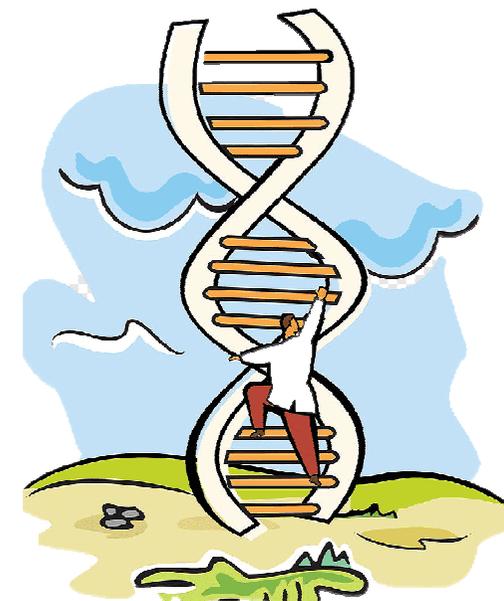


Analisi molecolari per il fingerprinting delle varietà vegetali

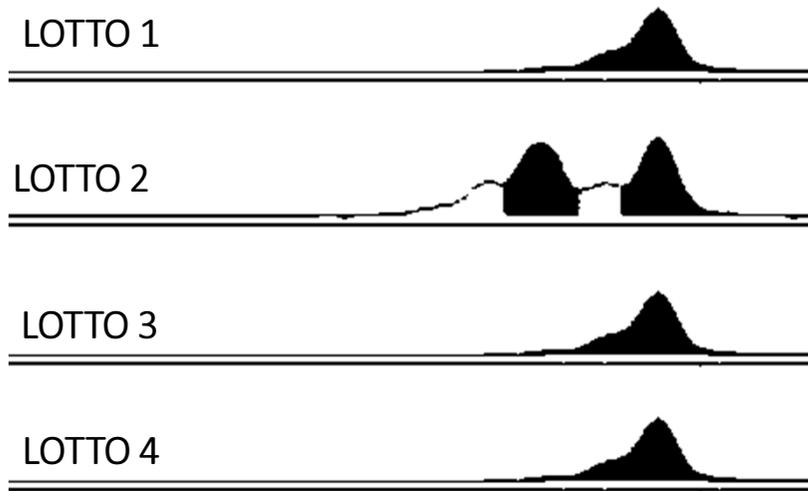
CASI DI STUDIO

Ezio Portis

DISAFA – Genetica Vegetale
Università degli studi di Torino



Test di uniformità varietale: **quali marcatori?**



LOTTO 1



LOTTO 2

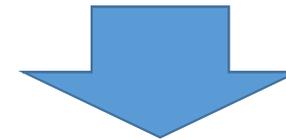


LOTTO 3

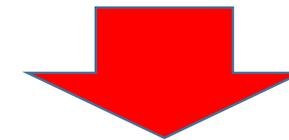


LOTTO 4

ANALISI SSR DI LOTTI DI SEME



COMMERCIALIZZATI COME
UNIFORMI E/O IBRIDI



MICROSATELLITI



KEY STUDY 1: Uniformità e rispondenza varietale in fagiolo

Quesito scientifico

A seguito di richiesta da parte del Dott. Agronomo 'X' è stata effettuata una caratterizzazione molecolare di semi campionati casualmente entro i seguenti lotti di seme, **appartenenti alla varietà di fagiolo 'Y'** forniti dalla ditta 'Z'

- CS 17662 (commercializzato nell'anno **2008**)
(campione di controllo e di riferimento)
- CS 18818 (commercializzato nell'anno **2009**)
- CS 18354 (commercializzato nell'anno **2009**)

Si intende verificare se i semi appartenenti ai lotti commercializzati nel anno 2009 (CS 18818 e CS 18354) **rispondano ai requisiti di uniformità e corrispondano alla varietà 'Y'** come dichiarato dalla ditta 'Z'



KEY STUDY 1: Uniformità e rispondenza varietale in fagiolo

Analisi SSR (microsatelliti)

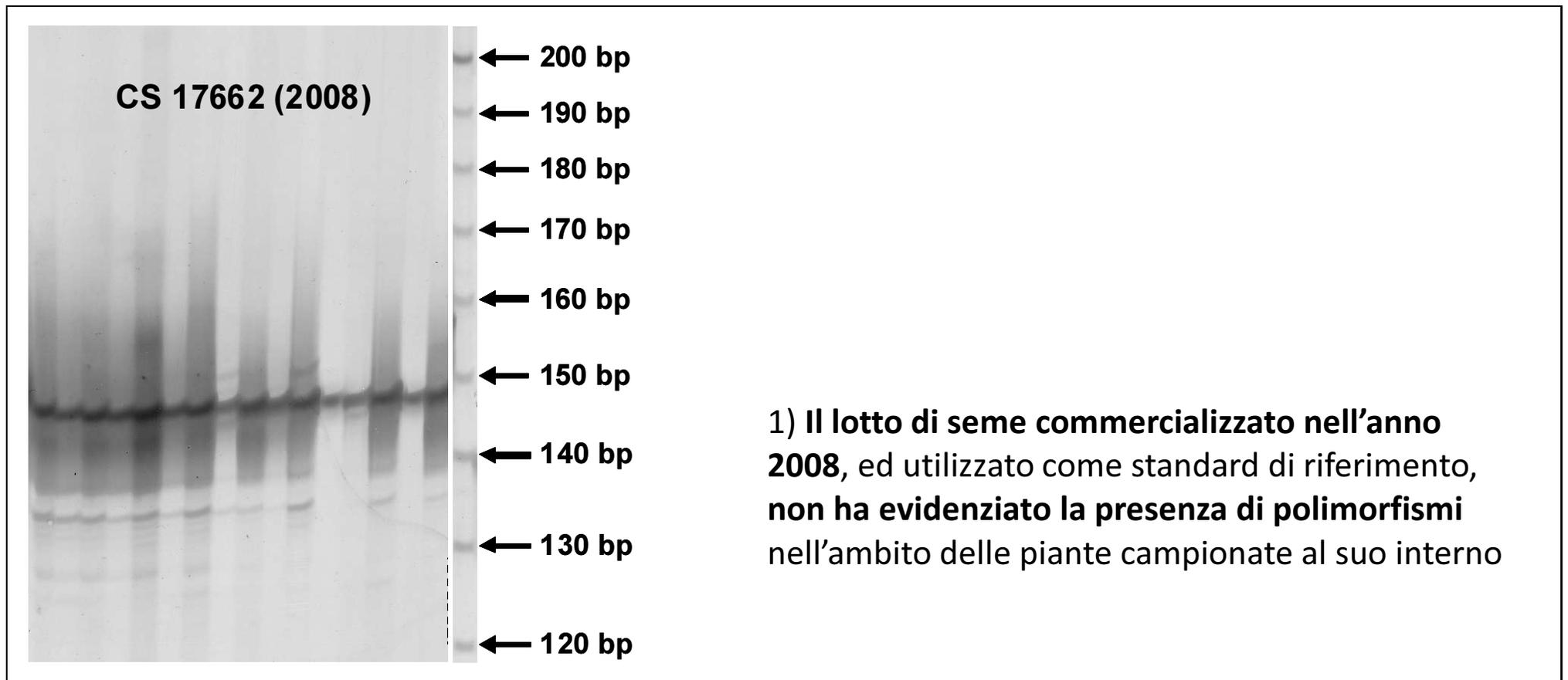
Scelta dei loci SSR: I campioni di DNA genomico sono stati sottoposti ad amplificazione PCR mediante l'utilizzo di primer specifici disegnati sulle regioni fiancheggianti 5 loci SSR isolati da Masi et al. (2003):

- J04555
- M75856
- U77935
- X80051
- X96999

I 5 loci sono stati scelti in quanto dimostratisi polimorfici, e quindi informativi, quando testati su un panel costituito da diverse varietà di *Phaseolus vulgaris* in conservazione presso la Banca del Germoplasma del DISAFA, settore Genetica Agraria dell'Università di Torino

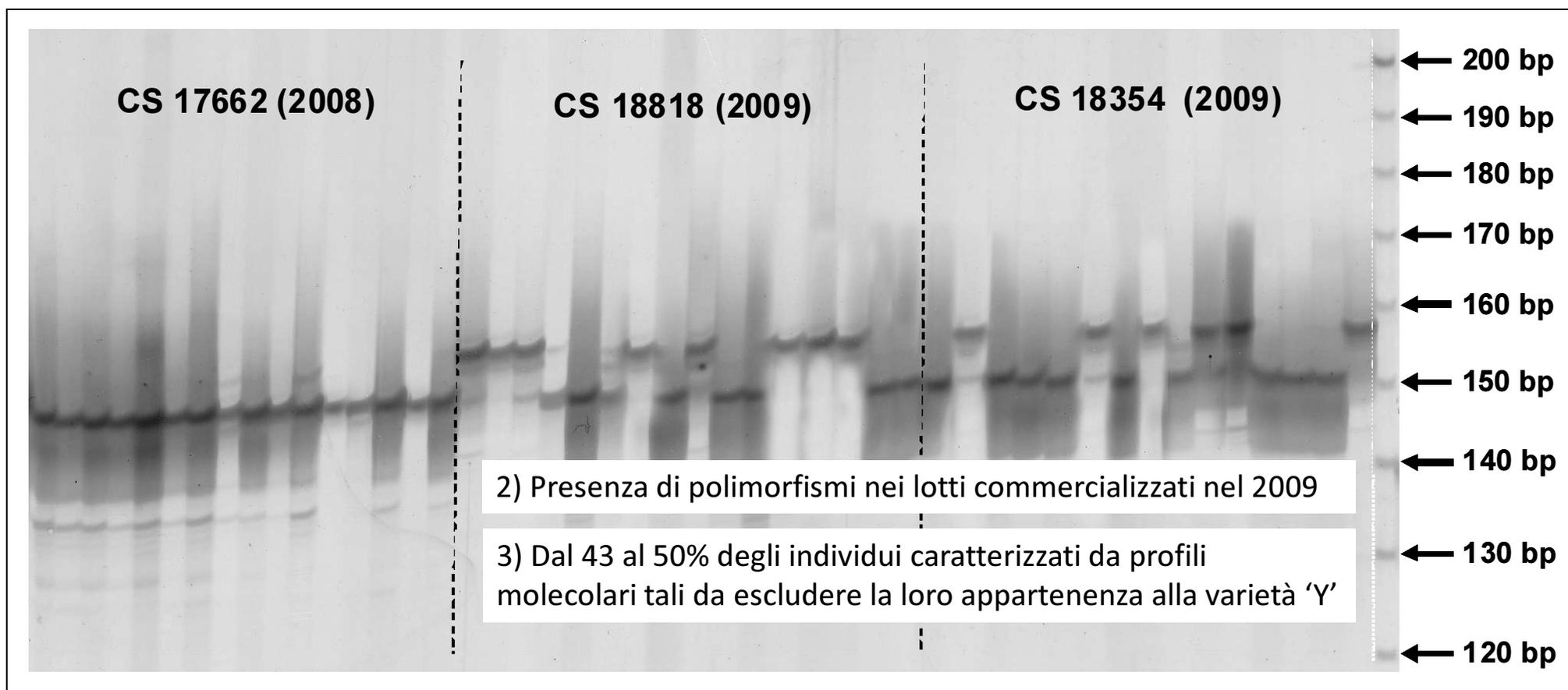
KEY STUDY 1: Uniformità e rispondenza varietale in fagiolo

Analisi SSR (microsatelliti)



KEY STUDY 1: Uniformità e rispondenza varietale in fagiolo

Analisi SSR (microsatelliti)



KEY STUDY 2: Rispondenza clonale in pioppo

Quesito scientifico

Si intende verificare se il materiale di propagazione utilizzato dal Sig. 'X' per l'impianto di un pioppeto di 25 ha con sesto di impianto di 5,5 per 5,5 metri, ubicato in località 'Xy' (vedi planimetria allegata) **corrisponde al clone di *Populus alba* 'Villafranca'**, come dichiarato dal vivaio presso il quale è stato acquistato.



KEY STUDY 2: Rispondenza clonale in pioppo

Analisi SSR (microsatelliti)

I campioni di DNA genomico sono stati sottoposti ad amplificazione PCR mediante l'utilizzo di primer specifici disegnati sulle regioni fiancheggianti 5 loci SSR.

PTR-I (isolato da Dayanandan et al. 1998)

PTR-14 (isolato da Rahman et al. 2000)

WPMS-14,

WPMS-18,

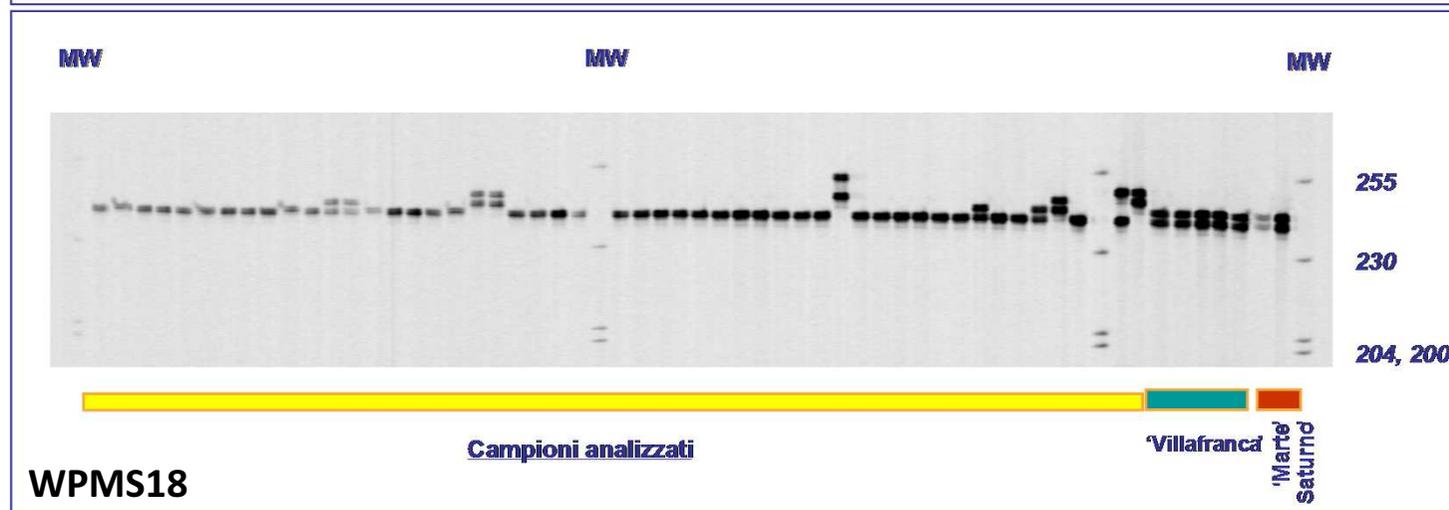
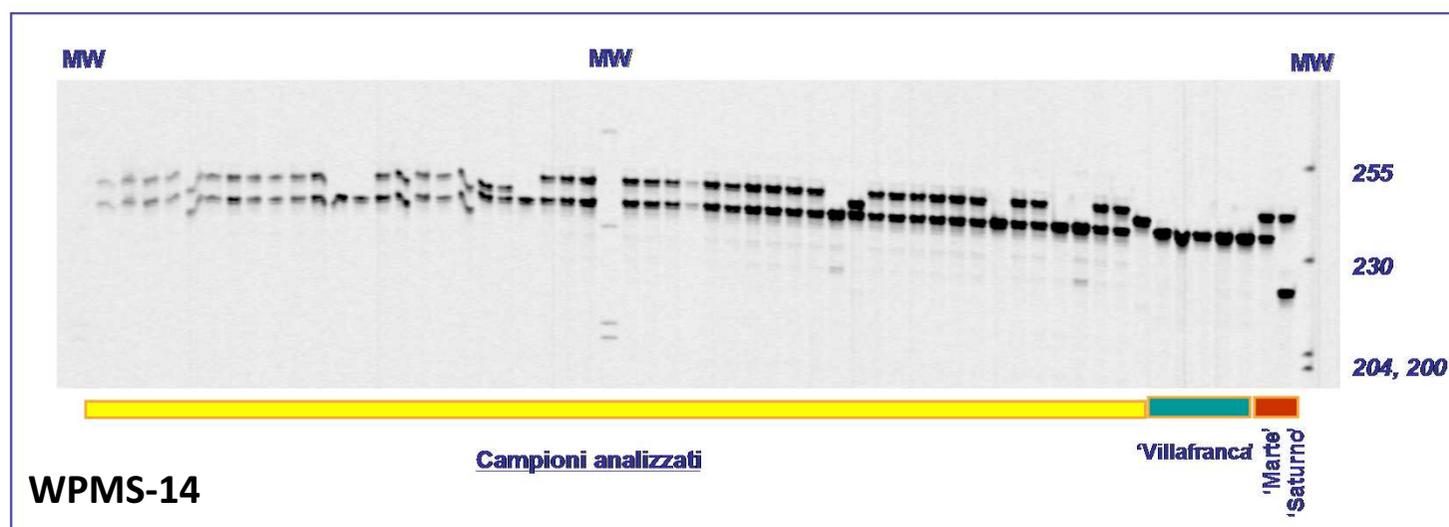
WPMS-20 (isolati da Smulders et al., 2001)

I 5 loci sono stati scelti in quanto dimostratisi altamente polimorfici, e quindi altamente informativi, quando testati su un panel costituito da cloni di *P. alba*, *P. nigra*, *P. deltoides* e *P. x canadensis* in coltivazione presso le aziende sperimentali dell' ex Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura di Casale Monferrato.

KEY STUDY 2: Rispondenza clonale in pioppo

Analisi SSR (microsatelliti)

Profilo elettroforetico
ottenuto con i microsatelliti
WPMS-14 e WPMS18
nei 50 campioni analizzati e
nei controlli



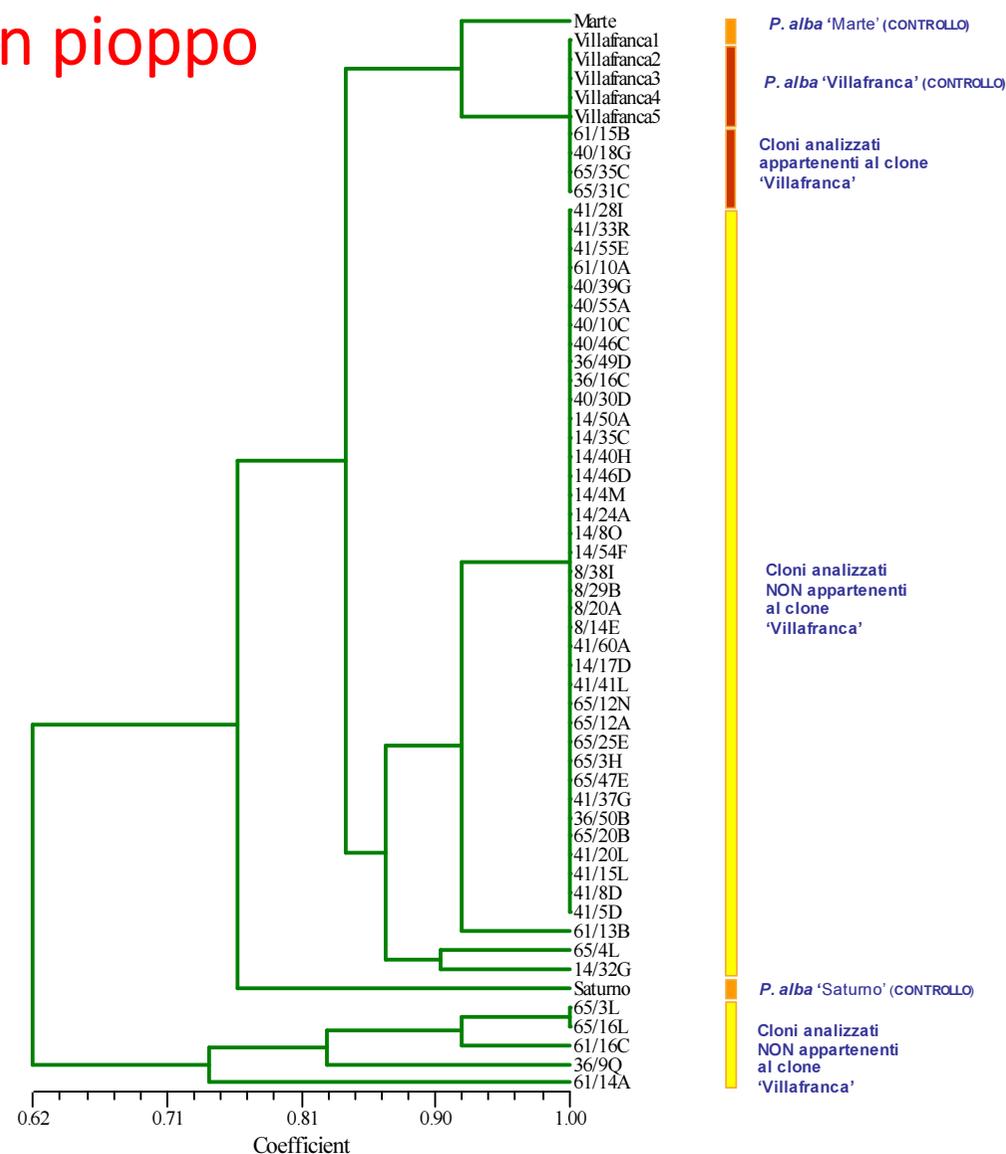
KEY STUDY 2: Rispondenza clonale in pioppo

Analisi SSR (microsatelliti)

Dendrogramma di similarità genetica tra i cloni di pioppo *P. alba* analizzati.

Solo 4 delle piante campionate evidenziano identità genetica con il clone di *P. alba* 'Villafranca'.

Viceversa le altre 46 piante (92% dei campioni analizzati) sono caratterizzate da profili molecolari tali da escludere la loro appartenenza al suddetto clone



KEY STUDY 3: Verifica dell'uniformità di un ibrido F_1 di zucchini

Quesito scientifico

A seguito di richiesta da parte dell'azienda agricola 'X' è stata effettuata una **caratterizzazione molecolare** di semi campionati casualmente entro il lotto di seme 'Y' appartenente alla **varietà F_1 di zucchini** fornito dalla ditta 'Z'

Si intende verificare se i semi appartenenti alla varietà di zucchini **risponda ai requisiti di uniformità richiesti per una varietà F_1**



KEY STUDY 3: Verifica dell'uniformità di un ibrido F_1 di zucchini

Analisi AFLP

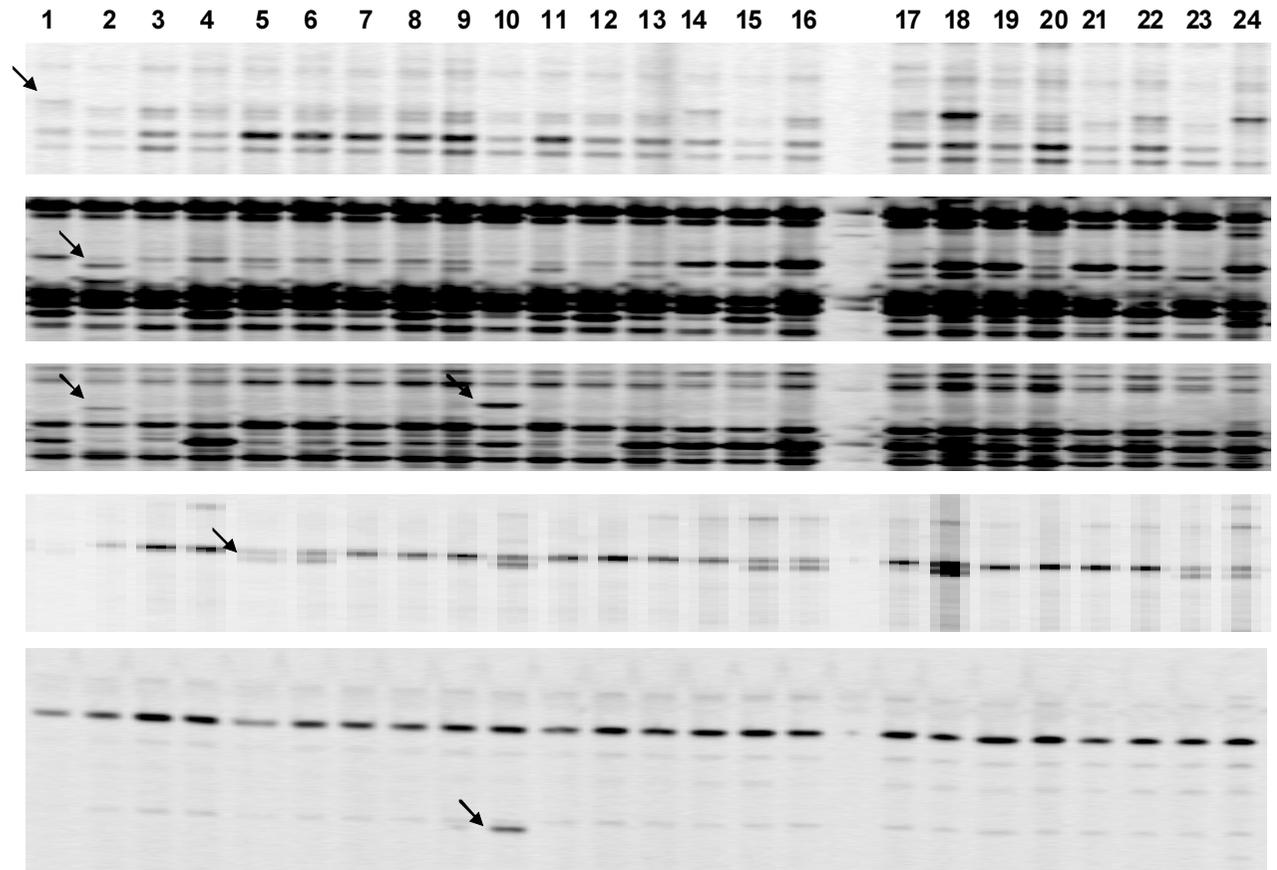
Il fingerprinting molecolare dei campioni oggetto dell'analisi è stato effettuato, in via preliminare, mediante la tecnica AFLP (*amplification fragment length polymorphism*) sulla base del protocollo originale descritto da Vos et al. (1995), effettuando le analisi in doppio (due ripetizioni per ciascun campione) e generando un totale di 48 campioni per ciascuna corsa elettroforetica

KEY STUDY 3: Verifica dell'uniformità di un ibrido F_1 di zucchini

Analisi AFLP

Esempio di polimorfismi AFLP (evidenziati mediante le frecce) rilevati nei campioni di zucchini in analisi

Le quattro combinazioni di primer AFLP impiegate hanno evidenziato la presenza di 11 bande polimorfiche su un totale di 159 frammenti amplificati (7 % di bande polimorfiche sul totale dei frammenti amplificati)

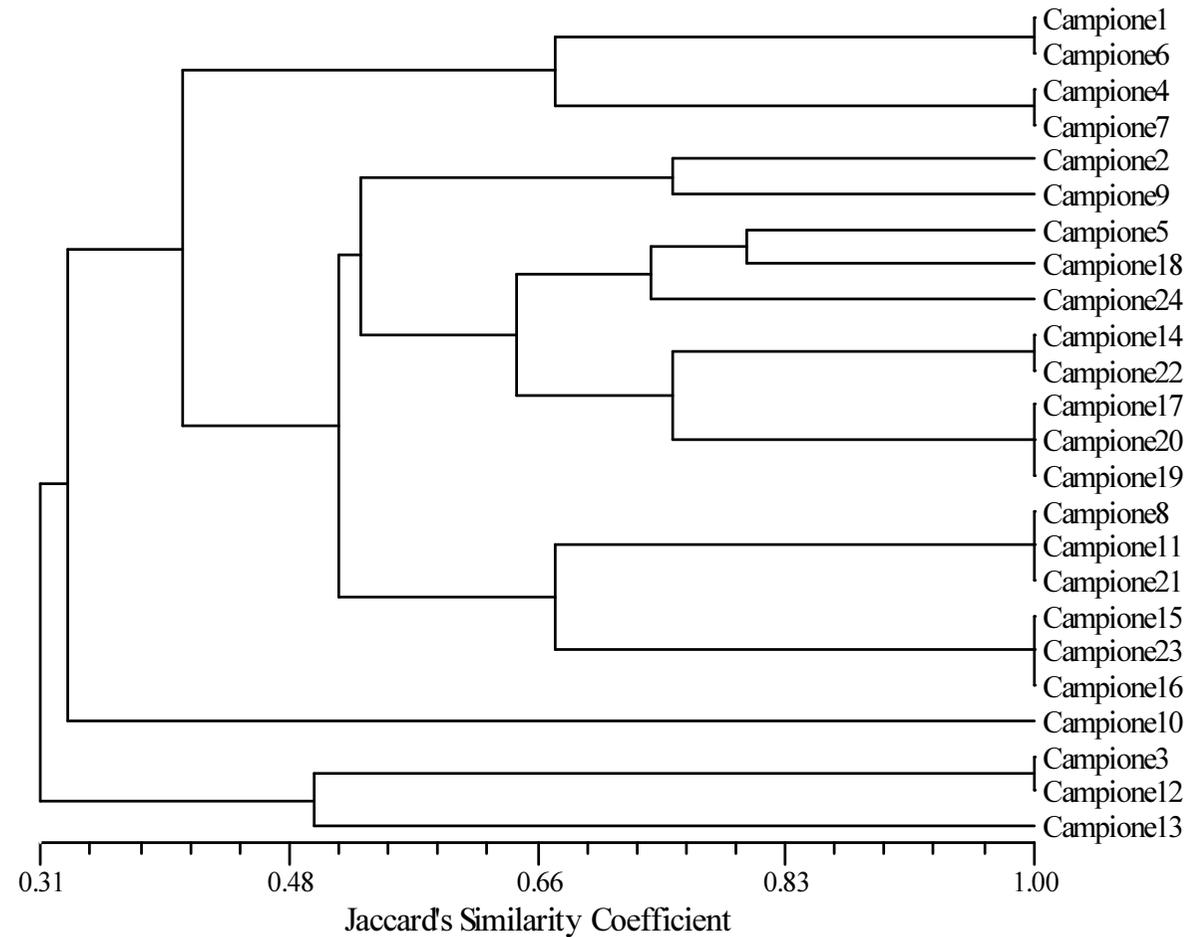


KEY STUDY 3: Verifica dell'uniformità di un ibrido F₁ di zuchino

Analisi AFLP

Dendrogramma di similarità genetica tra i campioni di zuchino in analisi

Il dendrogramma ottenuto a partire dai polimorfismi molecolari, ha permesso di ottenere il *fingerprinting* molecolare di 14 piante, sul totale dei 24 campioni analizzati, a dimostrazione della non totale uniformità del lotto di semi in analisi.



KEY STUDY 4:

Identificazione di possibili contraffazioni in farine di mais piemontesi

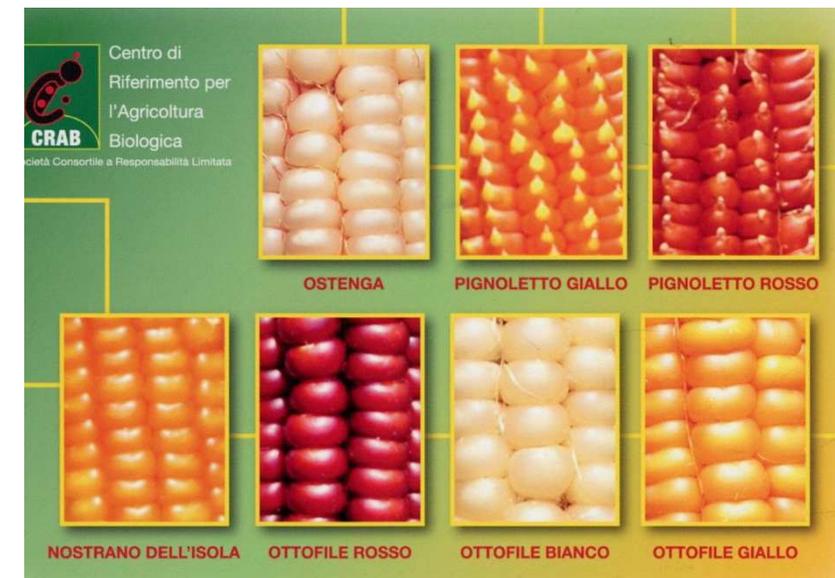
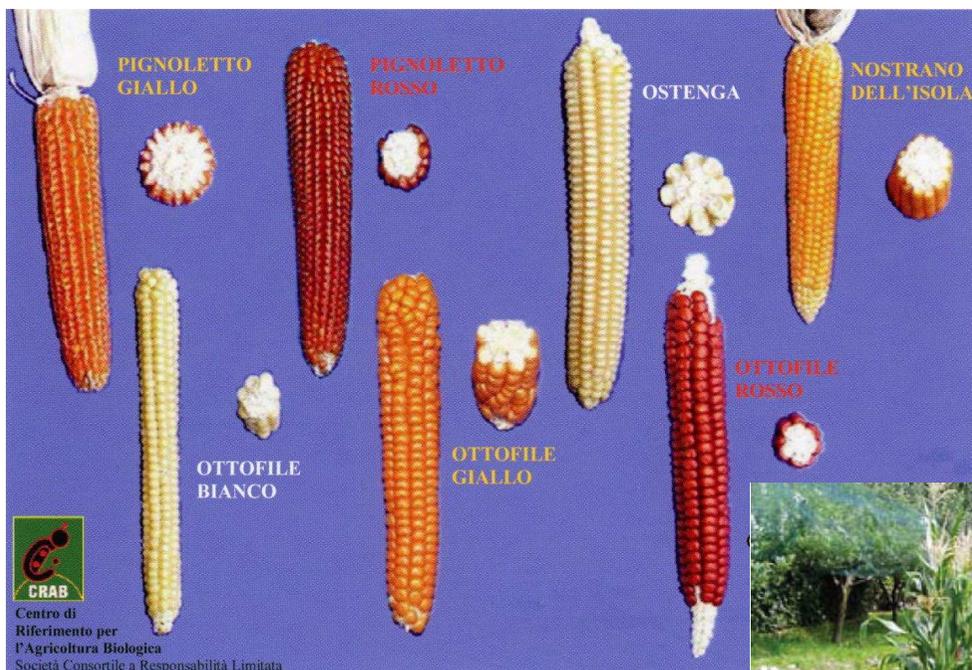
Obiettivo: Messa a punto di un protocollo di tracciabilità

- Individuazione mediante marcatori molecolari di alleli esclusivi nell'ambito degli ecotipi piemontesi di mais da polenta e nell'ambito delle varietà ibride commerciali
- Validazione delle forme alleliche presenti in campioni commerciali nell'ambito di farine da polenta



KEY STUDY 4:

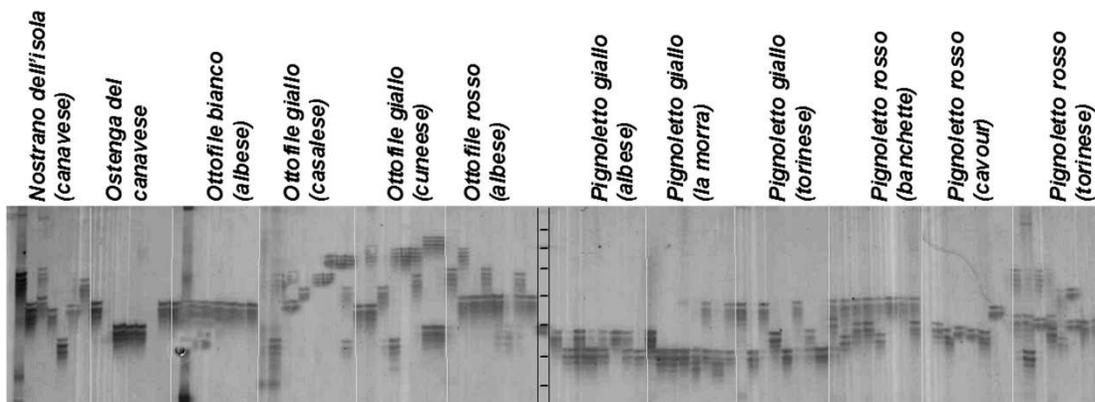
Identificazione di possibili contraffazioni in farine di mais piemontesi



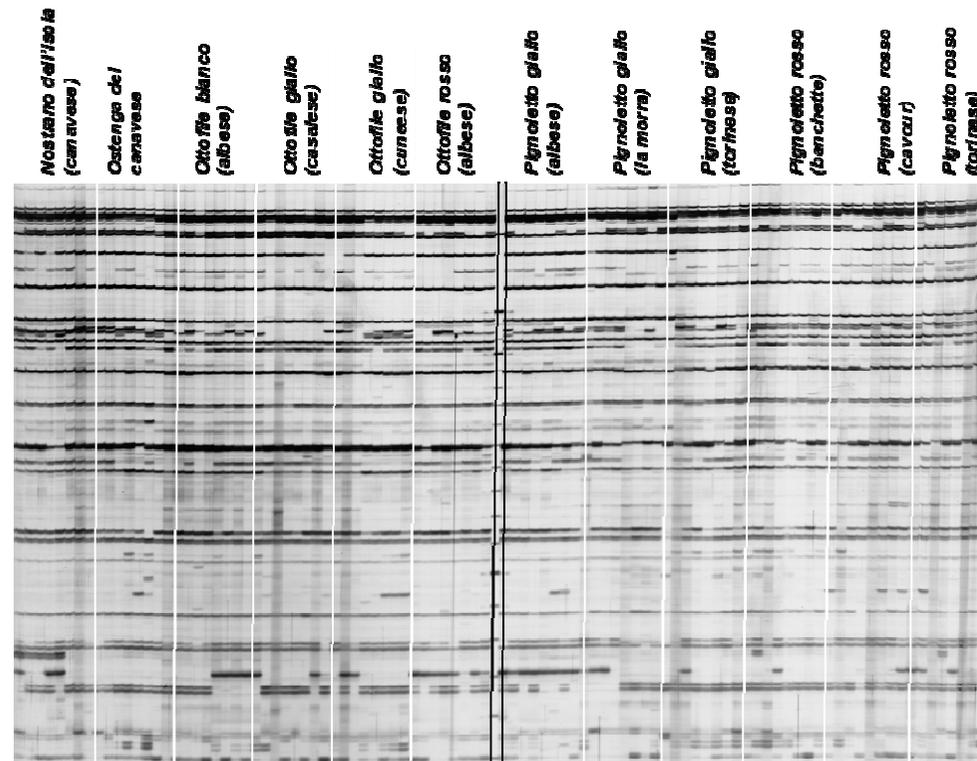
KEY STUDY 4:

Identificazione di possibili contraffazioni in farine di mais piemontesi

Marcatori Microsatelliti (SSR)

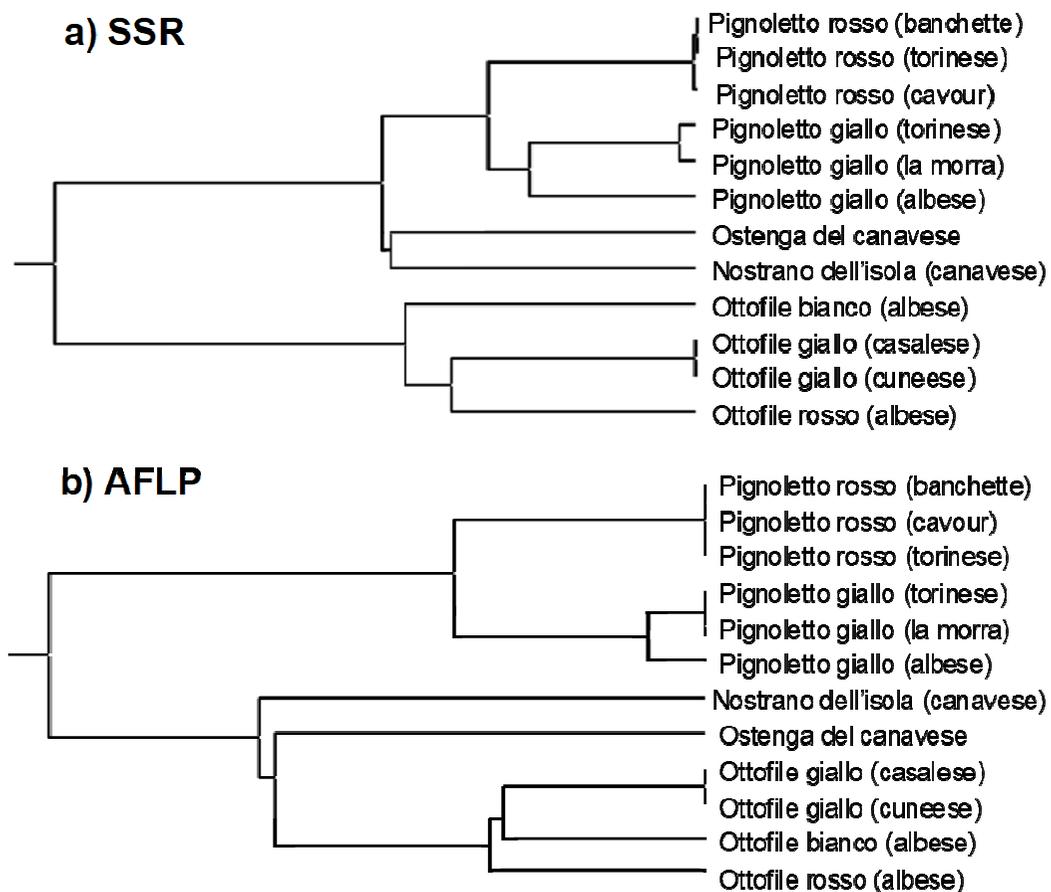


Marcatori AFLP



KEY STUDY 4:

Identificazione di possibili contraffazioni in farine di mais piemontesi

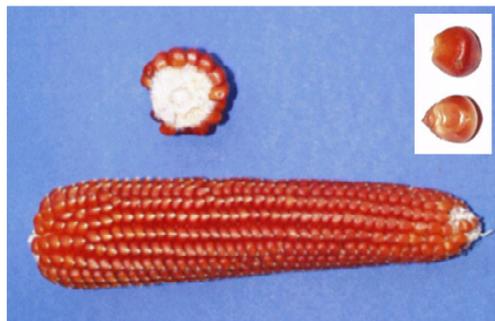


KEY STUDY 4:

Identificazione di possibili contraffazioni in farine di mais piemontesi

Messa a punto di un protocollo di tracciabilità

- 36 campioni di Pignoletto rosso per tre diverse provenienze (=108 individui)



- 18 BULK (DNA di diversi genotipi mescolato): Nostrano dell'isola, Ottofile bianco, rosso, giallo, Ostenga, Pignoletto giallo

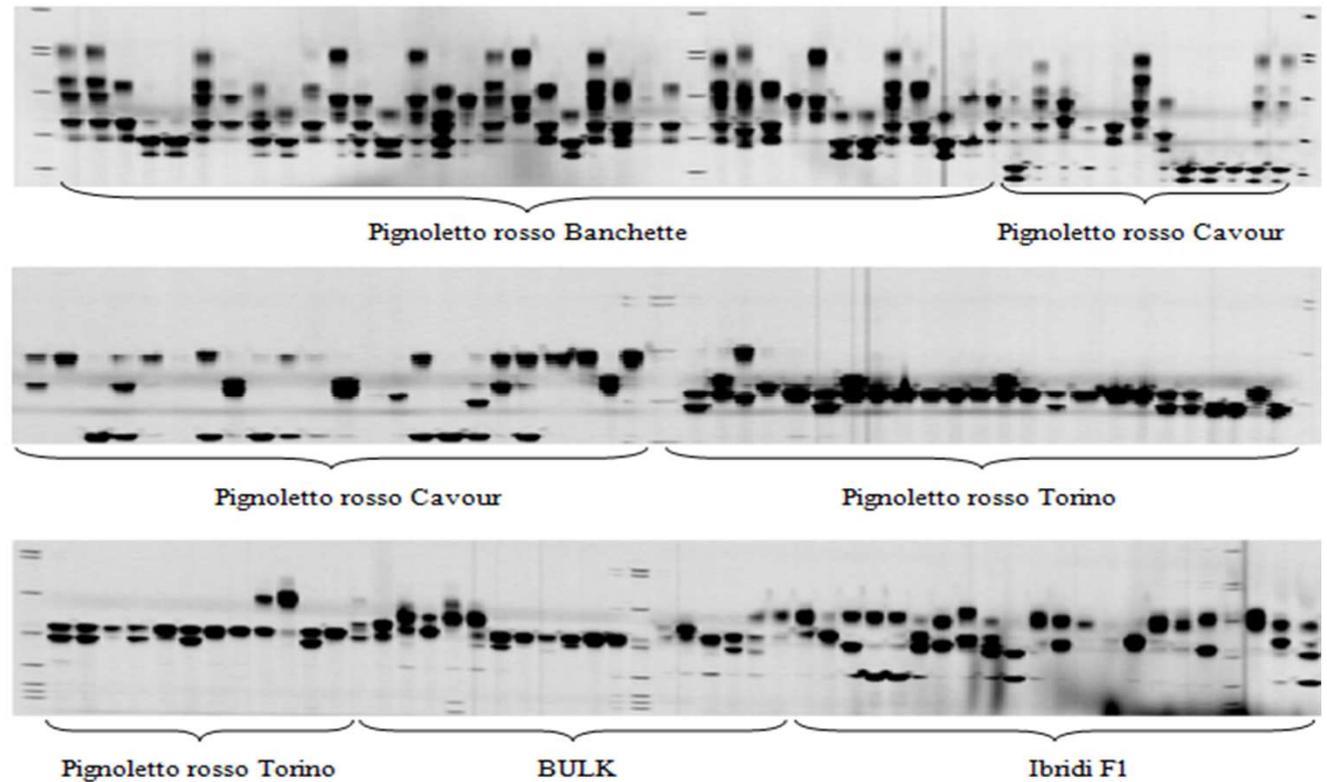
- Ibridi vitrei commerciali

DENOMINAZIONE COMMERCIALE DELL'IBRIDO F1	AZIENDA PRODUTTRICE
Gritz	Maisadour Semence
Arzano	
Belgrano	Limagrain
Aadrano	
LG 3321	
Lolita	
Marano 0501	SIS
Sisred	
Astico	
Julian	Ersa Friuli
Lucia	Pioneer
PR36Y03	
N43	
DKC6677	Delkalb
DKC6309	
ISH301v	IVS
Alabastro	KVS Italia
Kermess	
Comiola	Apsov Sementi
Redel	Rank Venturoli
Roano	Sivam

KEY STUDY 4:

Identificazione di possibili contraffazioni in farine di mais piemontesi

1) Analisi SSR dei materiali a confronto

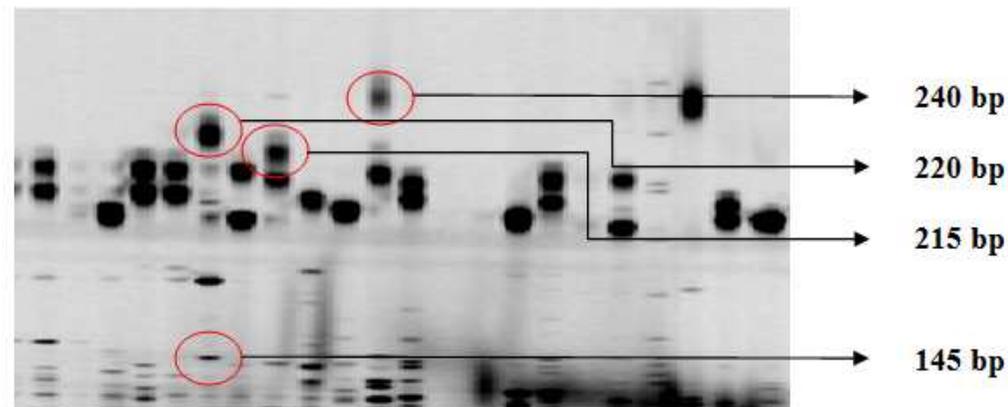


KEY STUDY 4:

Identificazione di possibili contraffazioni in farine di mais piemontesi

2) Rilievo forme alleliche esclusive per gli ibridi

Bp p-dupssr10	PIGNOLETTTO BANCHELETTE	PIGNOLETTTO CAVOUR	PIGNOLETTTO TORINO	NOSTRANO DELL'ISOLA	OSTENGA DEL CANAVESE	OTTOFILE BIANCO ALBA	OTTOFILE GIALLO CASALE	OTTOFILE GIALLO CUNEO	OTTOFILE ROSSO ALBA	PIGNOLETTTO GIALLO ALBA	PIGNOLETTTO GIALLO LA MORRA	PIGNOLETTTO GIALLO TORINO	GRITZ	ARZANO	BELGRANO	AADRANO	LG3321	MARANO 0501	SISRED	ASTICO	JULIAN	LUCIA	PR36Y03	DKC6677	ISH301v	ALABASTRO	REDEL	ROANO	CORNIOLA	LOLITA	N43	DKC6309	KERMES		
145																																			
150																																			
158																																			
175																																			
180																																			
186																																			
190																																			
196																																			
200																																			
215																																			
220																																			
240																																			



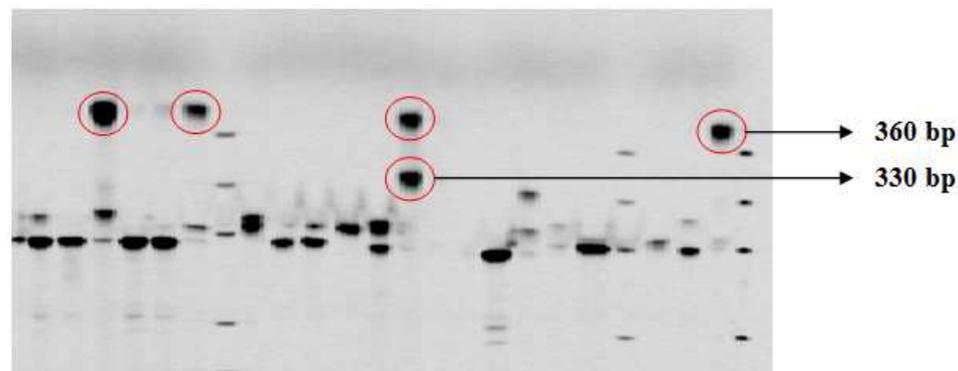
Locus SSR
p-dupssr10

KEY STUDY 4:

Identificazione di possibili contraffazioni in farine di mais piemontesi

2) Rilievo forme alleliche esclusive per gli ibridi

Bp SSR N60	PIGNOLETTO BANCHETTE	PIGNOLETTO CAVOUR	PIGNOLETTO TORINO	NOSTRANO DELL'ISOLA "	OSTENGA DEL CANAVESE "	OTTOLILE BIANCO "	OTTOFILE GIALLO CASALE '	OTTOFILE GIALLO CUNEO "	OTTOFILE ROSSO ALBA "	PIGNOLETTO GIALLO ALBA '	PIGNOLETTO GIALLO LA MORRA '	PIGNOLETTO GIALLO TORINO "	GRITZ	ARZANO	BELGRANO	AADRANO	LG3321	MARANO 0501	SISRED	ASTICO	JULIAN	LUCIA	PR36Y03	DKC6677	ISH301v	ALABASTRO	REDEL	ROANO	CORNIOLA	LOLITA	N43	DKC6309	KERMESS		
195	■																																		
225	■	■	■	■						■	■																								
258	■	■	■																																
270	■	■	■					■	■																										
290					■																														
295																																			
300	■	■	■	■										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
315	■	■	■	■			■	■						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
330																																			■
350					■																														■
360																																			■



**Locus SSR
N60**

KEY STUDY 4:

Identificazione di possibili contraffazioni in farine di mais piemontesi

3) **VALIDAZIONE:** Ricerca di eventuali contaminazioni di ibridi F1 in farine 100% Pignoletto rosso



**Farine commercializzate come 100%
Pignoletto rosso**



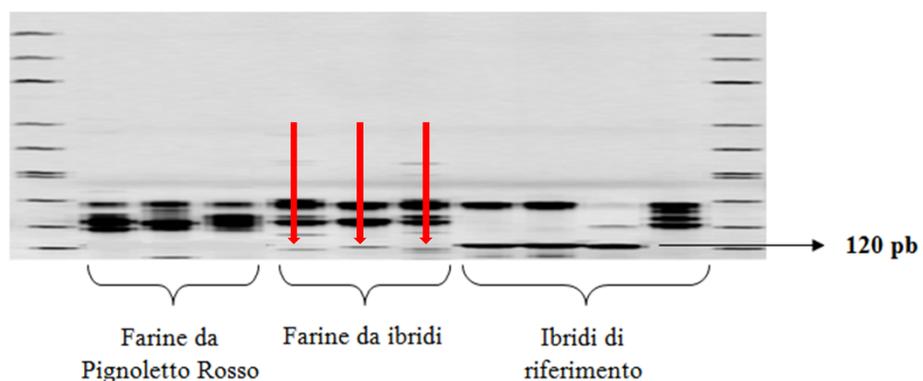
Farine commerciali

KEY STUDY 4:

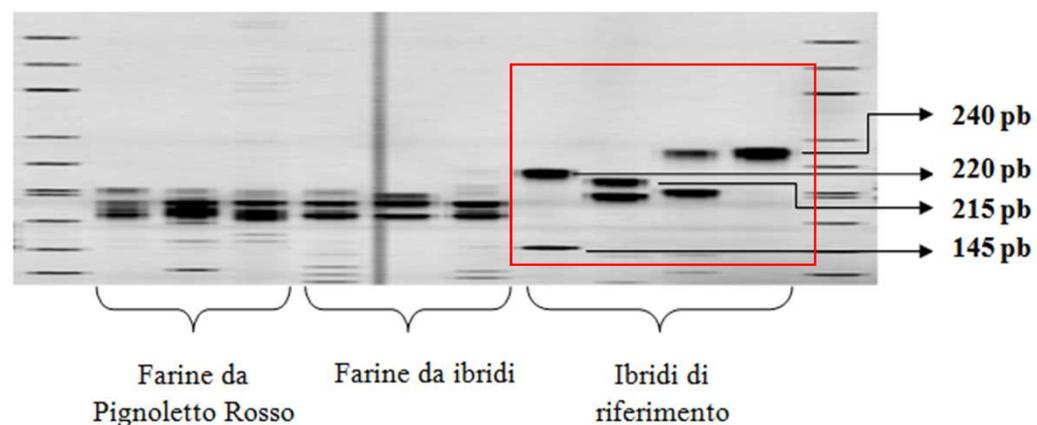
Identificazione di possibili contraffazioni in farine di mais piemontesi

3) **VALIDAZIONE:** Ricerca di eventuali contaminazioni di ibridi F1 in farine 100% Pignoletto rosso

SSR p-dupssr7



SSR p-dupssr10

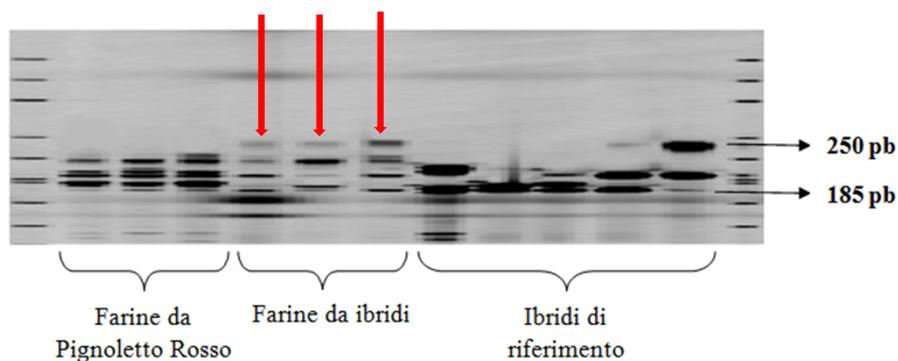


KEY STUDY 4:

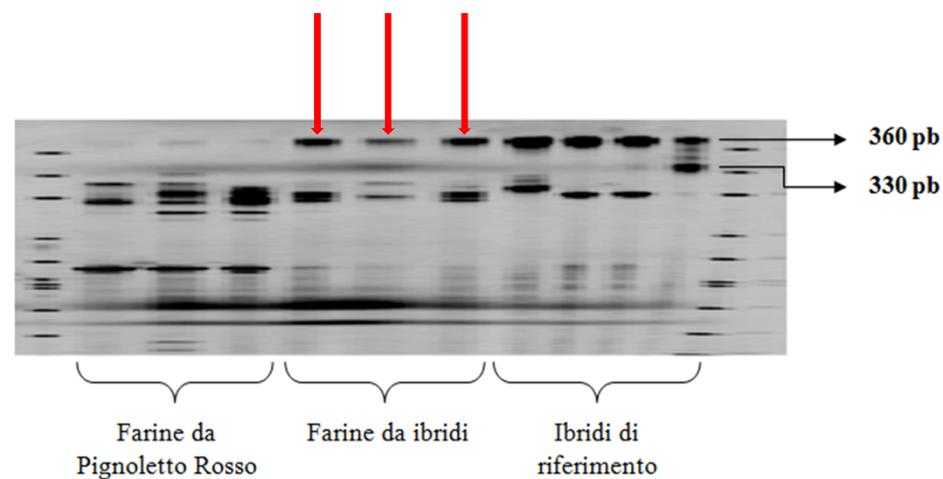
Identificazione di possibili contraffazioni in farine di mais piemontesi

3) **VALIDAZIONE:** Ricerca di eventuali contaminazioni di ibridi F1 in farine 100% Pignoletto rosso

SSR N22



SSR N60



KEY STUDY 5: Utilizzo dei marcatori SNP per la tracciabilità del Nebbiolo

Food Chemistry 312 (2020) 126100

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

ELSEVIER

FOOD CHEMISTRY

Single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping assays for the varietal authentication of 'Nebbiolo' musts and wines

Paolo Boccacci^a, Walter Chitarra^{a,b}, Anna Schneider^a, Luca Rolle^c, Giorgio Gambino^{a,*}

^a Institute for Sustainable Plant Protection, National Research Council (IPSP-CNR), Torino, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino, Italy
^b Council for Agricultural Research and Economics, Viticultural and Enology Research Centre (CREA-VE), Via XXVIII Aprile 26, 31015 Conegliano (Treviso), Italy
^c Department of Agricultural, Forest and Food Sciences, University of Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco, TO, Italy

Check for updates



Genetic traceability of 'Nebbiolo' musts and wines by Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping assays

KEY STUDY 5: Utilizzo dei marcatori SNP per la tracciabilità del Nebbiolo

Il "Nebbiolo" è rinomato per il suo uso nella **produzione di vini rossi monovarietali** di alta qualità, come Barolo e Barbaresco. La lotta contro le frodi per salvaguardare produzioni di alta qualità richiede un efficace sistema di identificazione varietale applicabile in mosti e vini.

A partire da database di **sequenze NGS** disponibili sono stati identificati **due marcatori SNP specifici per Nebbiolo**, in grado di identificare la varietà da 1150 altri genotipi.

SNP_14783

Sequenza
di Nebbiolo

→ ATGGTAGCCTG**G**TCGATGCTGA
ATGGTAGCCTG**A**TCGATGCTGA
ATGGTAGCCTG**A**TCGATGCTGA
ATGGTAGCCTG**A**TCGATGCTGA
ATGGTAGCCTG**A**TCGATGCTGA

SNP_15082

Sequenza
di Nebbiolo

→ GTATGACGCTG**T**CCTGAGTGCA
GTATGACGCTG**C**CCTGAGTGCA
GTATGACGCTG**C**CCTGAGTGCA
GTATGACGCTG**C**CCTGAGTGCA
GTATGACGCTG**C**CCTGAGTGCA

KEY STUDY 5: Utilizzo dei marcatori SNP per la tracciabilità del Nebbiolo

	Must/Wine	Description	DNA (ng/μl)	SNP_15082			SNP_14783		
				Alleles			Alleles		
				R1	R2	R3	R1	R2	R3
NEBBIOLO	M1_N	mashing	101 ± 51.6	TT	TT	TT	GG	GG	GG
	M2_N	48h yeast inoculum	422 ± 172.2	TT	TT	TT	GG	GG	GG
	M3_N	96h yeast inoculum	99.9 ± 21.3	TT	TT	TT	GG	GG	GG
	M4_N	end maceration	166.2 ± 42.1	TT	TT	TT	GG	GG	GG
	M5_N	after AF*	44.3 ± 25.5	TT	TT	TT	GG	GG	GG
	M6_N	after MLF**	39.7 ± 4.9	TT	-	TT	GG	-	GG
	W1_N	wine	7.7 ± 2.2	-	TT	TT	-	GG	GG
	W2_N	wine 1 year	14.7 ± 6.4	TT	-	-	-	GG	-
BARBERA	M1_B	mashing	274.9 ± 62.4	CC	CC	CC	AA	AA	AA
	M2_B	48h yeast inoculum	1867 ± 321.2	CC	CC	CC	AA	AA	AA
	M3_B	96h yeast inoculum	447.1 ± 158	CC	CC	CC	AA	AA	AA
	M4_B	end maceration	167.4 ± 93.7	CC	CC	CC	AA	AA	AA
	M5_B	after AF*	28.3 ± 11.1	-	CC	CC	AA	AA	AA
	M6_B	after MLF**	13.3 ± 1.1	-	CC	-	-	-	AA
	W1_B	wine	19.8 ± 7.5	-	CC	-	-	AA	-
	W2_B	wine 1 year	47 ± 4.24	-	CC	-	-	-	AA

KEY STUDY 5: Utilizzo dei marcatori SNP per la tracciabilità del Nebbiolo

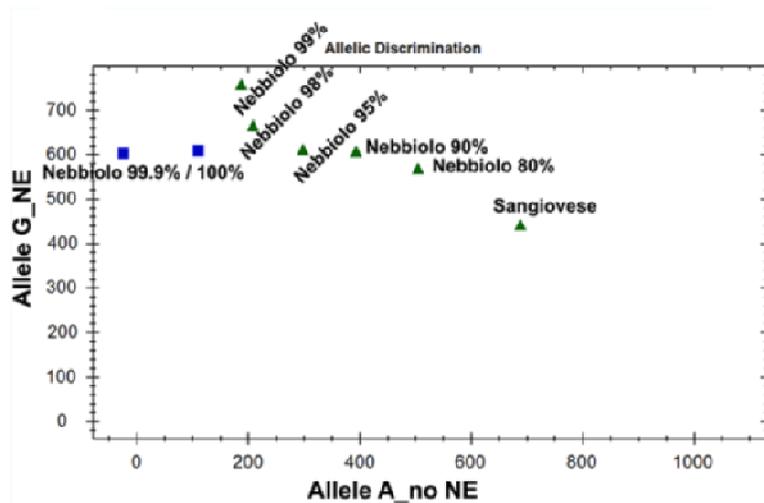
SNP_14783

Messa a punto del sistema
di rilevamento:

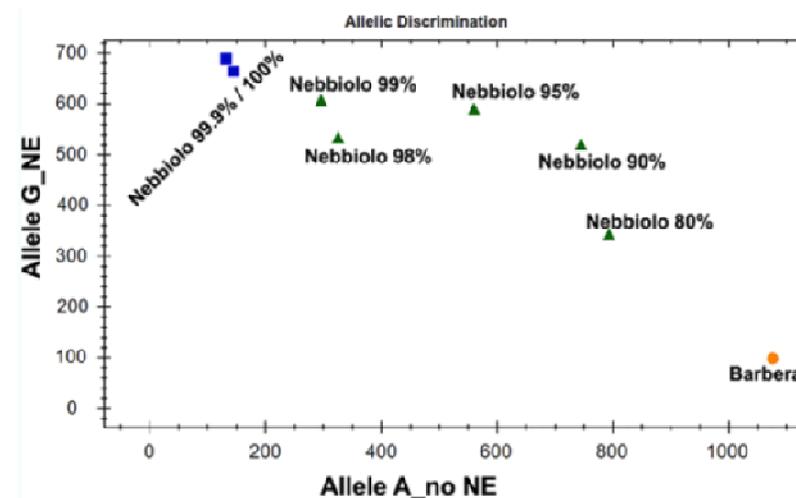
Nebbiolo omozigote G/G

- Homozygous Allele G/ Allele G
- Homozygous Allele A/ Allele A
- ▲ Heterozygous Allele G/ Allele A

Confronto con Sangiovese
(genotipo eterozigote G/A)



Confronto con Barbera
(genotipo omozigote A/A)



Solamente il campione 'Nebbiolo 99.9%' non è distinguibile dal campione 'Nebbiolo 100%'

Limite di detection su DNA estratto da foglie dell'1%

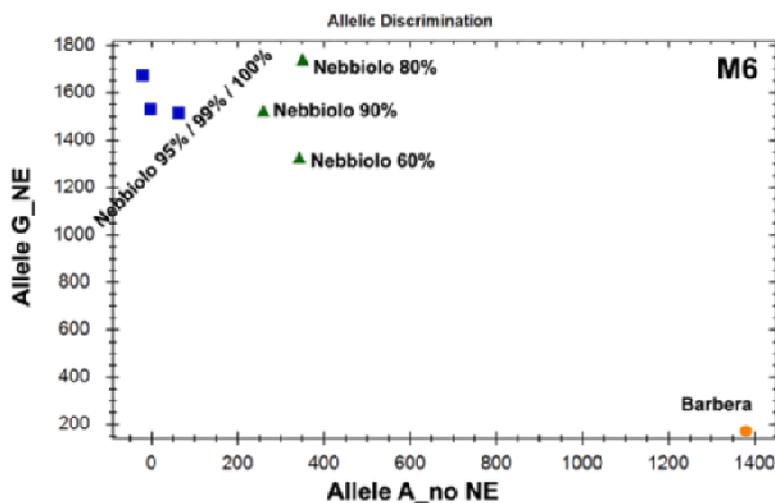
KEY STUDY 5: Utilizzo dei marcatori SNP per la tracciabilità del Nebbiolo

SNP_14783

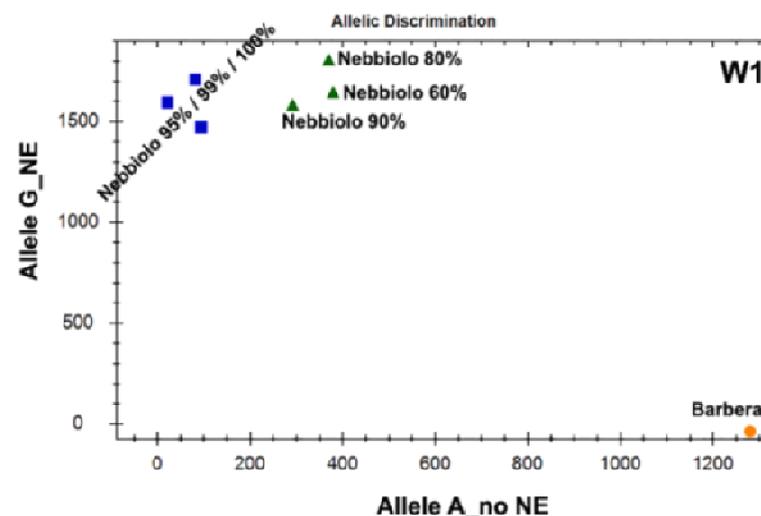
Valutazione su mosti e vini:
Nebbiolo omozigote G/G
Barbera omozigote A/A

■ Homozygous Allele G/ Allele G
● Homozygous Allele A/ Allele A
▲ Heterozygous Allele G/ Allele A

Mosto



Vino



I campioni 'Nebbiolo 95%' e 'Nebbiolo 99%' non sono distinguibili dal campione 'Nebbiolo 100%'

Limite di detection su mosti e vini del 10%



Efficienza limitata dalla minore quantità e qualità del DNA e dalla presenza di inibitori della PCR.

KEY STUDY 5: Utilizzo dei marcatori SNP per la tracciabilità del Nebbiolo

SNP_15082

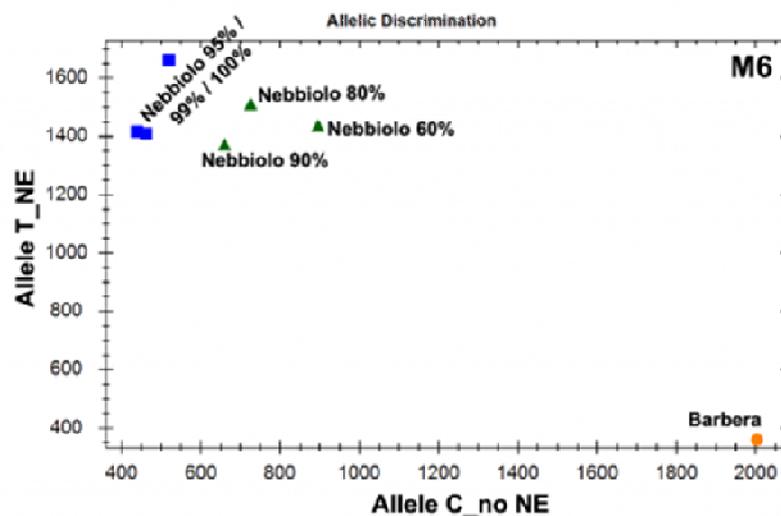
Valutazione su mosti e vini:

Nebbiolo omozigote T/T

Barbera omozigote C/C

■ Homozygous Allele T/ Allele T
● Homozygous Allele C/ Allele C
▲ Heterozygous Allele T/ Allele C

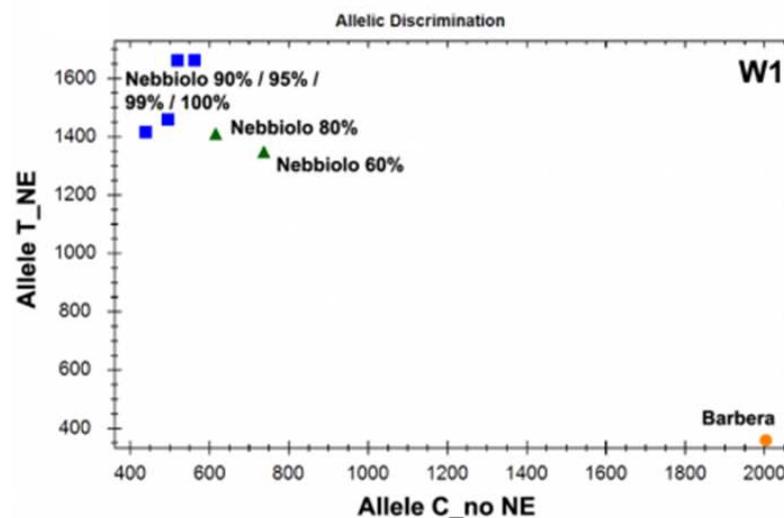
Mosto



I campioni 'Nebbiolo 95%' e 'Nebbiolo 99%' non sono distinguibili dal campione 'Nebbiolo 100%'

Il limite di detection di mosto Barbera è del 10%

Vino

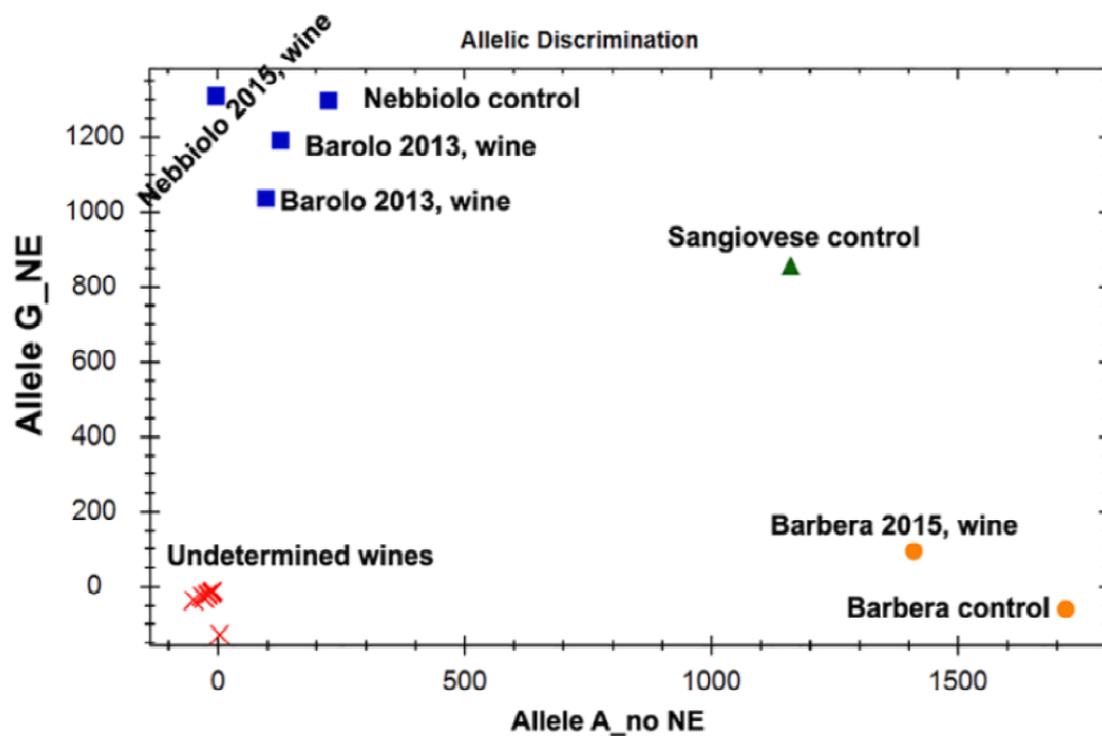


I campioni da 'Nebbiolo 90%' a 'Nebbiolo 99%' non sono distinguibili dal campione 'Nebbiolo 100%'

Il limite di detection di vino Barbera è del 20%

KEY STUDY 5: Utilizzo dei marcatori SNP per la tracciabilità del Nebbiolo

SNP_14783



Valutazione su vini commerciali:

Nebbiolo omozigote G/G

Barbera omozigote A/A

Sangiovese eterozigote G/A

■ Homozygous Allele G/ Allele G

▲ Heterozygous Allele G/ Allele A

● Homozygous Allele A/ Allele A

Grazie per l'attenzione

