperienze e Ricerche (1947-1954)" Istituto Agrario di S.Michele a/A Trento Ed.: 235-298.
- Thomas M.R., Scott N.S., 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.*, 86: 985-990.
- Thomas M.R., Cain P., Scott N.S., 1994. DNA typing of grapevines: a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Mol. Biol.*, 25: 939-949.

M. U.

MiPAF - Ministero delle Politiche Agricole e Forestali
Direzione P.A.A.N. - Divisione Servizi Fitosanitari - Roma

Riconoscimento e rispondenza genetica delle piante da frutto con tecniche di "fingerprinting"



Edito a cura di
S. Sansavini e M. Pancaldi



Dipartimento Colture Arboree - Università di Bologna
Centro Interdipartimentale Ricerche Biotecnologiche

Atti del Convegno AGRO•BIO•FRUT
Cesena, 9 Maggio 1997

Commissione Certificazione Vivaistica Nazionale Piante da Frutto

Agri - Cesena

CONVEGNO SU:

**RICONOSCIMENTO E RISPONDENZA GENETICA
DELLE PIANTE DA FRUTTO**

CON TECNICHE DI "FINGERPRINTING"

*Identification and genetic assessment of fruit trees
by fingerprinting techniques*

Organizzazione:

DCA - Dipartimento Colture Arboree - Università di Bologna

Centro Miglioramento Varietale in Frutticoltura

CIRB - Centro Interdipartimentale Ricerche Biotecnologiche - Università di Bologna

SFR - Servizio Fitosanitario Regionale - Bologna

CAV - Centro Attività Vivaistiche - Faenza

Patrocinio:

Ministero delle Politiche Agricole e Forestali - Progetto Frutticoltura - Roma

Piano Nazionale Biotecnologie Vegetali - Roma

C.N.R. - Progetto Coordinato MARCFRU - Roma

Centro di Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura "B. Caramia", Locorotondo (Bari)

Consorzio Vivaistico Pugliese, Valenzano (BA)

Società Orticola Italiana - Firenze

Coordinamento Scientifico:

S. Sansavini - CMVF-DCA - Università di Bologna

Segreteria Scientifica:

M. Pancaldi e **B. Vinatzer** - DCA - Università di Bologna

AGRO•BIO•FRUT

Cesena, 9 Maggio 1997