

NUOVE METODOLOGIE PER LA IDENTIFICAZIONE DEI VITIGNI

Il TBP è un nuovo metodo di veloce caratterizzazione genetica dei vitigni, in grado di assegnare ad ognuno il suo specifico DNA barcode. Rispetto ad analisi molecolari correnti, basate essenzialmente sui microsatelliti, è più rapido, meno laborioso, più intuitivo, applicabile con successo a viti coltivate e selvatiche. È particolarmente idoneo per la caratterizzazione di collezioni vitivinicole e l'autenticazione delle barbatelle.



Di
Mastromauro Francesco
Depedro Claudia
Gavazzi Floriana
Giani Silvia
Breviario Diego¹

Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria,
IBBA- CNR - Milano

INTRODUZIONE

● Nel 2015 il mercato del vivaismo viticolo ha commercializzato circa 119 milioni di barbatelle. La qualità del materiale vivaistico è fondamentale e si ripercuote su tutto il successivo processo produttivo. Essendo l'identità genetica il maggior determinante della qualità nella viti-vinicoltura moderna, e non essendo l'ampelografia sempre risolutiva nell'identificazione varietale, sono stati messi a punto numerosi sistemi di identificazione basati su marcatori genetico-molecolari. Tra i tanti, un set di 6 diversi marcatori di tipo microsatellite (SSR) in grado di caratterizzare i vitigni, fu originalmente sviluppato e condiviso tra vari laboratori europei (Programma EC Grape Genre06; This *et al.* 2004). Da allora, studi successivi hanno mirato ad innalzare il potere di discriminazione dei marcatori SSR aumentandone il numero e/o la lunghezza dell'unità di ripetizione (Cipriani *et al.* 2010; Diaz Losada *et al.* 2010). Ancor-

ché non validato da uno studio comparativo come quello di This *et al.*, la maggior parte degli studi scientifici odierni attinge ad un pannello composto da 20 diversi marcatori SSR (Laucou *et al.* 2011).

● Il suo potere discriminante delle diverse varietà è elevato ma ciò non di meno rimane legato a meccanismi di ipervariabilità genetica estranei alle caratteristiche agronomiche dei vitigni, all'uso di alleli di riferimento necessari per confermare i risultati dei diversi laboratori, all'allestimento di più reazioni di amplificazione delle sequenze satelliti bersaglio e all'uso di impegnative piattaforme informatiche, in grado di gestire ed elaborare la considerevole mole di dati che viene generata. Nell'ottica di rendere la procedura di identificazione molecolare dei vitigni più snella, comunque affidabile ma meglio applicabile a realtà e laboratori mediamente attrezzati, abbiamo sviluppato un sistema di riconoscimento alternativo denominato TBP (Tubulin Base Polymorphism; Braglia *et al.* 2010). Di ideazione italiana, risulta capace

di garantire appieno l'identificazione delle singole varietà di interesse viti-vinicolo.

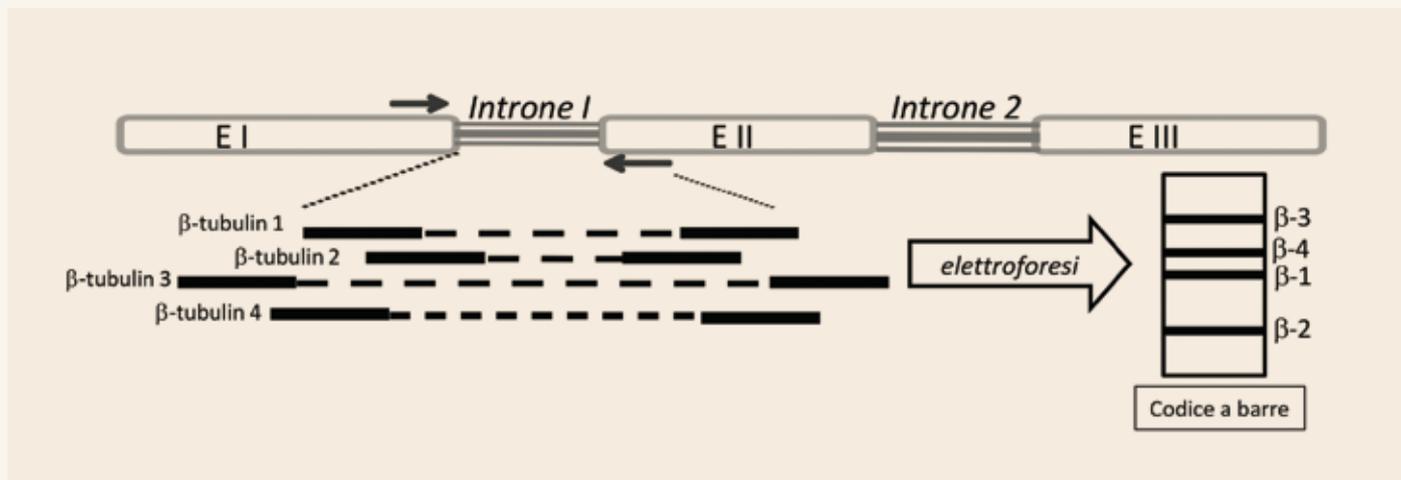
RISULTATI DEL LAVORO

Il metodo TBP: la sua impostazione, i suoi vantaggi.

● Nella sua impostazione, il metodo TBP, per l'attribuzione di un codice a barre di DNA distintivo di specie e varietà, si caratterizza per essere unico, diverso da qualunque altro marcatore o metodo molecolare. Trae infatti origine da una semplice constatazione biologica, a sua volta impiantata su una semplice e regolare organizzazione di alcune regioni del genoma. In sintesi.

● La crescita di ogni pianta avviene anche e soprattutto per divisione cellulare. Negli organismi Eucarioti la divisione cellulare dipende da una struttura, il fuso mitotico, che ha il compito di agganciare e traspor-

Fig. 1 - Amplificazione TBP. Il metodo TBP, che conduce alla produzione di uno specifico codice a barre, usa come fonte di variazione polimorfica la diversa lunghezza degli introni presenti nei geni che codificano per la β -tubulina.



tare i due cromatidi fratelli ai poli opposti della cellula madre dove daranno luogo ai nuovi nuclei delle due cellule figlie. I cromatidi vengono agganciati e trasportati da strutture filamentose che si chiamano microtubuli.

- L'aggancio ed il trasporto ai due poli dei cromatidi prevede un meccanismo di reciproco riconoscimento ad altissima efficienza, fortemente conservato nel corso dell'evoluzione. Qualunque errore nel sistema di riconoscimento e trasporto dei cromatidi fratelli, e dei cromosomi omologhi nella meiosi, comporta errori e mutazioni sostanzialmente incompatibili

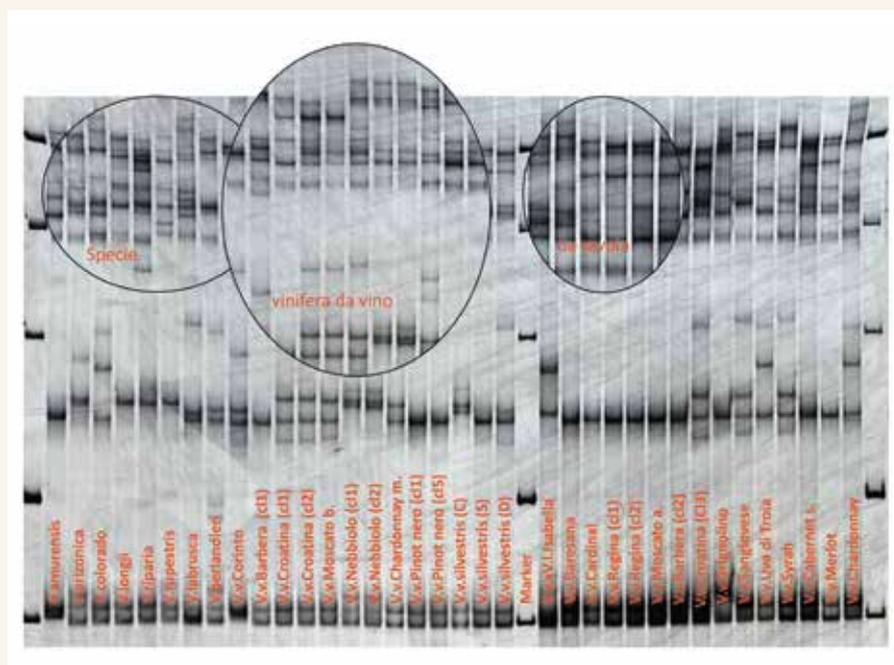
con la vitalità cellulare. Ora i microtubuli sono composti da una proteina dimerica, definita da due subunità polipeptidiche alfa e beta, denominata tubulina. È quindi nella struttura primaria di questa proteina che si annidano i segnali per l'aggancio ai cromatidi, mediato anche da altre proteine ancillari. Ne consegue che se il sistema è stato conservato dall'evoluzione per la sua rimarchevole efficienza, la sequenza aminoacidica primaria della tubulina è pure fortemente conservata tra gli organismi Eucarioti, e lo è tanto più se questi appartengono a regni e phyla vicini tra loro.

- Questa alta omologia aminoacidica si ri-

flette in una corrispondente elevata omologia a livello delle sequenze di DNA che, nel genoma di tutte le piante, codificano per la tubulina. Ogni pianta contiene un numero diverso di geni che codificano per la tubulina. Può variare da 7 a 20 per la catena beta e da 4 a 8 per la catena alfa (Breviario *et al.* 2013). Come predetto, le sequenze codificanti di questi geni, gli esoni, quelle che vengono tradotte in aminoacidi, sono molto conservate tra tutte le piante ma non lo sono le sequenze tra loro intersperse che si chiamano introni (**Fig. 1**).

- Esse variano per numero, perchè riflettono il numero diverso di geni presenti nelle diverse specie, per lunghezza e per sequenza. Il metodo TBP qualitativo, qual è quello presentato in questo articolo, sfrutta il polimorfismo di lunghezza degli introni presenti nei diversi geni che compongono la famiglia delle beta-tubuline presente nel genere *Vitis*. Lo mette in evidenza innescando una reazione di PCR, amplificazione del DNA bersaglio, in prossimità della sorgente di variazione, l'introne per l'appunto. In tutti i casi, specie-sottospecie-vitigni-cloni, si tratta verosimilmente di 10 geni, come riportato nella banca dati generata dal sequenziamento del genoma di *V. vinifera sativa*, presenti in forme alleliche molto diverse per numero e dimensioni. Questa diversità genera codici a barre esclusivi (**Fig. 1**).

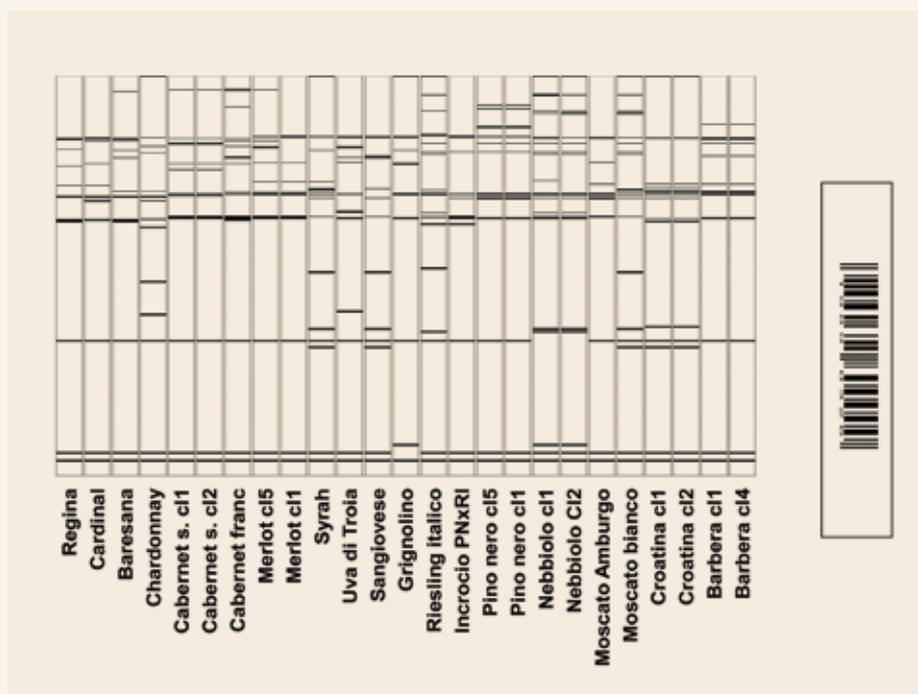
Fig. 2 - Profilo genetico ottenuto attraverso il TBP di 36 diverse accessioni del genere *Vitis*. La risoluzione dei frammenti è stata ottenuta per PAGE (elettroforesi su gel di poliacrilammide).



Applicazione del metodo TBP alla caratterizzazione genetica dei vitigni

- Abbiamo applicato concetto e metodo TBP all'analisi del profilo genetico, recuperabile a diversi livelli tassonomici, del

Fig. 3 - Codice a barre TBP di 25 diverse accessioni di *Vitis vinifera sativa*.



genere *Vitis*: specie (inclusive di alcuni portainnesti), sottospecie (*V. sativa* e *V. silvestris*), vitigni e cloni. Il DNA utilizzato per la ricerca del profilo genetico è stato estratto da porzioni di foglia recuperate da tre individui della stessa accessione opportunamente classificata da Riccagioia SCPA (PV) cui vanno i nostri sentiti ringraziamenti. Le tre estrazioni di DNA sono poi state unite in un unico campione da sottoporre all'analisi. Come illustrato in Fig. 2, e meglio schematizzato in Fig. 3 dove sono riportati i profili genetici dei soli vitigni, ogni campione analizzato con il metodo TBP ha rilasciato un suo specifico codice di DNA a barre con la sola eccezione dei cloni che hanno un profilo sostanzialmente identico. Il numero delle bande amplificate, che può andare da 10 a 17, riflette il diverso grado di allelismo presente nei diversi loci di β -tubulina. Le dimensioni dei frammenti amplificati vanno da circa 350 coppie di basi a più di 1500 coppie di basi segnalando la presenza di introni che, tenuto conto del disegno sperimentale che comporta l'amplificazione delle corte sequenze esoniche fiancheggianti, hanno dimensioni di poche decine fino a 1200 coppie di base. Si osserva il prevalere di introni a dimensioni molto lunghe, certamente atipiche per la dimensione media degli introni presenti nei genomi vegetali che si attesta verso le 200 coppie di base.

Come anticipato, la capacità risolutiva del metodo TBP è completa fino al livello di clone dove, al contrario, i profili genetici non cambiano fatta salva la sporadica presenza di una, massimo due bande di differenza che possono a loro volta essere utili riferimenti di riconoscimento, clonale in questo caso.

Abbiamo confrontato il livello di informazione filogenetica ottenibile dal metodo TBP con quello del set di marcatori SSR utilizzato nel test di confronto tra laboratori europei. Tutti gli indici di diversità genetica da noi raccolti (cluster analisi, indici di correlazione, PCA, PIC) dimostrano che il metodo TBP è almeno egualmente affidabile rispetto a quello basato sull'uso dei marcatori multipli di tipo SSR. Tuttavia quando utilizzati, gli SSR hanno richiesto n. 6 diverse reazioni PCR (n. 1 per ogni SSR per ciascun vitigno in esame) così da poter acquisire il minimo di informazioni distintive previsto e proposto dall'O.I.V. (Organisation International de la vigne et du vin) mentre con la metodologia TBP è stata sufficiente una sola reazione PCR per vitigno, per ottenerne il suo specifico profilo genetico. In particolare il TBP ha evidenziato sia specifiche differenze tra le specie appartenenti al genere *Vitis*, che importanti e significative differenziazioni e relazioni tra le diverse varietà di *Vitis vinifera*.

I profili genetici acquisiti possono anda-

re a far parte di una semplice banca dati, facilmente aggiornabile con l'inserimento di nuovi profili. L'elaborazione statistica dei risultati ottenuti con il TBP rende possibile ottenere un 'Barcode' identificativo del vitigno o dell'accessione analizzata.

Oltre ad un minor lavoro e ad una maggiore facilità di gestione dell'informazione, il metodo TBP presenta un ulteriore vantaggio rispetto all'uso dei marcatori SSR. Può essere utilizzato per la produzione di sonde molecolari vitigno-specifiche che opportunamente disegnate, possono certificare l'identità del vitigno sia nei mosti che nei vini.

Le applicazioni del metodo TBP in ricerca e vitivinicoltura

Stante le sue caratteristiche ed un livello di affidabilità non dissimile da quello provveduto dall'uso dei marcatori di tipo SSR, il metodo TBP può essere utilizzato nell'ambito delle seguenti applicazioni che possiamo distinguere tra quelle indirizzate al settore ricerca e quelle con ricadute applicative nel settore vitivinicolo (Fig. 4).

Settore ricerca: caratterizzazione genetica delle collezioni di germoplasma di vite; risoluzione dei casi di sinonimia e/o omonimia di vitigni presenti nel Registro Nazionale delle Varietà di Vite; studio delle relazioni genetiche tra le diverse varietà e ricostruzione della filogenesi viti-vinicola.

Settore produttivo: integrazione con barcode delle informazioni necessarie all'identificazione del materiale di moltiplicazione; garanzia per i prodotti dei nuclei di premoltiplicazione, dei costitutori, dei vivaisti; verifica dell'identità genetica del vitigno sia su barbatella che su pianta adulta; risoluzione di problemi di identificazione varietale.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Questo articolo ha inteso portare a conoscenza il mondo della produzione vitivinicola e quello della ricerca ad esso collegato, dell'esistenza di una metodologia di identificazione genetica dei vitigni, e più in generale di tutte le accessioni del genere *Vitis*, che si basa sul metodo TBP. Si tratta di un sistema che, a parità di informazione genetica, è più semplice e meno impegnativo per la registrazione e la gestione dei dati di quanto siano quelli basati sull'uso

Fig. 4 - Illustrazione dei diversi campi di applicazione del metodo TBP.

TBP e ricerca

collezioni e biodiversità



omonimia e sinonimia



pignoletto

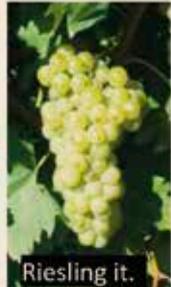


grechetto

↔

relazioni genetiche





Pinot nero
PNxRI
Riesling it.

applicare il TBP

identità genetica




garanzia nuclei premoltiplicazione



certificazione integrativa



registro nazionale varietà vite



portinnesto varietà

di plurime sequenze SSRs. Se ne ricava un utile e rappresentativo codice a barre di DNA che può determinare un ulteriore vantaggio a favore di una maggiore garanzia commerciale.

BIBLIOGRAFIA

- Braglia L., Manca A., Mastromauro F. and Breviaro D. (2010), cTBP: A Successful Intron Length Polymorphism (ILP)-Based Genotyping Method Targeted to Well Defined Experimental Needs. Diversity, 2: 572-585.
- Breviaro D., Gianì S. and Morello L. (2013), Mul-

tiple tubulins: evolutionary aspects and biological implications. Plant J, 75: 202-218. doi:10.1111/tj.12243.

- Cipriani G., Spadotto A., Jurman I., Di Gaspero G., Crespan M., Meneghetti S., Frare E., Vignani R., Cresti M., Morgante M., Pezzotti M., Pe E., Policriti A., Testolin R., (2010) The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. Theor Appl Genet 121:1569-1585.
- Díaz Losada E, Tato Salgado A, Ramos-Cabrer AM, Río Segade S, Cortés Diéguez S and Pereira-Lorenzo S (2010) Twenty microsatellites (SSRs) reveal two main origins of variability in grapevine cultivars from Northwestern Spain. Vitis 49:55-62.

- Laucou V., Lacombe T., Dechesne F., Siret R., Bruno J.P., Dessup M., Dessup T., Ortigosa P., Parra P., Roux C., Santoni S., Varés D., Peros J.P., Boursiquot P. (2011) This High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. Theor Appl Genet 122:1233-1245.
- This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G.S., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibanez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhaes R., Meredith C.P., Milani, N. Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E. (2004), Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivar, Theor Appl Genet 109: 1448-1458.