



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
DIPARTIMENTO DI AGRARIA
CORSO LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE**

**UTILIZZO DEI MARCATORI MOLECOLARI
NELLO STUDIO DELLA VARIABILITÀ DELLA VITE**

Relatore:

Prof: Maurizio Mulas

Correlatore:

Dott. Maria Pia Rigoldi

Elaborato finale di:

Elena Gaias

Anno accademico 2015-2016

Alla mia famiglia

RIASSUNTO

Questo lavoro di ricerca è stato effettuato su un gruppo di vitigni minori a bacca bianca riconducibili al Taloppo o Galoppo per identificarne la vicinanza genetica con altre cv.

Le analisi genomiche riguardanti i vitigni sono state svolte nel Laboratorio di Biotecnologie Vegetali (Platamona, SS) nell'ambito del progetto A.K.I.N.A.S., della durata di tre anni. Le analisi genomiche sono state effettuate con l'utilizzo dei marcatori molecolari microsatelliti secondo la metodologia proposta dall'OIV con lo scopo di confrontare le cv autoctone ed eliminare le omonimie e le sinonimie attualmente presenti.

Il Galoppo è una 'vecchia' varietà di vite da tavola; attualmente è diffusa in buona parte della Sardegna.

Dalle analisi effettuate sulla varietà si è scoperta la sua corrispondenza genetica con 24 cv, riconducibili tutte alla cv spagnola Valenci blanco, di cui 20 sono da considerarsi probabili sinonimi mentre 4 sono falsi omonimi di cultivar geneticamente distanti.

ABSTRACT

This research work has been accomplished on a group of minor white berry vines, referable to the Taloppo or Galoppo, to identify the similarity under the genomic feature with other cultivar.

Genomic analysis about the vines were performed at the head office Biotechnology of Platamona Agris Agliadò within the A.K.I.N.A.S., 3-years project.

Genomic analysis were performed employing microsatellite molecular markers as proposed by the methodology suggested by the OIV, in order to compare the native cultivars and individuate homonyms and synonymies currently present.

Galoppo is an 'old' table grapevine currently widespread in Sardinia.

The analysis on varieties discovered the genetic proximity of 24 cultivars, all of them with the same SSR profile as the Spanish cultivar Valenci blanco: out of 24, 20 are probable synonyms whereas 4 are false homonym of other genetically distant cultivars.

INDICE

Introduzione	6
Identificazione dell'azienda.....	7
La vite in Sardegna.....	8
Caratteri botanici della vite.....	9
Descrizione del settore produttivo e panorama varietalesardo.....	10
Uso dei marcatori molecolari nello studio delle risorse genetiche della vite.....	11
Descrizione delle attività di analisi biomolecolare	13
Materiali e metodi.....	16
Cultivar esaminate.....	16
Prelievo del materiale.....	18
Estrazione del DNA.....	19
Amplificazione del DNA (PCR).....	25
Elettroforesi su gel	29
Elettroforesi capillare al sequenziatore.....	32
Risultati.....	34
Conclusioni	37
Bibliografia.....	39
Ringraziamenti.....	41

INTRODUZIONE

Durante l'attività di tirocinio, ho acquisito competenze di biologia molecolare, effettuando uno studio pratico sul DNA della vite. L'attività ha riguardato l'utilizzo dei marcatori molecolari nella vite allo scopo di identificare e classificare le varietà autoctone a confronto con alcune varietà di riferimento.

L'attività di tirocinio è stata svolta nel Laboratorio di Biotecnologie Vegetali dell'AGRIS Sardegna e riguarda il progetto A.K.I.N.A.S.

Il progetto AKINAS (Anticas Kastas de Ide pro NovasArratzas de inu de Sardinna, cioè Antiche varietà autoctone di vite per ottenere nuove tipologie di vino in Sardegna), è stato finanziato all'AGRIS dalla Regione Sardegna. Esso è nato con l'obiettivo di caratterizzare e recuperare vitigni autoctoni minori e di ottenere da essi nuovi prodotti enologici; da ciò l'esigenza di confrontare le varietà sotto gli aspetti ampelografici e genetici per eliminare le omonimie e le sinonimie nate nel corso degli anni.

Le analisi genetiche con i marcatori molecolari microsatelliti (SSR) ha consentito di classificare e raggruppare le varietà in base al loro profilo genetico. Il progetto prende in esame circa 500 varietà.

Identificazione dell'azienda

L'Agris Sardegna è l'agenzia della Regione Sardegna per la ricerca scientifica, la sperimentazione e l'innovazione tecnologica in campo agricolo. Il compito dell'azienda è di favorire lo sviluppo rurale sostenibile; favorire lo sviluppo dei settori agricolo, agroindustriale e forestale; tutelare e valorizzare le biodiversità e ampliare la propria competitività nel campo della ricerca.

L'Agris svolge compiti di ricerca in agricoltura secondo quanto definito dalla legge istitutiva dell'8 agosto 2006 n. 13 e delle norme dello Statuto dell'Agenzia.

L'azienda Agris Sardegna di Platamona è situata nel comune di Sassari, ubicata sulla Strada Provinciale Sorso Li Pidriazzi. L'azienda svolge attività di ricerca nell'arboricoltura, studia il miglioramento genetico delle specie arboree, valorizza la biodiversità della vite e di specie frutticole e agrumicole; inoltre studia l'utilizzo di nuove tecniche per la valorizzazione e la propagazione e la diffusione di nuove varietà e nuove tecniche per il risanamento e la propagazione di materiale genetico di valore e autoctono; gestisce il patrimonio aziendale svolgendo lavori a supporto dell'attività sperimentale e provvede alla relativa gestione tecnico-amministrativa dei servizi generali (Sardegnaagricoltura.it, 2016).

L'azienda è suddivisa in tre corpi aziendali (Agliadò, Lizzos e Russeglija) per un totale di 48 ettari impiantati a frutteti, vigneti e agrumeti, un parco macchine e un centro di biotecnologie vegetali, all'interno della quale si trovano gli uffici, il laboratorio, una biblioteca ed una cella riscaldata e illuminata per la propagazione del materiale (Fig. 1).

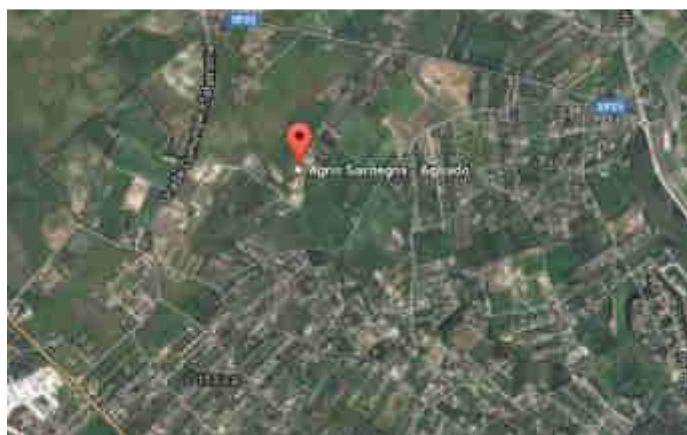


Figura 1. Localizzazione del centro aziendale di Agris ad Agliadò.

La vite in Sardegna

Sino ad oggi i dati archeobotanici e storici attribuivano ai Fenici (intorno all'800 a.C.) e successivamente ai Romani, il merito di aver introdotto la vite domestica nel Mediterraneo occidentale. La scoperta di semi di vite risalenti al XV secolo a.C. è segno della presenza della coltura della vite fin dai tempi più antichi. Gli ultimi ritrovamenti importanti risalgono al 2002, con il ritrovamento dei vinaccioli conservati per anni nel sito di Duo Nuragus di Borore e al 2015 con i ritrovamenti di semi di Vernaccia e Malvasia risalenti a circa tremila anni fa ritrovati nel pozzo che faceva da 'frigorifero' a un nuraghe nelle vicinanze di Cabras in località Sa Osa. La prova del carbonio 14 effettuata dal Centro conservazione biodiversità dell'Università di Cagliari conferma la datazione e fa ritenere che la coltura della vite nell'Isola fosse conosciuta sin dall'età del bronzo(Repubblica, 2015) .In Sardegna la vite è parte integrante del paesaggio rurale, ed è presente quasi ovunque dalle zone costiere, alle pianure alle zone più interne di montagna. Dagli anni '50 ad oggi c'è stata una drastica riduzione delle superfici vitate che sono passate da circa 100.000 ettari a circa 26.500 ettari. Con la diminuzione delle superfici coltivate, la filiera viticola si è riorganizzata e ha puntato sulla produzione di uve alta qualità (CONVISAR, dati LAORE 2009).

Le scoperte archeologiche degli ultimi anni e le potenzialità della biologia molecolare permettono oggi di affrontare il problema dell'origine dei vitigni sotto una diversa prospettiva, partendo dalle determinazioni dei rapporti genetici di parentela tra vite selvatica (*Vitis vinifera* L. ssp. *silvestris*) e vite domestica (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*). Diverse sono le caratteristiche distintive tra queste due sottospecie: la vite selvatica cresce spontaneamente nei corsi d'acqua dei Paesi che si affacciano nel bacino del Mediterraneo ed è una specie dioica con una rara presenza (5%) di individui ermafroditi, mentre la vite coltivata predilige ambienti aridi ed è caratterizzata da fiori capaci di auto fecondarsi(Lovicu G., 2008).

Caratteri botanici della vite

La vite coltivata appartiene alla specie *Vitis vinifera* L. della famiglia delle Ampelidacee, è originaria del Caucaso ma si è diffusa principalmente nell'ambiente mediterraneo. Il genere *Vitis* comprende numerose altre specie di origine asiatica e americana.

Esistono ancora delle tipologie selvatiche che corrispondono alla tipologia ancestrale (*Vitis vinifera* L. ssp. *silvestris*) da cui la forma coltivata è stata selezionata. La vite è una pianta legnosa, sarmentosa, con apparato radicale avente portamento diverso a seconda del portainnesto. I rami, detti tralci, hanno nodi e internodi con midollo spugnoso. Le foglie sono palmate, lobate, ampie, con seno peziolare più o meno profondo, seghettate o meno.

I fiori sono ermafroditi, a grappolo, emessi dalle gemme miste, l'impollinazione è prevalentemente autogama cleistogama, cioè avviene all'interno dell'ovario.

I frutti sono bacche, detti acini, di varie forme dimensioni e colore, e possono contenere vinaccioli o essere apireni. Portati dal raspo, vanno a costituire il grappolo.

Gli stadi fenologici della vite sono: gemma dormiente, gemma cotonosa, inizio germogliamento, punte verdi, prima foglia distesa, tre foglie distese, grappolini visibili, grappolini separati, bottoni fiorali separati, inizio fioritura, piena fioritura, fine fioritura, allegagione, ingrossamento acini, inizio chiusura grappolo, chiusura grappolo, invaiatura, maturazione, senescenza, dormienza (Thereef.it, 2014).

Descrizione del settore produttivo e panorama varietale sardo

In Sardegna il settore produttivo delle uve da vino si estende per 26.500 ettari, includendo circa 70 varietà da vino, a cui si aggiungono 140 ettari e 25 varietà di uve da tavola. La produzione di vini è intorno ai 500.000 ettolitri. Le varietà a bacca rossa rappresentano il 70% del patrimonio varietale sardo.

Attualmente i vitigni appartenenti al patrimonio varietale sardo iscritti al Registro nazionale sono 26 e sono distribuite su 22.500 ha (l'85% dell'intera superficie vitata); tra questi vitigni solo sei occupano il 74% dell'intera superficie coltivata: il Cannonau, che è la varietà a bacca rossa più coltivata, con 8.000 ettari, seguito da Monica (circa 3800 ettari), Carignano (circa 1800 ha) e Pascale; fra i vitigni a bacca bianca i più coltivati sono il Vermentino (con 3.300 ha) e il Nuragus (1.800 ha). I restanti 4000 ettari sono coltivati con varietà minori (7%) e varietà nazionali/internazionali per un totale complessivo di 97 vitigni da vino. I dieci vitigni minori tradizionali della Sardegna sono: Bovale sardo, Cagnulari, Barbera sarda, Nieddera, Girò, Vernaccia, Malvasia, Moscato, Torbato e Nasco.

Tra i vitigni extra-regionali le varietà più rappresentative sono: Sangiovese, Cabernet, Sauvignon, Merlot, Montepulciano, Nebbiolo e Syrah, che superano i cento ettari cadauno di coltivazione e rappresentano il 73% dei vitigni non tradizionali dell'Isola.

Il vigneto in Sardegna è molto frammentato: attualmente ci sono 38.000 produttori con una superficie media aziendale al di sotto di un ettaro.

La maggior intensità di coltivazione la troviamo in pianura seguita dalla collina e in piccola percentuale anche in montagna.

Le forme di allevamento più diffuse sono la spalliera-Guyot, l'alberello e la spalliera a cordone speronato. In minor superficie prevalgono le forme di allevamento in orizzontale chiamate pergola e tendone (Nieddu G., 2011).

Uso dei marcatori molecolari nello studio delle risorse genetiche della vite

L'ampelografia è un ramo delle scienze viticole che si propone di descrivere le caratteristiche dei vitigni, con lo scopo di identificare le diverse varietà o specie e quindi renderne possibile il riconoscimento.

L'ampelografia si basa sullo studio degli organi dal punto di vista fenotipico tramite le analisi fillometriche e carpometriche, che prendono in esame descrittori dell'O.I.V (Office Internat. de la Vigne et du Vin, 2001).

Il numero delle varietà viticole presenti nel mondo è stato stimato attorno a 9500 cultivars (Maul E., Eibach R., 2003), mentre quasi 16000 nomi compaiono nel catalogo internazionale delle varietà di *Vitis* (Galet P., 2000): ciò perché alcune di queste, distribuite in tutto il mondo, hanno assunto diversi nomi seppur difficilmente distinguibili morfologicamente e risultando perciò sinonimi (Rao V., et al., 2014). Ciò rende estremamente difficile operare un'identificazione mediante le sole caratteristiche morfologiche, anche perché il fenotipo delle piante è fortemente influenzato dall'ambiente e dal loro stato nutrizionale e sanitario. L'ampelografia è stata quindi affiancata da nuovi metodi di identificazione varietale che si basano sull'analisi del DNA; in particolare ci si basa sull'analisi dei marcatori molecolari, frammenti di DNA che possono essere rilevati attraverso sonde o primers specifici. L'analisi dei marcatori molecolari prevede di identificare le variazioni, esistenti fra varietà, della sequenza nucleotidica dei marcatori stessi; in questo modo è possibile evidenziare il polimorfismo genetico. Maggiore sarà il numero di polimorfismi associati ad un marcatore, migliore sarà il potere discriminante del marcatore stesso e più precise saranno le informazioni fornite (Diliberto G., 2015). Più elevato sarà il numero di marcatori utilizzati maggiore sarà la veridicità dei dati ottenuti. Per ottenere dati più precisi occorre analizzare un numero crescente di loci genetici, teoricamente sino a quando i valori di diversità genetica non raggiungono un valore costante.

Attualmente esistono vari tipi di marcatori che si differenziano in base al tipo di sequenze analizzate e alla tecnica utilizzata. Alcuni marcatori (RFLP) sono basati sui metodi di ibridazione tipo "Southern", mentre altri (RAPD, AFLP e SSR) sono basati sulla "Reazione a Catena della Polimerasi".

I microsatelliti o SSR (Simple Sequence Repeat) sono i marcatori molecolari più usati per l'identificazione varietale. Gli SSR sono formati da corte sequenze di DNA, costituite da 2-5 paia di basi tipo $-(CA)_n$, $(GCC)_n$, $(GATA)_n$ ecc. (dette "motivo") - replicate un numero variabile di volte (Nieddu G., 2011).

Attraverso l'utilizzo di primers specifici e complementari alle regioni fiancheggianti gli SSR, è possibile amplificare questi ultimi e renderli rilevabili attraverso tecniche elettroforetiche. I microsatelliti differiscono fra varietà per il numero di volte in cui il motivo è ripetuto. Gli SSR sono una classe di marcatori molecolari capaci di mettere in evidenza all'interno delle popolazioni analizzate una diversità genetica difficilmente rilevabile con gli altri tipi di marcatori, poiché i polimorfismi sono localizzati in zone ipervariabili e non espresse dal genoma (Digital Ink Rovigo, 2016).

In ogni caso, visto il notevole numero di varietà di vite esistenti l'analisi SSR è di grande aiuto all'ampelografia, perché semplifica e velocizza notevolmente i chiarimenti di omonimie e sinonimie, consentendo un risparmio straordinario di tempo e di risorse (Unipv.it, 2016).

Sei marcatori SSR sono attualmente inseriti fra i descrittori O.I.V. (si vedano i materiali e metodi).

Descrizione delle attività di analisi biomolecolare

Prelievo e conservazione del materiale vegetale

Essendo il DNA uguale in tutte le cellule che compongono la pianta, il materiale vegetale di partenza per l'estrazione può essere preso indistintamente da foglie, radici, tralci (Marenghi, 2007). Preferibilmente vengono utilizzate giovani foglie.

Alla raccolta, le foglie, possono essere utilizzate direttamente per l'estrazione del materiale genetico, oppure possono essere conservate in condizioni che riducano al minimo la degradazione del DNA. Tale degradazione può essere ridotta mediante due processi: liofilizzazione, (in quanto il DNA non è idratato e quindi è meno suscettibile alla degradazione) e crioconservazione a -80°C.

Distruzione della parete cellulare e lisi cellulare

Le cellule vegetali sono provviste di una parete cellulare che si rimuove ricorrendo al congelamento in azoto liquido (-80°C) dei tessuti vegetali e alla loro macinazione meccanica.

Al tessuto macinato nella precedente operazione occorre aggiungere il tampone di estrazione, che incentiva la lisi cellulare, e la soluzione che consente l'immobilizzazione delle proteine e dei carboidrati ed il rilascio degli acidi nucleici in soluzione (Docenti.unina.it, 2014).

Estrazione del DNA

Dopo l'eliminazione di proteine e carboidrati la soluzione ottenuta è composta da acidi nucleici e molecole con basso peso molecolare. Per estrarre il DNA dalla soluzione, occorre filtrare e centrifugare il composto con le colonnine di silicio; gli acidi nucleici rimarranno intrappolati all'interno delle colonnine mentre tutte le altre molecole precipiteranno alla base della provetta.

La prima analisi da effettuare ai campioni è svolta mediante l'uso di uno spettrofotometro e serve per determinare la concentrazione e il grado di purezza del DNA.

L'amplificazione del DNA

La Polymerase Chain Reaction è una tecnica di biologia molecolare, utilizzata per amplificare il DNA. Lo scopo della PCR è di produrre un enorme numero di copie di una sequenza specifica di DNA.

Le principali componenti della PCR sono:

il DNA stampo: contiene il frammento da amplificare;

i due primers Forward e Reverse dei marcatori molecolari.

Gli SSR: identificano l'inizio e la fine della regione da amplificare.

La DNA polimerasi: enzima che copia la regione da amplificare, chiamata Taq polimerasi in quanto inizialmente veniva utilizzata quella naturale derivante dal batterio termofilo *Thermusaquaticus*.

I nucleotidi per la sintesi del nuovo DNA: 4 dNTP (DeossinucleotiditriP =trifosfato).

Il buffer, che fornisce l'ambiente ideale per la DNA polimerasi.

L'acqua deionizzata per portare a volume la miscela di reazione.

Il processo della PCR è costituito da tre fasi che si ripetono dalle 30 alle 40 volte:

-Denaturazione a 94°C, durante la quale i due filamenti di DNA si separano;

-Annealing da 50 a 60 °C: in questa fase entrano in azione i due primers (Forward e Reverse) che si agganciano ai loro siti specifici sul filamento stampo. La temperatura varia in base al frammento di DNA che si deve amplificare. I primers che si accoppiano esattamente con il filamento stampo, danno origine a legami più stabili.

-Estensione a 70-75 °C (Elongation). La temperatura di Elongation dipende dalla DNA polimerasi. Durante l'estensione, la polimerasi estende i primers aggiungendo le basi complementari all'estremità 3', ottenendo così 2 copie di DNA a doppio filamento.

E così via, ogni doppio filamento viene denaturato, e il processo ricomincia.

Il gel e l'elettroforesi

Al termine della PCR si effettua l'elettroforesi in gel di agarosio per verificare l'avvenuta amplificazione.

L'elettroforesi avviene con l'introduzione dei campioni nel gel e la successiva immersione del gel in una cella elettroforetica, in cui il campo elettrico attira le molecole di DNA, cariche negativamente, verso il polo positivo.

Per la formazione del gel di agarosio, si utilizza un tampone e la polvere di agarosio disciolto a caldo. Un istante prima di versare il composto nell' apposito stampo occorre aggiungere un colorante rivelatore della fluorescenza, poi si aspettano 30 minuti affinché il gel solidifichi.

Una volta solidificato, il gel deve essere immerso nella apparecchiatura dell'elettroforesi e successivamente ricoperto dal tampone.

Prima di procedere al caricamento del gel all'interno dei pozzetti, occorre unire ai campioni di DNA il Blu di Bromo Fenolo, che funge da tracciante per seguire la corsa elettroforetica dei campioni, che altrimenti sarebbero incolori. Durante il caricamento occorre far attenzione a non contaminare fra di loro i campioni stessi.

Si avvia l'elettroforesi per 15-20 minuti. I campioni inizieranno a migrare verso il basso in base al loro peso molecolare. Al completamento della corsa elettroforetica, il pannello di gel va inserito nel transilluminatore.

Il transilluminatore emette i raggi UV, che vengono riassorbiti dal colorante, il quale riemette la fluorescenza, rendendo visibili le bande degli amplificati. A questo punto si scatta una fotografia del gel con il programma di foto documentazione.

Elettroforesi capillare al sequenziatore

I campioni amplificati con la PCR, vengono analizzati tramite elettroforesi capillare. L'assegnazione dei pesi molecolari ai picchi di fluorescenza rappresentanti gli alleli viene fatta dal software apposito tramite confronto con uno standard di taglia.

Le matrici dei dati molecolari vengono poi elaborate tramite i programmi che restituiscono come output un dendrogramma, cioè una rappresentazione grafica del grado di similarità fra le varietà.

MATERIALI E METODI

Cultivar esaminate

Durante il tirocinio ho analizzato un gruppo di varietà di uva bianca da tavola, in particolare 15 varietà sarde più 4 di riferimento provenienti in parte dalle collezioni Agris in parte da campi esterni. Per eseguire queste analisi sono stati utilizzati 22 marcatori molecolari SSR. I risultati ottenuti sono stati confrontati con i risultati, opportunamente allineati, di cultivar da tavola analizzate da altri laboratori: 15 varietà sarde analizzate dal laboratorio dell'Università Bicocca di Milano, che ha partecipato al progetto AKINAS; e 6 varietà analizzate da laboratori esteri e riportate in un database pubblicato, di cui tre (Italia, Annamaria e Sultanina) sono state analizzate anche da me e sono servite da controllo per allineare i dati fra il laboratorio di Agrise i dati bibliografici (Tab. 1).

Tabella 1. Varietà di vite esaminate durante il tirocinio.

Varietà analizzate durante il tirocinio nel laboratorio Agris		Varietà analizzate dal laboratorio Università Bicocca (MI), i cui dati sono stati allineati ai nostri		Varietà riportate in bibliografia i cui dati sono stati allineati ai nostri	
1	Agaloppo di Jerzu	1	Agrustu di Orgosolo	1	Annamaria
2	Alloppeddu di Serdiana	2	Albacanna di Triei	2	Italia Muscat
3	Alloppu di Serdiana	3	Apesorgia bianca di Ussana	3	d'Alexandrie
4	Apesorgia bianca 2	4	Aregu giallo di Seulo	4	Sultanine
5	Apesorgia bianca 3	5	Bianca di Orosei	5	Teta de Vaca
6	Bianca di Orgosolo	6	Calabresa di Seulo	6	Valenciblanco
7	Galoppo Lacconargiu di	7	Coerbei di Triei		
8	Villasor	8	Corofulu di Oliena		
9	Moscatellone	9	Galoppo		
1		1			
0	Pranta I di Orgosolo	0	Galoppo di Escalaplano		
1		1			
1	PrantaII di Orgosolo	1	Galoppo di Nurri		
1		1			
2	Taloppo di Luras	2	Panzale di Ula		
1		1			
3	Taloppo di Sennori	3	Tittiacca di Gonnos		
1		1	Tittiacca verde di		
4	Tittiacca di Serdiana	4	Serramanna		
1		1			
5	Tittiachina di Luras	5	Tittibacchina di Mamoiada		
1	Anna Maria				
2	Italia				
3	Sultanina Bianca				
4	Thompson Seedless				

Prelievo del materiale

Sono state utilizzate giovani foglie appena germogliate. Si è partiti con mettere a dimora i tralci, in vasetti con acqua distillata, all'interno di una cella riscaldata a 20°C e illuminata con fotoperiodo 16-8 h (Fig. 2). Dopo il germogliamento dei tralci (intervallo variabile da 3 a 6 settimane a seconda dello stadio vegetativo del tralcio al momento del prelievo) sono state prelevate le foglioline più sottili, non tomentose e più eziolate possibili, in quanto i pigmenti interferiscono con l'estrazione del DNA e con la sua purezza. Le foglioline dopo essere state raccolte, sono state avvolte nella carta d'alluminio e codificate con un codice rappresentativo e poi conservate in ultrafreezer a -80°C in attesa di utilizzo successivo, vista la scalarità della raccolta.



Figura 2. Messa a dimora dei tralci di *Vitis* all'interno della cella riscaldata.

Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato il kit commerciale DNeasy Plant Minikit QIAGEN secondo il seguente protocollo:

- porre 70 mg di campione fresco o crioconservato con due bigliette di carburo di tungsteno all'interno di una provetta Eppendorf da 2 ml, sulla quale verrà riportato il codice identificativo del campione (Fig. 3);
- immergere i tubi con il materiale vegetale nell' azoto liquido per 30 secondi, porli all'interno gli adattatori del TissueLyser (strumento per la macinazione contemporanea di più campioni), azionare il TissueLyser per 90 secondi a 30 Hz (Fig. 4);
- ripetere il processo per altri 30 secondi se il composto non è completamente sminuzzato;
- successivamente aggiungere al macinato 400microlitridibuffer AP1 e 4 microlitri di RNase nella soluzione e agitare con vortex per qualche secondo per rimuovere eventuali grumi;
- incubare i campioni nella bagnetto termostato per 15 minuti a 65°C(Fig. 5);
- dopo aver scaldato i campioni,aggiungere al composto 130 microlitri di Buffer P3e incubare le provette nel ghiaccio per 5 minuti(Fig. 6);
- centrifugare con microcentrifuga al massimo di giri (13200 rpmper la maggior parte delle microcentrifughe) per 7 minuti(Fig.7), questo passaggio consente di eliminare tutte le sostanze sotto forma di pellet ad eccezione degli acidi nucleici e delle molecole a basso peso molecolare in quanto esse si presentano in soluzione liquida;
- con la pipetta da 100-1000 microlitri, estrarre con attenzione il surnatante senza toccare il pellet accumulato alla base della Eppendorf(Fig. 8);
- porre il surnatante nelle colonnine di silicio color lilla ecentrifugare per 3 minuti 13200 giri (Fig. 9);
- eliminare la colonnina lilla, poi con la pipetta prelevare dal fondo della Eppendorf il lisato filtrato e depositarlo in una nuova provetta da 2 ml (non fornita dal kit);
- misurare il volume prelevato e aggiungere 1,5 volumi di soluzione AW1 (a cui è stato aggiunto all'inizio l'etanolo) direttamente sopra al lisato chiarificato e miscelare immediatamente pipettando;

- pipettare 650 μ l della miscela, nelle colonne bianche centrifugare per 1 minuto a 8000 rpm. Buttare la frazione uscita dalle colonne bianche. Riutilizzare la provetta di raccolta da cui è stata buttata la frazione eluita.
- ripetere la fase precedente con ciò che resta della miscela (presumibilmente 475 μ l). Buttare la frazione uscita e la provetta di raccolta;
- mettere le colonne bianche dentro le nuove provette di raccolta fornite nel kit, aggiungere 500 μ l di soluzione AW2 (a cui è stato aggiunto all'inizio l'etanolo) e centrifugare per 1 minuto a 8000 rpm. Buttare la frazione uscita dalle colonne bianche. Riutilizzare la provetta di raccolta da cui è stata buttata la frazione uscita;
- aggiungere 500 μ l di soluzione AW2 alle colonne bianche e centrifugare per 3 minuti a 13200 rpm per asciugare la membrana;
- trasferire le colonne bianche in provette Eppendorf da 1,5 ml sterili (non fornite nel kit) e pipettare 100 μ l acqua ultra pura sterile direttamente sulla membrana delle colonne bianche. Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (15-25 °C) e poi centrifugare per eluire (staccare il DNA dalle colonnine);
- ripetere la fase precedente inserendo la colonnina bianca in una nuova Eppendorf da 1,5 ml per dare origine alla 2^a eluizione. Si consiglia l'eluizione con 50 μ l (invece di 100 μ l) che aumenta significativamente la concentrazione finale di DNA nell'eluato, visto che nel secondo passaggio la quantità di DNA da staccare dalla colonnina è ovviamente inferiore;
- mettere i campioni in ordine di classificazione all'interno di un rack (Fig.10) e conservarli a -20°C.



Figura 3. pesatura dei campioni da inserire all' interno delle provette Eppendorf.

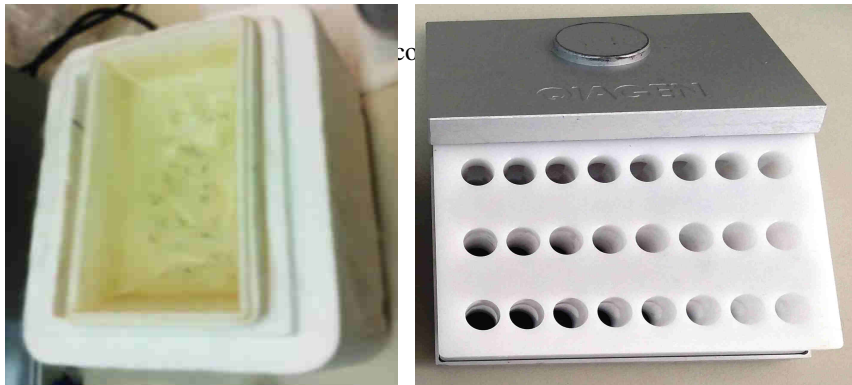


Figura 4 Immersione delle provette con il materiale vegetale nell' azoto liquido e particolare di un blocco del termociclatore in cui le provette vengono inserite



Figura 5. Inserimento nel Tissuelyser dei blocchi contenenti le provette e macinazione meccanica dei campioni.



Figura 6. Incubazione dei campioni nel bagnetto termostato a 65 °C.



Figura 7. incubazione delle provette nel ghiaccio.



Figura 8. Inserimento delle Eppendorf nella microcentrifuga.



Figura 9. “Micropipetta utilizzata per il trasferimento del surnatante alla colonnina di silicio color lilla nei successivi passaggi del protocollo”



Figura 10. Inserimento dei campioni all' interno di un rack in ordine di classificazione.

Amplificazione del DNA (PCR)

Dopo l'estrazione del DNA il protocollo prosegue con i seguenti passaggi:

- analizzare la concentrazione e la purezza dei campioni con l'analisi spettrofotometrica mediante l'utilizzo del NanoDrop (ThermoFisher)(Fig.11) spettrofotometro capace di lavorare con microvolumi (nel nostro caso 2 μ l dell'eluato). Lo strumento misura la densità ottica (OD) del campione a 3 lunghezze d'onda (λ): 260 nm, 280 nm, 230 nm, rispettivamente λ di maggiore assorbanza per il DNA, le proteine e altri composti come polisaccaridi e polifenoli. La lettura spettrofotometrica ci fornisce:

- la concentrazione del campione (ng/ μ l);
 - la qualità del DNA in termini di maggiore e minore presenza di molecole proteiche (rapporto letture 260/280, che ha un valore ottimale compreso fra 1,7 e 1,9) e di polisaccaridi e polifenoli (rapporto letture 230/260, che ha un valore ottimale intorno a 2);
- la possibilità di uniformare la concentrazione del DNA dei diversi campioni a circa 5 ng/ μ l (mediante opportune diluizioni con acqua U.P. sterile nei campioni molto concentrati) (Fig.12);
- preparare la mix per la PCR contenente i seguenti composti: il Buffer, i primers Forward e Reverse (il primer forward per ogni coppia era marcato con il fluoroforo 6-FAM, per consentire la visualizzazione dell'amplificato sul sequenziatore), i quattro dNTP, il MgCl₂, la Taq polimerasi, il campione di DNA e l'acqua. Per quanto riguarda gli SSR, sono stati utilizzati quelli impiegati a livello internazionale per la genotipizzazione sulla vite: VVS2, VVMD5 e VVMD7 (Bowers J.E, et al., 1996), VVMD25, VVMD27, VVMD28 e VVMD32 (Bowers J.E, et al. 1999), VrZag62e VrZag79(Sefc K.M., et al. 1999), VVIB 01, VMC4F 3-1, VMC1B 11, VVIN 16, VVMD 24, VVIP 31, VVIV 37, VVIQ 52, VVIH 54, VVIP 60, VVIV 67 e VVIN 73 (Laucou V. et al. 2011). Di questi 22 SSR, 6 sono quelli inseriti fra i descrittori OIV: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZag62, VrZag79.

Per il calcolo della miscela di PCR complessiva si moltiplicano tutti i reagenti, tranne il DNA, per il numero di campioni da amplificare, aggiungendo 2 o 3 campioni per sicurezza. La Mix di reazione, viene poi distribuita in apposite provette, tante quante sono i campioni, e solo alla fine si aggiunge la quantità di DNA del corrispondente

campione. Nel nostro caso è stato usato un volume di 13-9 μ l di Mix +2-6 μ l di DNA (corrispondente a quantità da 10 a 30 ng di DNA a seconda dell'SSR), quindi un volume di PCR finale di 15 μ l contenuti in ogni provettina da 0,2 ml;

- inserire le provettine all' interno di un rack e poi nel termociclatore;
- impostare il programma con le relative temperature e cicli specifici per ogni SSR utilizzato e avviare la PCR. La PCR ha una durata variabile di circa 3 ore (Fig. 13).



Figura 11. Analisi spettrofotometrica dei campioni mediante l'uso del NanoDrop.



Figura 12. Preparazione della mix per la PCR.



Figura 13.1 vari tipi di termociclatore.

Elettroforesi su gel

Al termine della PCR i campioni vengono sottoposti ad elettroforesi secondo il seguente protocollo:

- Per la preparazione del gel unire 100 ml di buffer TAE: (per 1 litro di TAE: 4,84 g di Trizma Base; 1,14 ml di Acido Acetico glaciale; 2 ml di una soluzione fatta a parte di EDTA.Na₂ biidrato 0,5 M pH 8).e 2 g di polvere di agarosio. Mettere il composto all'interno di una bottiglia in vetro pirex e chiudere leggermente il tappo. Inserire la bottiglia all'interno del forno a microonde per 3 minuti affinché l'agar possa sciogliersi nel buffer.

- Raffreddare la bottiglia contenente il composto prima di inserire al suo interno 4 microlitri del colorante fluorescente SybrSafe.

-Versare il gel nell'apposita camera elettroforetica, mettere il pettine che consente la formazione dei pozzetti nel gel solidificato e attendere 30 minuti affinché si solidifichi.

-Prima di procedere al caricamento del gel all'interno dei pozzetti, occorre stendere un supporto plastificato (tipo Parafilm) e versare una goccia per ogni campione del colorante Blu di Bromo Fenolo; i campioni di DNA vengono miscelati al colorante e inseriti nei pozzetti.

-Avviare l'elettroforesi 100 V ed attendere la corsa elettroforetica per 15 minuti (Fig.14).

-Al termine dell'elettroforesi fotografare il gel all'interno del transilluminatore (Fig. 15): nel mio caso è stato utilizzato il programma di foto documentazione "UVP Life Science Software – Vision Works LS". In base all'intensità di fluorescenza delle bande è stata determinata la concentrazione finale degli amplificati mediante l'utilizzo di una scala graduata da 1 a 10. Prima di caricare gli amplificati sulla piastra per il sequenziatore, ai più concentrati è stata aggiunta acqua ultra pura sterile per equilibrare le loro concentrazioni con quelli meno concentrati(Fig. 16).



Figura 14. I campioni contenenti il DNA sono sottoposti alla corsa elettroforetica.



Figura 15. Il transilluminatore.



Figura 16. Caricamento degli amplificati sulla piastra destinata al sequenziatore.

Elettroforesi capillare al sequenziatore

Gli amplificati così trattati sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare in un sequenziatore a 16 capillari (ABI®PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) secondo le seguenti fasi:

- a) Sistemazione degli amplificati in specifiche piastre da 96 pozzetti (disposti in 8 righe e 12 colonne), ponendo in ogni pozzetto una Mix contenente: 8,85 µl di formammide (che mantiene denaturati gli amplificati durante l'elettroforesi capillare); 0,15 µl di Liz Standard (GeneScan™ -500 Liz™, AppliedBiosystems), reagente che funge da standard di peso molecolare; circa 1 µl di amplificato;
- b) Centrifugazione della piastra per 10" a circa 1000 rpm, suo riscaldamento a 95°C per 5' in un termociclatore e sua disposizione nell'apposito alloggiamento dentro il sequenziatore;
- c) Inserimento in un file dei dati e dei codici relativi ai campioni all'interno del software del sequenziatore.

Per quanto riguarda il funzionamento del sequenziatore, i canali del capillare contengono la matrice gelatinosa in cui si svolgerà l'elettroforesi capillare, che ha la funzione omologa a quella dell'agarosio in una elettroforesi normale (nel nostro caso la matrice utilizzata è stata il POP-7™ Polymer, con formula brevettata dall'AppliedBiosystems). All'interno dei canali capillari avviene l'elettroforesi dei campioni. Durante l'elettroforesi le molecole di amplificato vengono irraggiate da un raggio laser, che causerà l'emissione di fluorescenza da parte dei fluorofori attaccati ai *primer* di tutti gli amplificati; una cellula fotoelettrica riceve i segnali fluorescenti che vengono memorizzati, rendendoli così visibili nella fase successiva (Fig. 17).

I risultati sono stati acquisiti con il programma GeneMapper, visualizzati su dei grafici (uno per ogni campione) detti ferogrammi. L'assegnazione dei pesi molecolari ai picchi di fluorescenza rappresentanti gli alleli viene fatta in base allo standard di taglia "Liz Standard", che ha dei picchi in corrispondenza di pesi molecolari noti.

Per un dato microsatellite, se i picchi sono due il campione è eterozigote (due alleli), se il picco è uno solo il campione è omozigote (un solo allele).

I risultati ottenuti presso il laboratorio dell'Agris sono stati confrontati con i valori ottenuti dalle analisi provenienti da altri centri di ricerca, previo allineamenti dei

pesi molecolari di ciascun SSR. I dati sono stati elaborati con il con il programma TREECON 3.1 (Van de Peer Y., De Wachter, R., 1994), che ha costruito la matrice delle distanze genetiche (Nei M., Li W.H., 1979) in base alla percentuale di alleli presenti che le varie cultivar condividono. Ciò ha consentito di costruire un dendrogramma di similarità genetica.



Figura 17. Il sequenziatore.

RISULTATI

Il dendrogramma di similarità (Fig. 18) presenta graficamente la vicinanza genetica fra le varietà e consente di raggruppare tutte le varietà con lo stesso profilo genetico. La consistenza di quest'analisi è stata saggiata mediante l'applicazione della tecnica di ricampionamento bootstrap (1000 repliche). In corrispondenza dei nodi del dendrogramma sono stati riportati i valori di bootstrap (in percentuale), che rappresentano il numero di volte, su 1000 ricampionamenti, in cui i pesi molecolari (degli SSR) confrontati sono risultati identici.

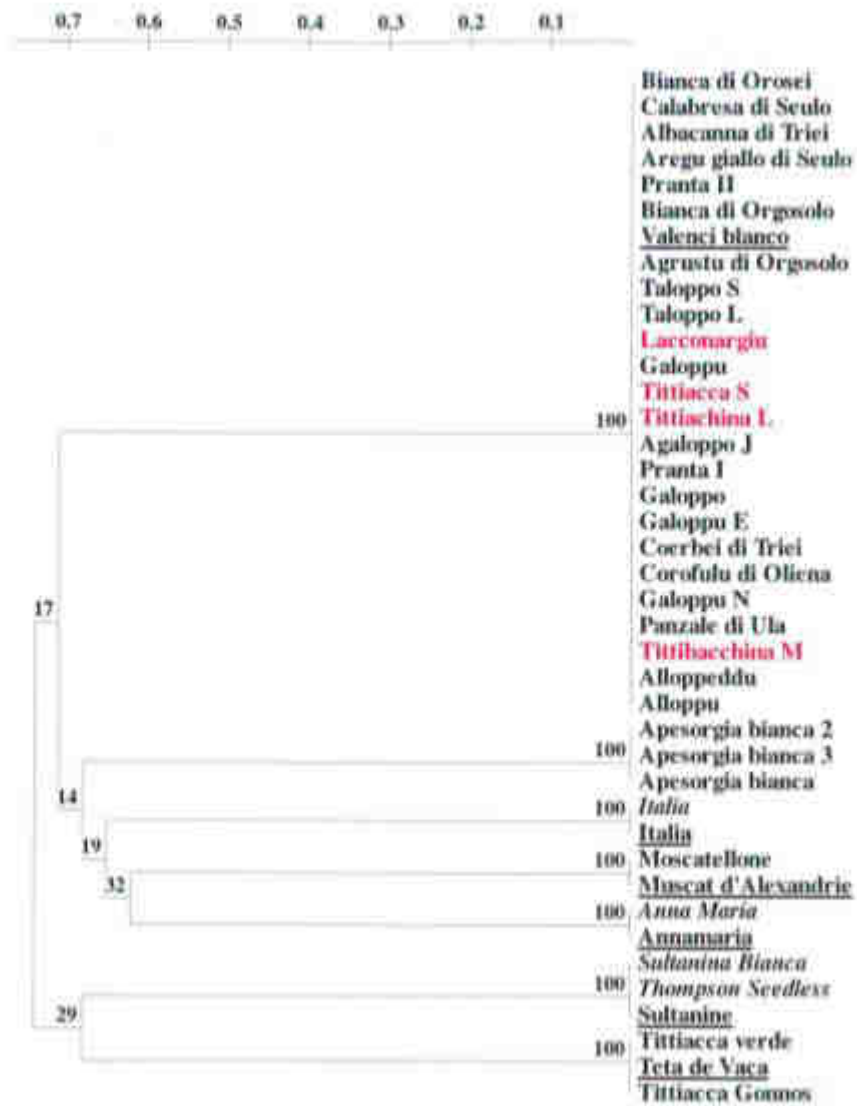


Figura 18. Dendrogramma di similarità: in rosso le varietà che costituiscono delle false omonimie; in corsivo le varietà di riferimento analizzate durante il tirocinio; carattere sottolineato le varietà provenienti da database internazionale.

Nel dendrogramma si notano diversi raggruppamenti, ognuno dei quali include cultivar con profili SSR coincidenti (varietà che hanno lo stesso profilo microsatellite ma nomi diversi sono probabili sinonimie):

1) il gruppo più consistente è costituito da 24 cultivar, di cui alcune hanno denominazione Taloppo o Galoppo; tutte riconducibili alla cultivar spagnola Valenciblanco. All'interno di questo gruppo notiamo però quattro cultivar (in rosso) che costituiscono delle false omonimie con cultivar estranee al gruppo:

-le3 Tittiacca-Tittiacchina-Tittibacchina (tutte denominazioni aventi lo stesso significato, Mammella di vacca, dalla forma allungata degli acini) sono false omonime delle Tittiacca vere, che troviamo invece nella parte inferiore del dendrogramma e che sono probabili sinonimi della cv spagnola che ha nome con lo stesso significato, Teta de vaca;

-lacv. Lacconargiu è falsa omonima di un altro Lacconargiu analizzato da Agris nel corso del progetto AKINAS, che rientra nel gruppo dei Licronaxiu (uve da vino);

2) il secondo gruppetto è quello delle Apesorgia, tutte con profilo identico e quindi correttamente denominate;

3) un'altra coincidenza (e quindi probabile sinonimia) è quella fra il Moscatellone e la Cultivar Muscat d'Alexandrie;

4) E' inoltre rappresentata la coincidenza della cv. Italia analizzata da Agris con quella del database internazionale, analogamente a ciò che avviene per le cv. Annamaria e Sultanina (utilizzate per allineare i dati Agris e i dati bibliografici); in particolare, insieme alle due Sultanina ha clusterizzato anche la Thompson seedless analizzata da Agris, confermando ciò che si riscontra in letteratura sulla coincidenza dei profili SSR di queste due cultivar.

CONCLUSIONI

A fianco al tradizionale rilievo dei caratteri fenotipici l'analisi dei marcatori molecolari sta ottenendo via via maggior rilievo nella discriminazione di genotipi appartenenti alla stessa specie. I marcatori più utilizzati sono i microsatelliti (SSR), in quanto sono codominanti e quindi evidenziano sia l'omozigosi che l'eterozigosi al loro locus.

Per quanto riguarda la vite, ad oggi la documentazione per l'iscrizione nel Registro Nazionale viene normalmente integrata con il profilo almeno dei 6 marcatori SSR inseriti fra i descrittori O.I.V. come parametri identificativi delle cultivar.

L'analisi dei profili microsatelliti è comunque un'analisi complementare e non sostitutiva delle osservazioni fenotipiche: infatti, per quanto riguarda le probabili sinonimie dedotte dai profili SSR, esse dovrebbero essere comunque confermate da ulteriori analisi che considerino anche altre parti del genoma, e/o da un loro confronto a parità di ambiente di coltivazione e condizioni fitosanitarie.

In ogni caso l'analisi dei profili microsatelliti costituisce un mezzo potente per risolvere di casi di omonimia errata e per capire la similarità genetica e i rapporti di parentela fra le diverse varietà (Fig. 19 e 20).



Figura 19. Grappolo della varietà Apesorgia.



Figura 20. Grappolo della varietà Taloppo.

BIBLIOGRAFIA

- Bowers J.E., Dangl G.S., Meredith C.P. 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape., *Am J. enol. Vitic.* 50, 3.
- Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R., Meredith C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitisvinifera* L.). *Genome*, 39: 628-633.
- Digital Ink Rovigo, 2016. https://issuu.com/rovigooggi/docs/gliagriveneti_nr.2.ok
- Diliberto, 2015. <http://dspace.unict.it/bitstream/10761/1648/1/DLBGPP80M10F830FDiliberto%20Giuseppe.pdf>
- Doc.studenti.it, 2015. <http://doc.studenti.it/dispense/biologia-molecolare/marcatori-molecolari.html>
- Docenti.unina.it 2014. <https://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id>
- Galet P. 2000. *Dictionnaireencyclopedique des cepages*. Hachette, Paris
- Laucou V., Lacombe T., Dechesne F., Siret R., Bruno J.P., Dessup M., Dessup T., Ortigosa P., Parra P., Roux C., Santoni S., Vare`s D., Pe´ros J.P., Boursiquot J.M., This P. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. 2011, *TheorApplGenet* 122:1233–1245.
- Lovicu, 2008. http://www.sardegnaagricoltura.it/documenti/14_43_20080505180113.pdf
- Marenghi, 2007. <http://www.agraria.org/viticultura-enologia/morfologia-della-vite.htm>
- Maul E., Eibach R. 2003. *Vitis* international variety catalogue. <http://www.genres.de/eccdb/vitis/>
- Nei M. and Li W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5269-5273.
- Nieddu G. 2011, *I vitigni della Sardegna*, copyright CONVISAR. http://www.sardegnaigitallibrary.it/documenti/17_151_20130327091619.pdf
- Office International de la Vigne et du Vin, 2001. *Codice di caratteri descrittivi OIV per le varietà di vite e specie di Vitis*.

- Piras, 2014. https://www.researchgate.net/profile/Fabio_Piras/publication/279526787_Caratterizzazione_e_recupero_di_un_vitigno_minore_della_Sardegna_il_Lacconargiu/links/55a7550a08aeb4e8e646e16b.pdf
- Piras, 2014. https://www.researchgate.net/profile/Fabio_Piras/publication/277602871_Valorizzazione_di_vini_autoctoni_sardi_attraverso_la_definizione_del_loro_profilo_sensoriale/links/556e9c2508aeccd7773f70b1.pdf
- Protocollo/estrazione 2014. [file:///C:/Users/UTENTE/Downloads/Protocollo%20estrazione%20DNA%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/UTENTE/Downloads/Protocollo%20estrazione%20DNA%20(1).pdf)
- Rao V., Narayanaswamy P. and SrinivasaMurty B.N., 2014. Genetic diversity analysis in grape (*Vitisvinifera*) germplasm using microsatellite markers, 2014. American Intl. Jour .of Res. in Formal Applied & Natural Sciences 6(1) pp 12-18
- Repubblica, 2015. http://www.repubblica.it/salute/alimentazione/2015/01/29/news/vino_scoperto_in_sardegna_il_pi_antico_vitigno_del_mediterraneo-105918935/
- Sardegnaagricoltura.it, 2016. <http://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=501&s=14&v=9&c=13507&na=1&n=10>
- Sefc K.M., Regner F., Turetschek E., Glossl J., Steinkellner H. Identification of microsatellite sequences in *Vitisriparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. 1999, *Genome*, 42: 367-373.
- Thereef.it,2014.<http://www.thereef.it/craft/olismo/erbe/vite.htm>
- Unipv.it, 2016. <http://www-3.unipv.it/labecove/Downloads/4gen.pdf>
- Van de Peer Y. and De Wachter, R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10, 569-570.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il relatore Professore Maurizio Mulas per avermi indirizzato in una realtà che ha permesso di ampliare le mie conoscenze.

Ringrazio la sede dell'AGRIS Agliadò per l'accoglienza ed in particolare la Dottoressa Maria Pia Rigoldi, per l'interesse e la dedizione durante il mio percorso di tirocinio.