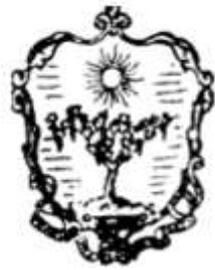




Conegliano, 9/6/2018



ACCADEMIA ITALIANA
DELLA VITE E DEL VINO



LABORATORIO ENOCHIMICO



Le zone e la tipicità



PREMESSA

Il **genere Vitis** è caratterizzato da una grande variabilità a livello morfologico, fisiologico e genetico;

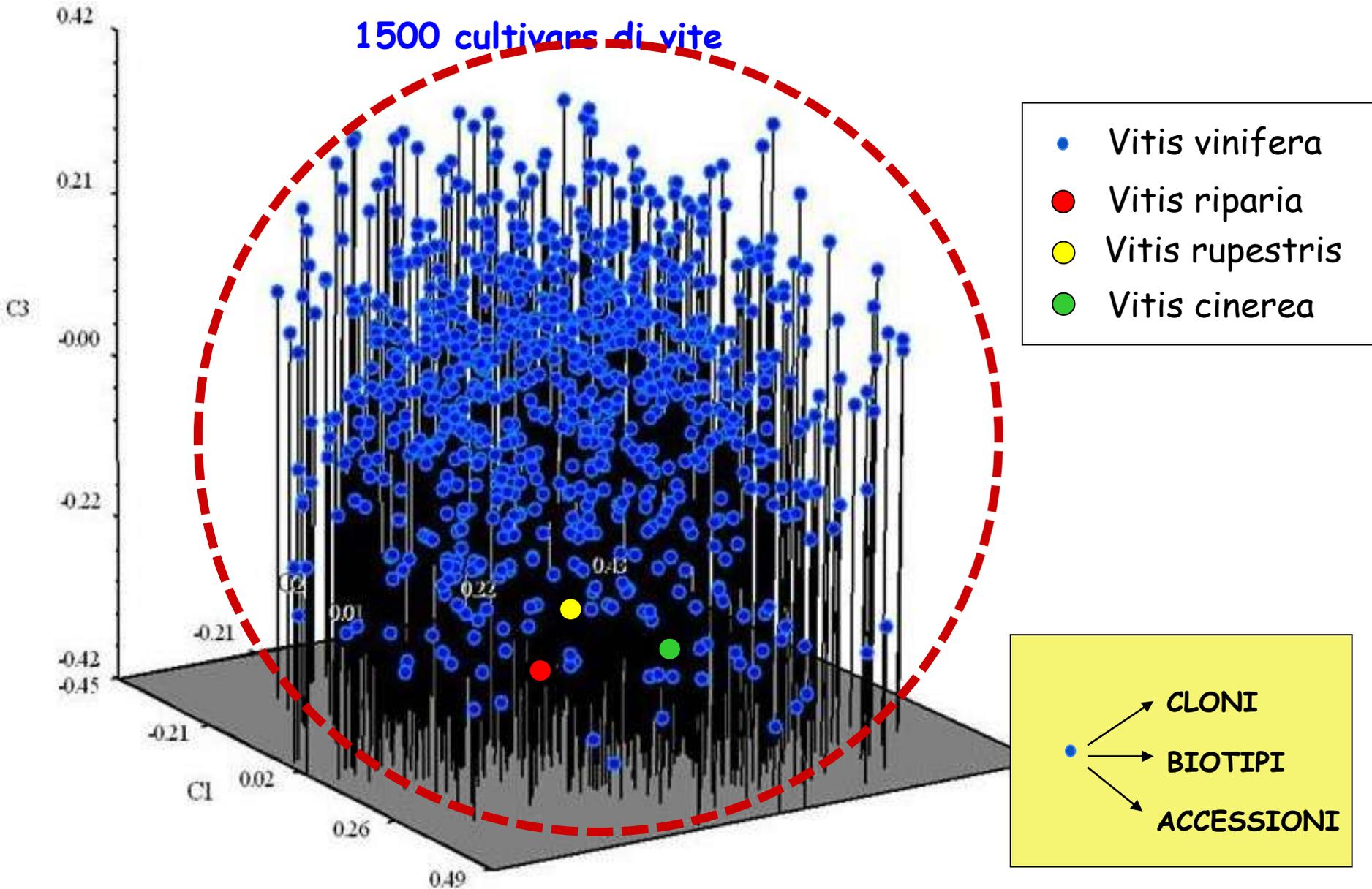
I viticoltori, nel corso dei secoli, hanno selezionato i vitigni sulla base delle **caratteristiche agronomiche migliori**, questo per ogni varietà e per i vari luoghi di coltivazione (**selezione antropica, prima che ambientale**);

Oggi le tecniche molecolari permettono di analizzare le differenze tra individui (piante, animali) **direttamente a livello della molecola di DNA (cromosomi)**:

1. Marcatori **SSR** per **l'identificazione varietale**
2. Marcatori su tutto il genoma per analisi di tipo sia INTER-VARIETALE che INTRA-VARIETALE



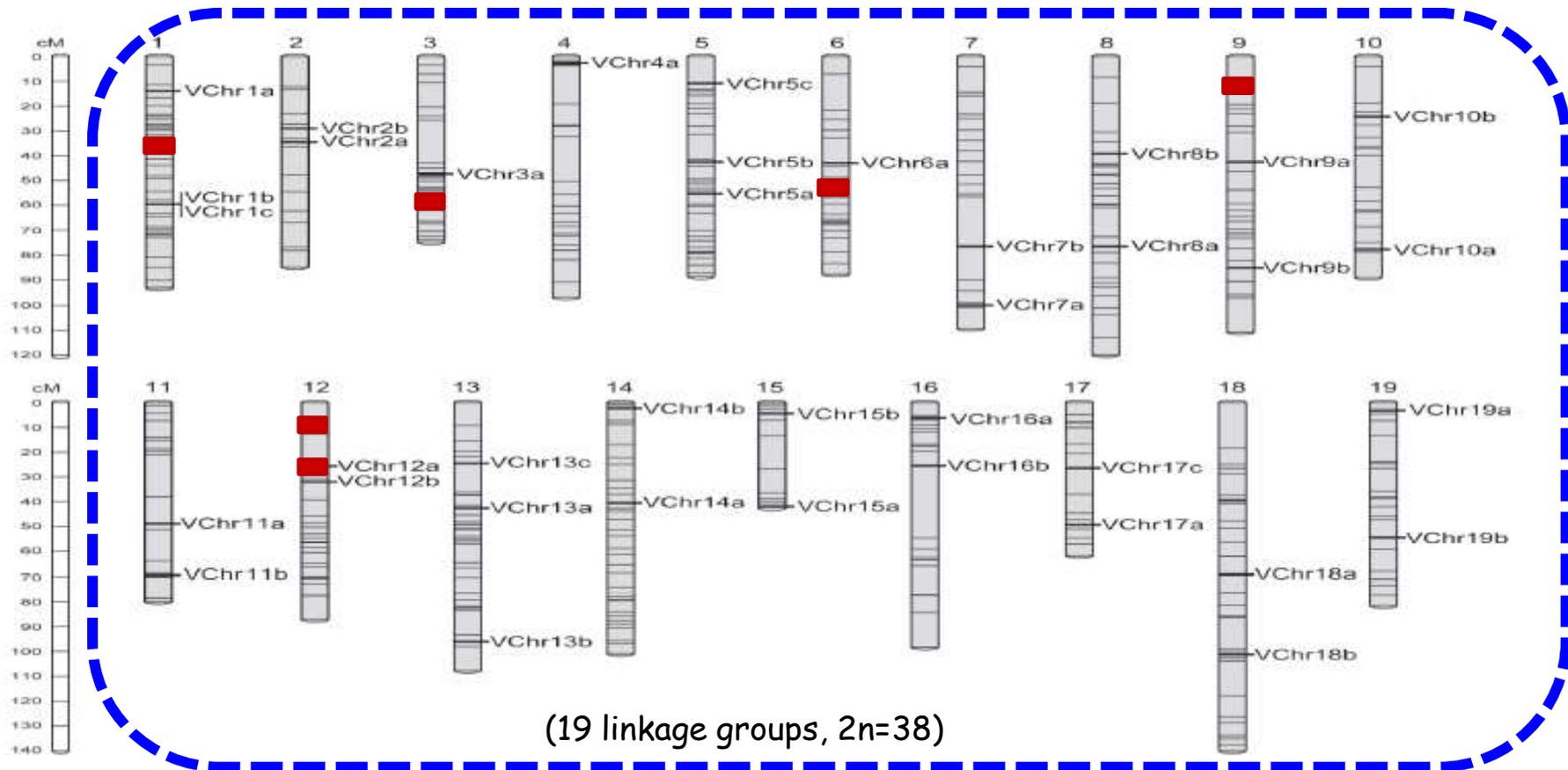
SSR (=marcatori microsatelliti)



VITIS GENOME

BMC Plant Biology 2008, 8:127

<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/8/127>



MOLECULAR MARKERS

SSR (*Simple Sequence Repeat*)

I-SSR (*Inter-microsatellites*)

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Chloroplast DNA polymorphisms

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)

S-SAP (*Specific Sequence Amplified Polymorphism*)

M-SAP (*Methyl-Sensitive Amplified length Polymorphism*)

REMAP (*REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*)

IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*)

SAMPL (*Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci*)

M-AFLP (*Microsatellites Amplified Fragment Length Polymorphism*)

VARIABILITA' GENETICA INTRA-VARIETALE

In una collaborazione tra CREA (Centro di Ricerca per la Viticoltura di Conegliano) e AIVV (Accademia Italiana della Vite e del Vino) è stata sviluppato un protocollo di analisi in grado di discriminare biotipi e cloni di vite afferenti alla medesima cultivar (intra-varietal genetic variability) combinando tecniche di analisi molecolare estese a tutto il genoma con marcatori tipici delle regioni ipervariabili (microsatellites), per esempio:

1. Specific microsatellite markers (**SSR**);
2. Regions flanking the microsatellites (**I-SSR**);
3. regions where the sequence of the repeating pattern changes (i.e. AT/AG) - adjacent microsatellites (**ASn**).

Con questo approccio è possibile avere un'analisi completa del genoma di un vitigno e allo stesso tempo analizzare il profilo SSR, fondamentale per la identificazione varietale in *Vitis*.



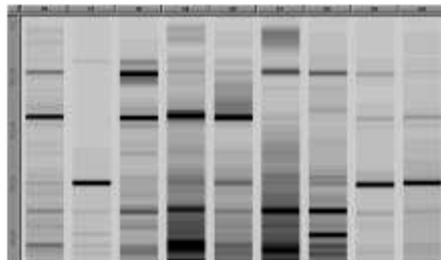
TESSUTI FOGLIARI



**ESTRAZIONE
DNA/RNA**



**IDENTIFICAZIONE
VARIETALE**



POLIMORFISMI MOLECOLARI INTRAVARIETALI

International publications (Theor Appl Genet, Mol Biotechnol; Annals of Applied Biology)

Annals of Applied Biology ISSN 0003-4746

RESEARCH ARTICLE

Clone differentiation and varietal identification by means of SSR, AFLP, SAMPL and M-AFLP in order to assess the clonal selection of grapevine: the case study of Manto Negro, Callet and Moll, autochthonous cultivars of Majorca

E. Cretazzo¹, S. Meneghetti², M.T. De Andrés³, L. Gaforio³, E. Frare² & J. Cifre¹

CULTIVARS FROM MALLORCA

Mol Biotechnol
DOI 10.1007/s12033-011-9403-9

RESEARCH

Study of Intra-Varietal Genetic Variability in Grapevine Cultivars by PCR-Derived Molecular Markers and Correlations with the Geographic Origins

Stefano Meneghetti · Angelo Costacurta · Giacomo Morreale · Antonio Calò

PRIMITIVO, MALVASIA BR/LE, NEGROAMARO

Mol Biotechnol
DOI 10.1007/s12033-011-9423-5

RESEARCH

Inter- and Intra-Varietal Genetic Variability in Malvasia Cultivars

Stefano Meneghetti · Danijela Poljuha · Enrica Frare · Angelo Costacurta · Giacomo Morreale · Luigi Bavaresco · Antonio Calò

MALVASIA ISTRIANA

Mol Biotechnol (2011) 48:244–254
DOI 10.1007/s12033-010-9365-3

RESEARCH

Clones Identification and Genetic Characterization of Garnacha Grapevine by Means of Different PCR-Derived Marker Systems

Stefano Meneghetti · Angelo Costacurta · Enrica Frare · Graziana Da Rold · Daniele Migliaro · Giacomo Morreale · Manna Crespan · Vicente Sotés · Antonio Calò

GARNACHA GRENACHE CANNONAO

Mol Biotechnol (2014) 56:408–420
DOI 10.1007/s12033-013-9724-y

RESEARCH

Genetic Variability and Geographic Typicality of Italian Former Prosecco Grape Variety Using PCR-Derived Molecular Markers

Stefano Meneghetti · Angelo Costacurta · Luigi Bavaresco · Antonio Calò

PROSECCO / GLERA

Mol Biotechnol
DOI 10.1007/s12033-011-9475-6

RESEARCH

A Strategy to Investigate the Intravarietal Genetic Variability in *Vitis vinifera* L. for Clones and Biotypes Identification and to Correlate Molecular Profiles with Morphological Traits or Geographic Origins

Stefano Meneghetti · Antonio Calò · Luigi Bavaresco

MALVASIA of CANDIA

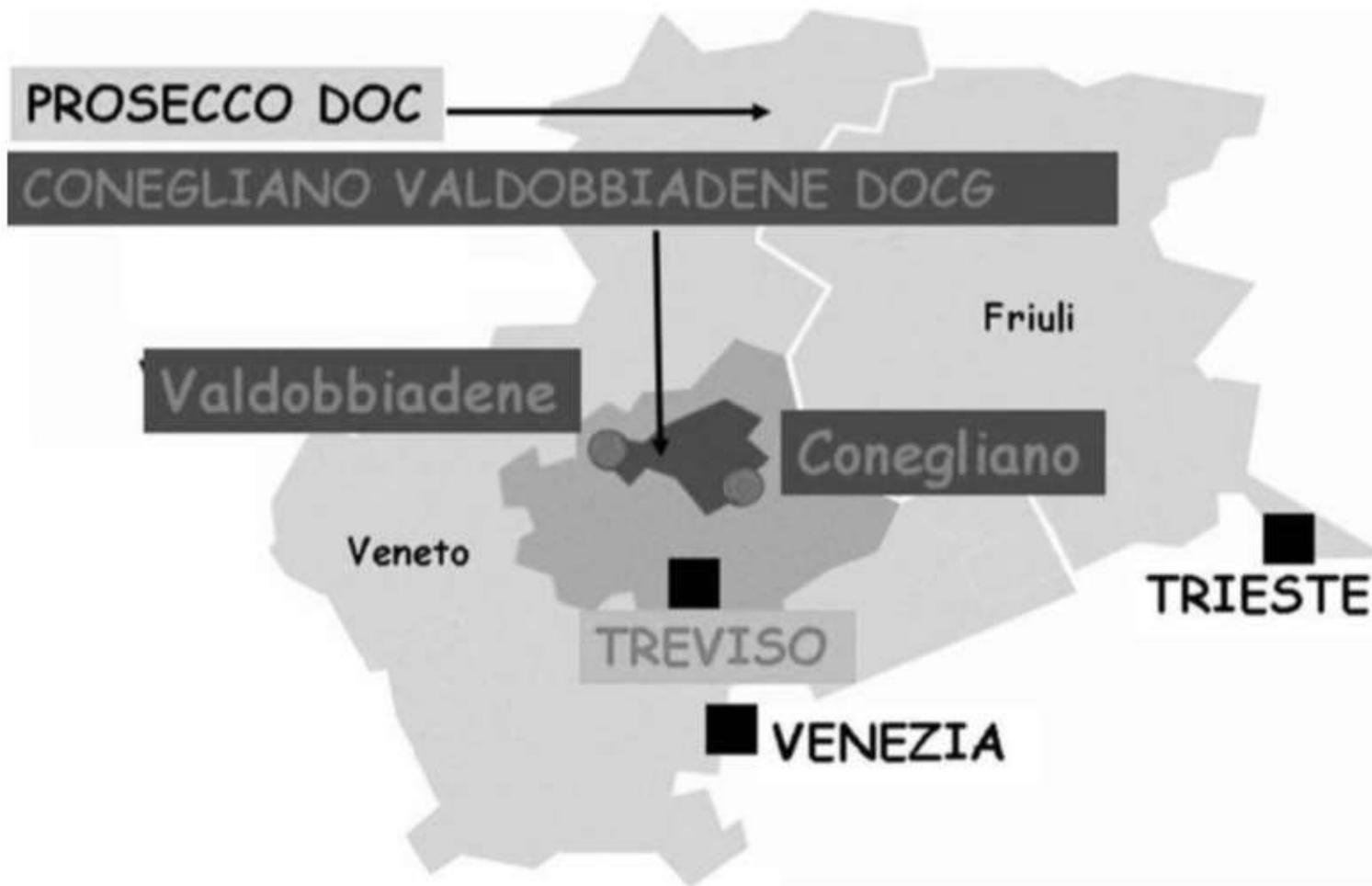
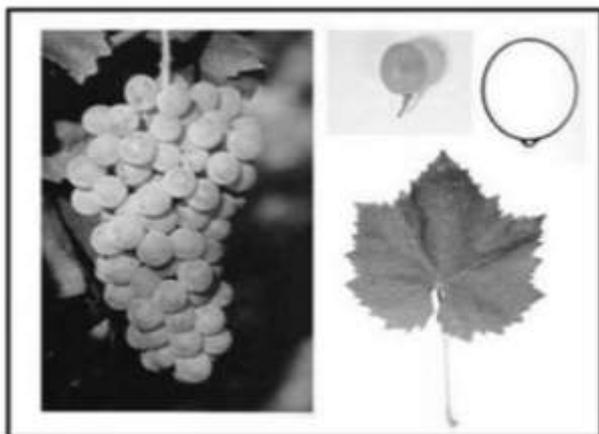


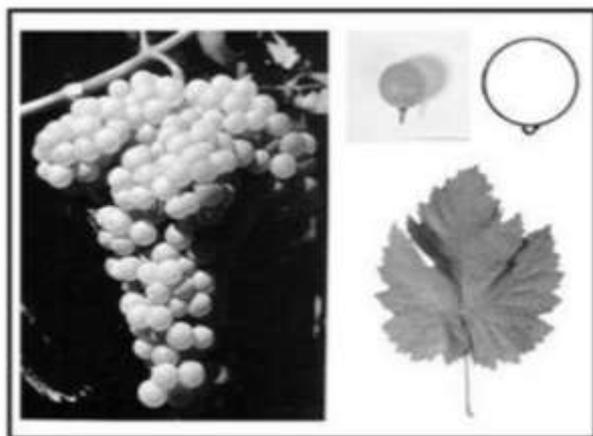
Fig. 1 Prosecco DOC area (Veneto and Friuli Venezia Giulia regions) and Conegliano Valdobbiadene DOCG area (Treviso hills, Veneto region, Italy)



**ANALISI
VARIETALE
PROSECCO**



Prosecco lungo

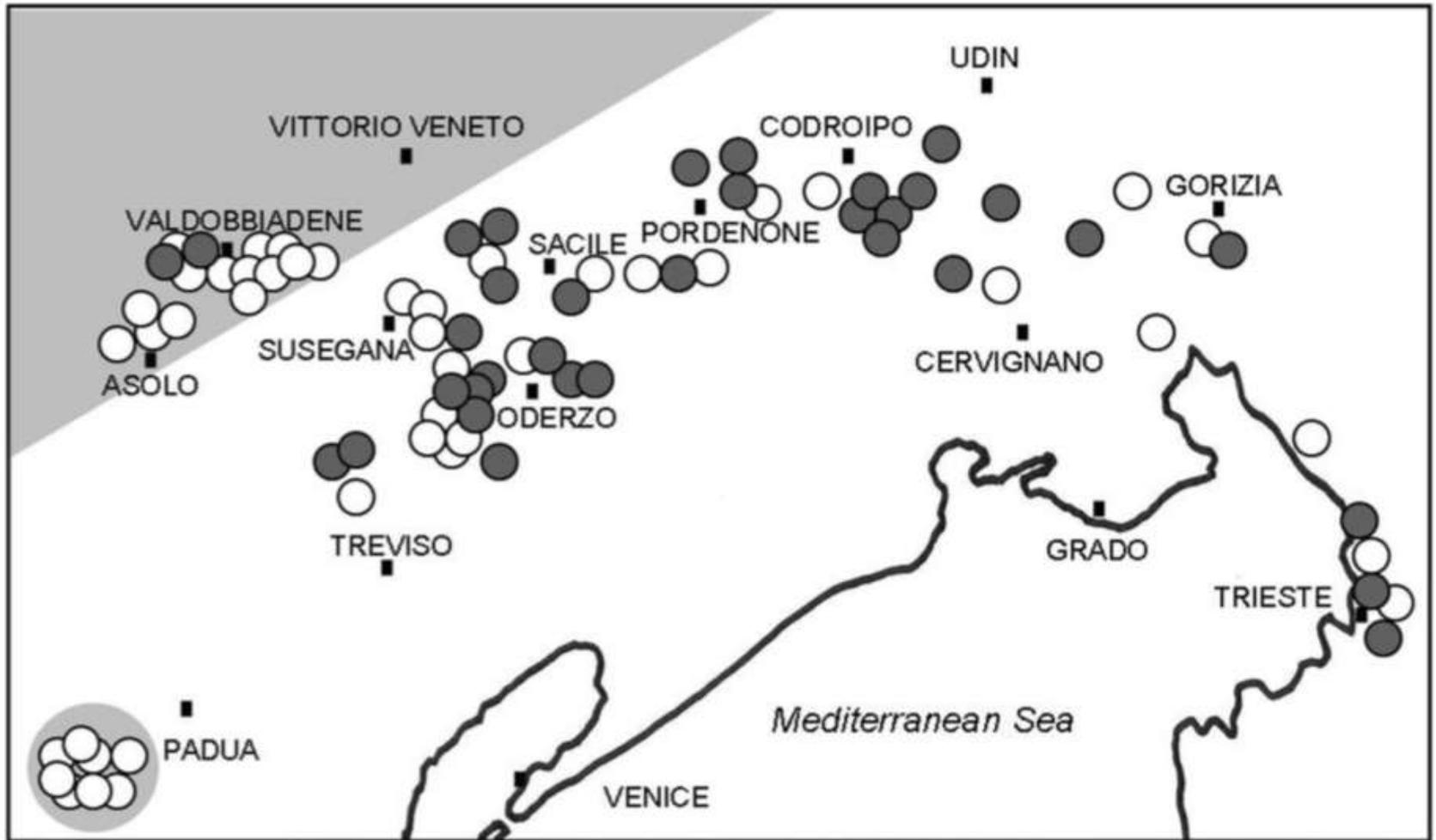


Prosecco tondo

Loci SSR		Prosecco tondo		Prosecco lungo	
1	VVS1*	181	181	183	190
2	● VVS2	133	143	133	143
3	VVS29*	171	171	171	179
4	● VVMD5	226	246	226	246
5	● VVMD7	239	247	239	247
6	VVMD24*	214	218	214	219
7	VVMD26	249	251	249	251
8	● VVMD27	179	194	179	194
9	VVMD28	239	247	239	247
10	VVMD32*	263	265	257	273
11	● VrZAG62*	187	203	187	193
12	VrZAG64*	143	163	163	163
13	● VrZAG79	248	258	248	258
14	VrZAG83*	188	194	190	194
15	VMC6E1*	141	151	141	167
16	VMC6F1	133	139	133	139
17	VMC6G1	169	197	169	197
18	VMC2G2	119	125	119	125
19	VMC6E10*	93	119	93	129
20	VMCNG4b9*	166	176	150	158
21	VMC2H9	117	123	117	123
22	VMC1E12	246	250	246	250

* SSR loci that discriminate the two varieties of Prosecco (P. tondo vs P. lungo)

DESCRITTORI OIV



■ HILL
 □ PLAIN

○ Prosecco tondo ● Prosecco lungo

**ANALISI
INTRA-VARIETALE
PROSECCO**



DENDROGRAM OF PROSECCO

PT = Prosecco tondo
 PL = Prosecco lungo

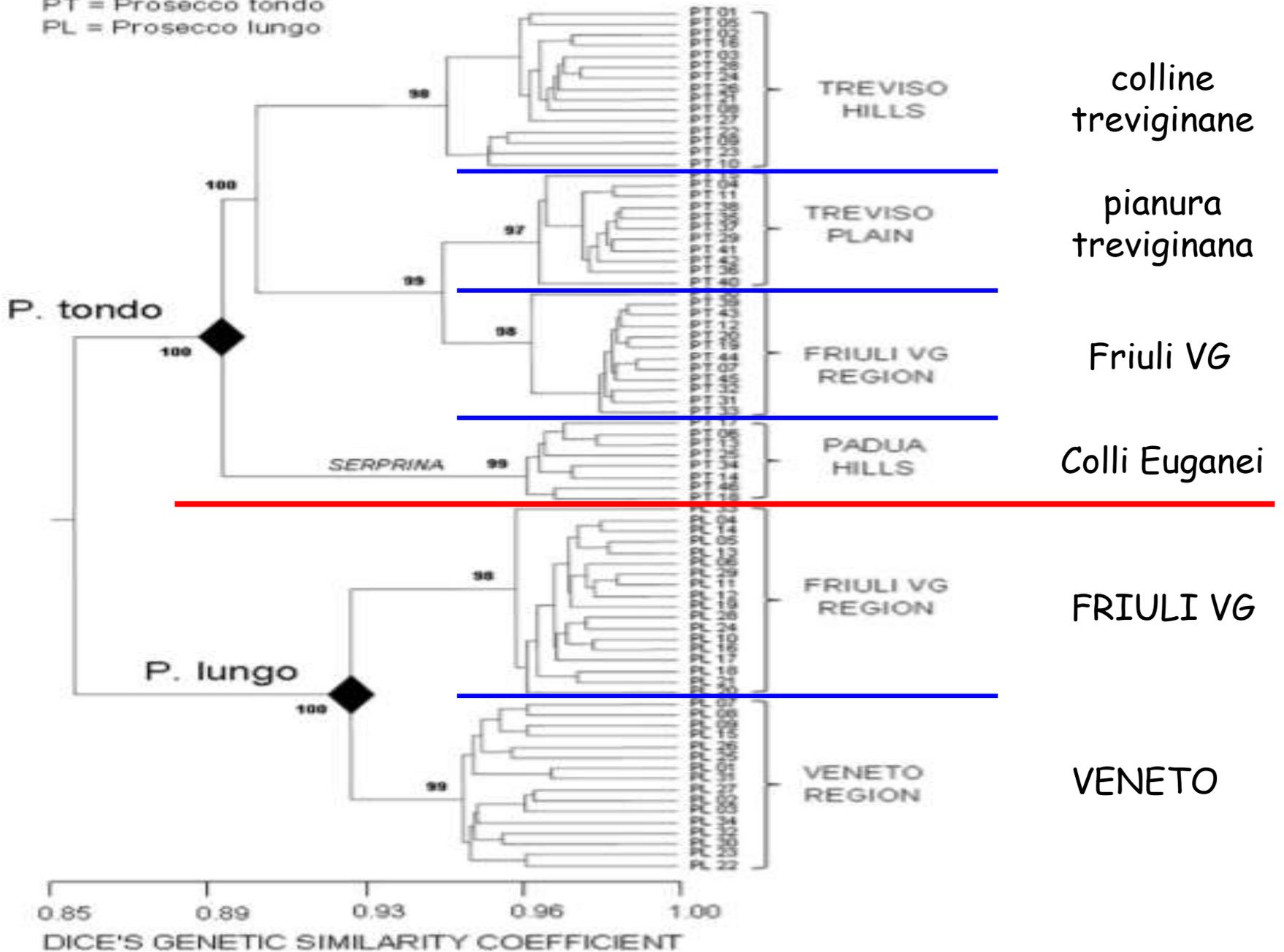
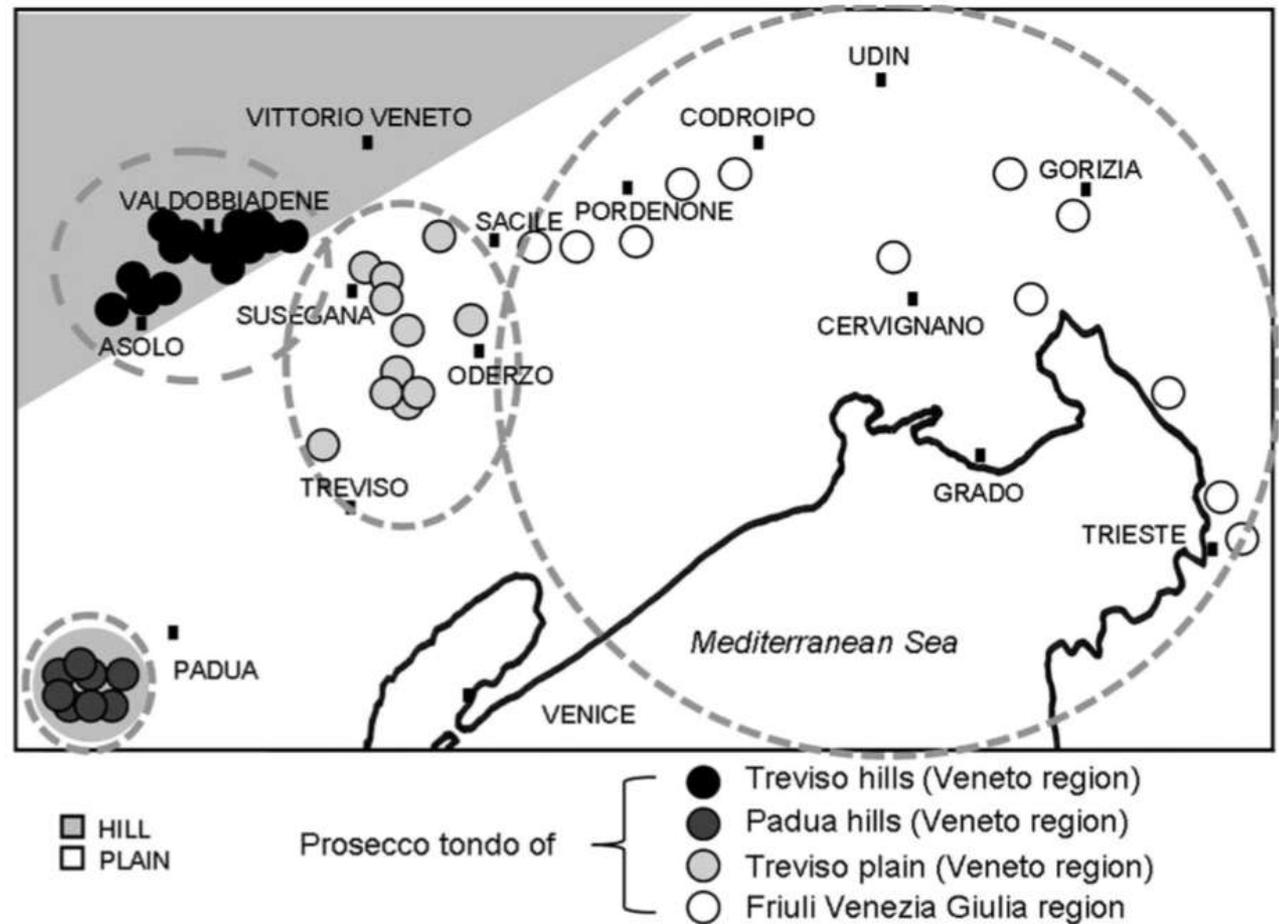
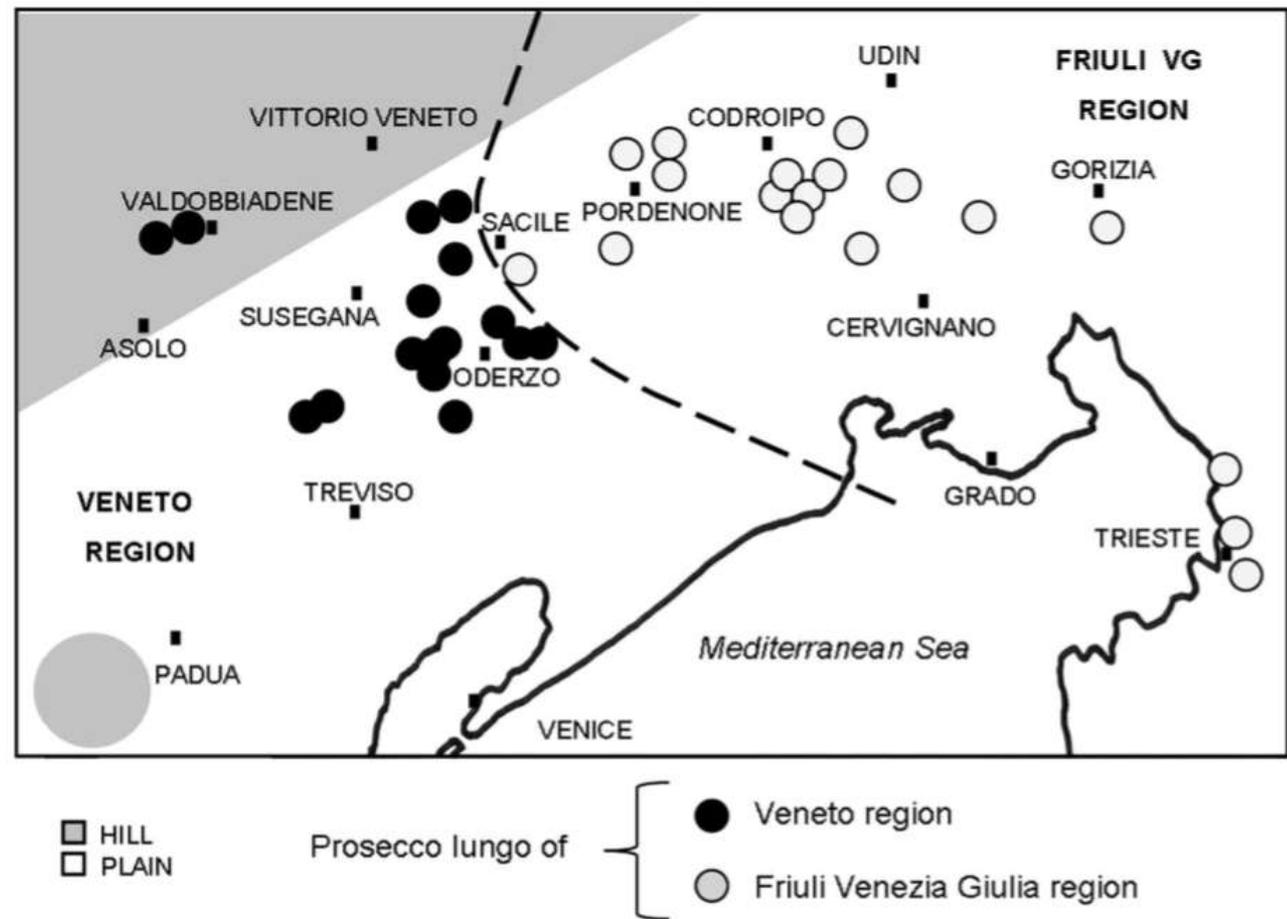


Fig. 7 Geographical map of Prosecco tondo groups. Intra-varietal genetic analyses of Prosecco tondo cultivar show four main groups: Prosecco tondo accessions from Treviso hills (*black*), P. tondo accessions from Padua hills (*dark gray*), P. tondo accessions from Treviso plain (*light gray*), and P. tondo accessions from Friuli Venezia Giulia region (*white*)



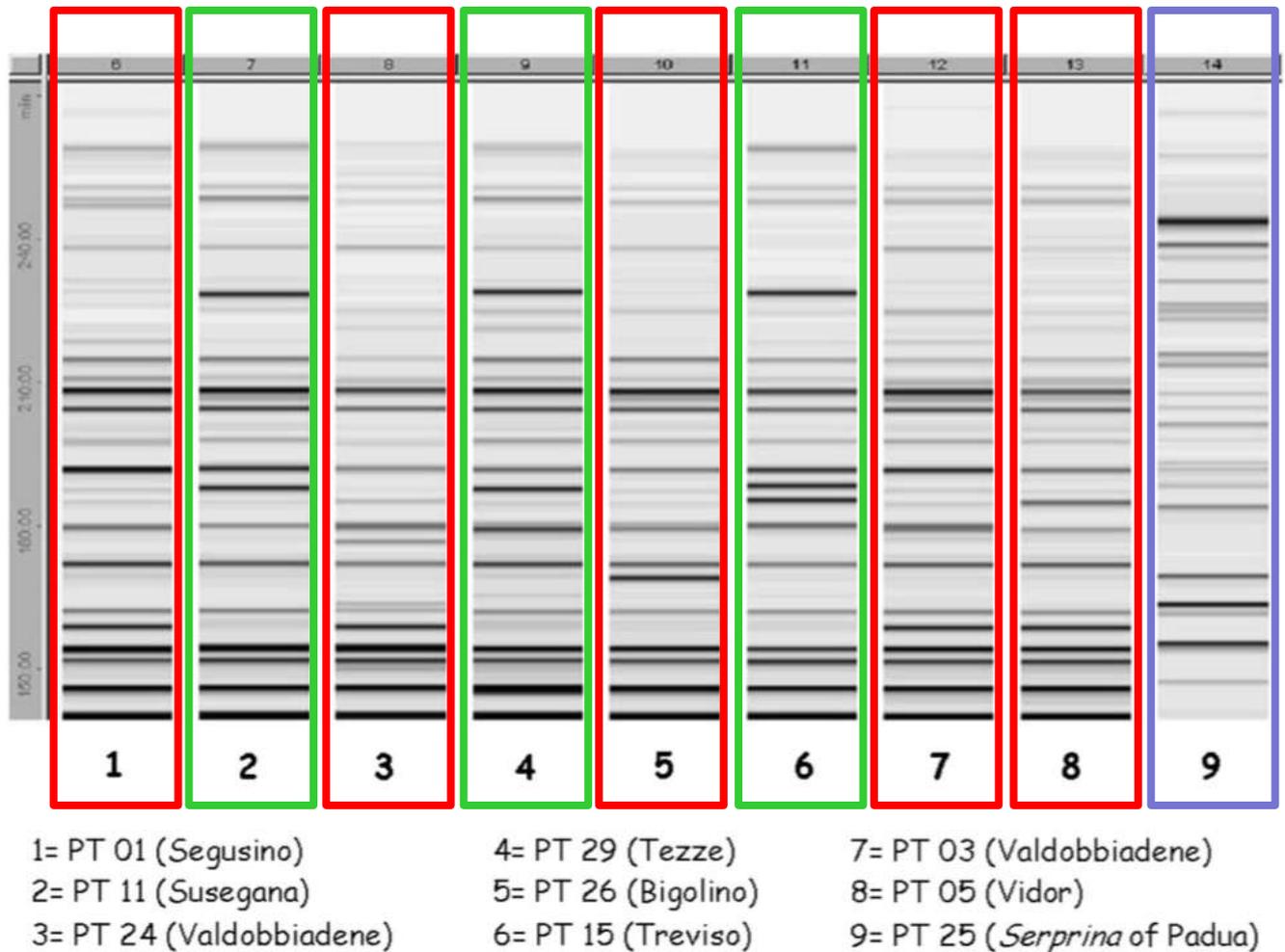
L'analisi intra-varietale ha permesso di discriminare i campioni di **Prosecco tondo** in quattro regioni di provenienza: Colline Asolo-Valdobbiadene-Conegliano, pianura trevigiana, colli padovani e regione friulana

Fig. 8 Geographical map of Prosecco lungo groups. The intra-varietal genetic analyses of Prosecco lungo variety show two main groups which Prosecco lungo accessions from Veneto region (*black*) and Prosecco lungo accessions from Friuli Venezia Giulia region (*light gray*)



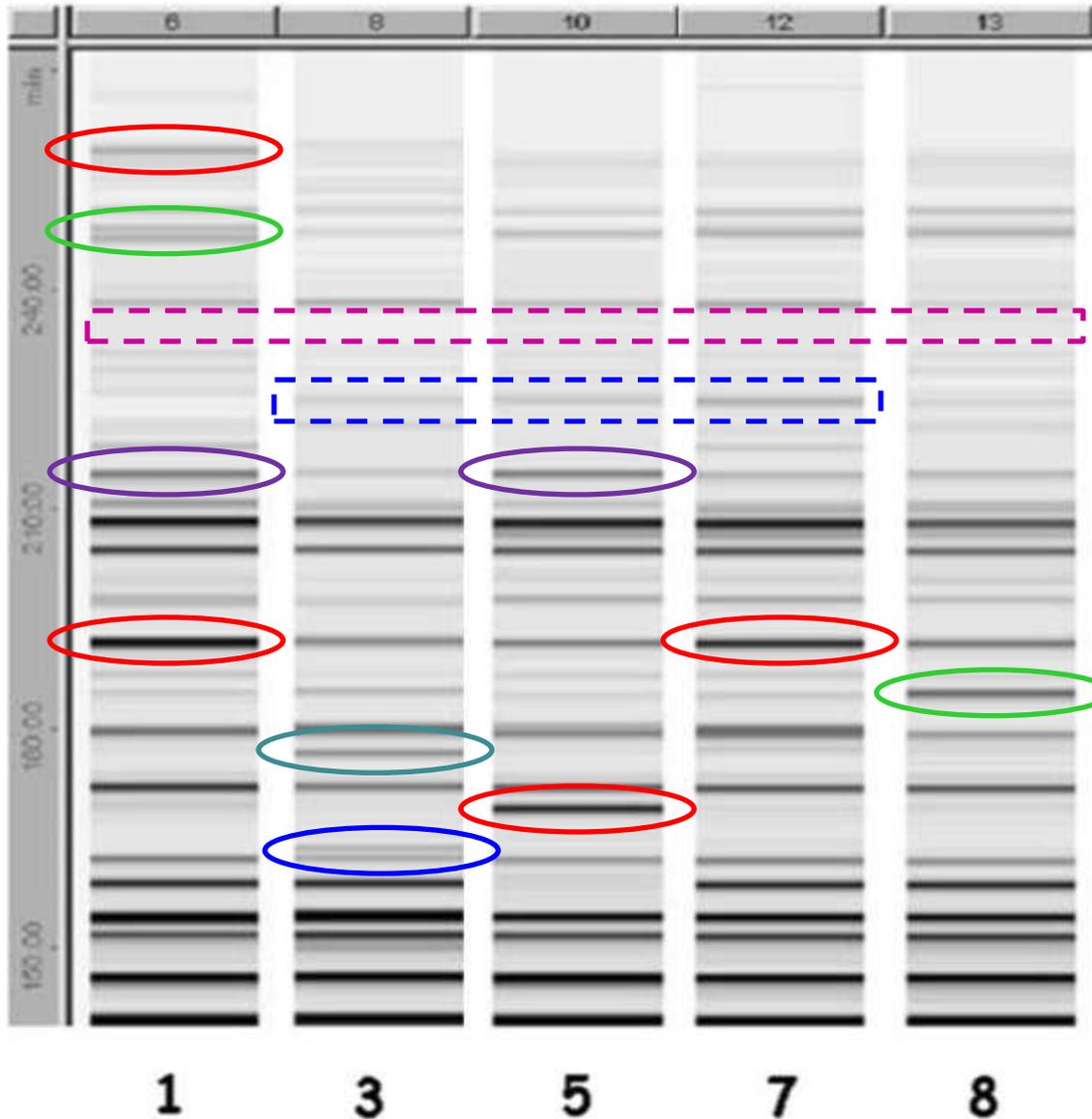
L'analisi intra-varietale ha permesso di discriminare i campioni di Prosecco lungo della zona occidentale (Veneto) da quelli provenienti dalle zone più orientali (Friuli Venezia Giulia)

Fig. 6 Example of a digitalized electropherogram of the SAMPL molecular profiles obtained for nine Prosecco tondo accessions using an ALFexpress-II DNA Automated Sequencer. The molecular profiles show some differences between the Prosecco tondo genotypes relating to their different geographic origins. *Lines 1, 3, 5, 7, and 8* are show very similar profiles (i.e., Prosecco accessions from Treviso hills as Valdobbiadene, Segusino, Bigolino and Vidor) and line 2, 4 and 6 show different typical markers (Prosecco accessions from Treviso plain as Tezze and Susegana), instead *line 9* is very different from the other samples of Prosecco (it is a *Serprina* genotype from the Padua hills— Colli Euganei)



- PROSECCO T. di **SEGUSINO, BIGOLINO, VALDOBBIADENE, VIDOR**
- PROSECCO TONDO di **SUSEGANA, TEZZE, TREVISO**
- PROSECCO TONDO dei Colli Euganei (= SERPRINA)

Prosecco tondo delle colline



ASOLO

VALDOBBIADENE

VIDOR

BIGOLINO

CONCLUSIONI

I marcatori molecolari (SSR) permettono di verificare velocemente l'identità varietale nel vitigno (Prosecco lungo, Prosecco tondo, altri profili di viti prosecche)

I marcatori molecolari che analizzano "simultaneamente tutto il genoma" (AFLP-based, Chl, I-SSR, etc ...) permettono di discriminare i campioni di Prosecco in relazione alla loro differente zona di origine / coltivazione, come già avvenuto in Grenache noir, Garganega, Malvasia nera di BR/LE, Malvasia di Candia, Malvasia Istriana, Negroamaro, Primitivo, Sangiovese, etc

Con questo approccio molecolare è possibile discriminare biotipi di una stessa varietà provenienti da ambienti diversi.

Ciò porta a mettere in evidenza un legame dimostrabile fra genotipo ed ambiente di coltivazione e quindi a dare un fondamento scientifico alla Tipicità dei prodotti.

GRAZIE DELL'ATTENZIONE