



i tests molecolari

GENOMICA



PROTEOMICA

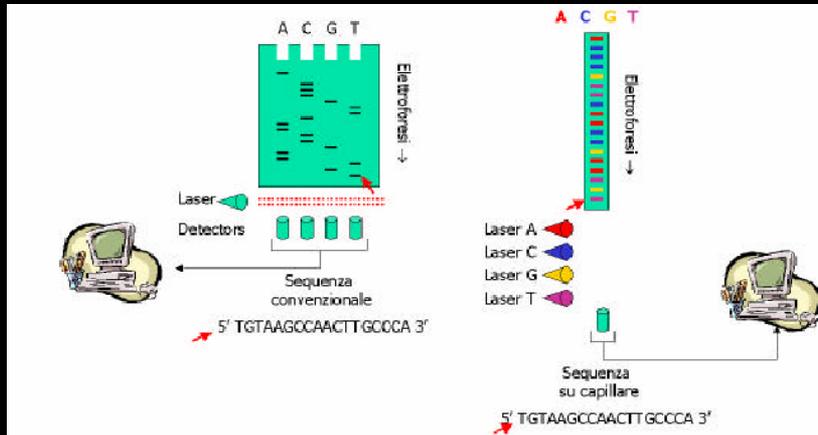


metodologie utilizzate

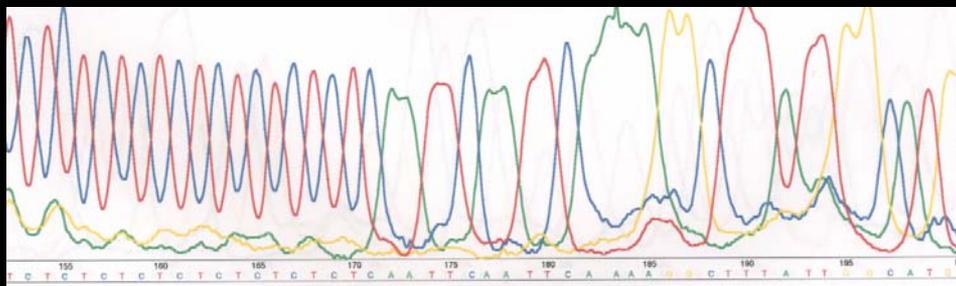
- analisi del DNA
- test basati su PCR (Polymerase Chain Reaction)
- analisi dei polimorfismi (microsatelliti) mediante sistemi manuali ed automatici
(ALF –express II, Amersham Pharmacia Biotech)



Principio del sequenziamento di DNA o analisi di frammenti



i microsatelliti



DNA satellite

minisatelliti

microsatelliti



cenni storici

- il DNA satellite (DNA a bassa complessità) è ubiquitario e in alcune specie eucariotiche rappresenta fino al 50% del DNA totale
- i MINISATELLITI consistono di unità ripetute fino a 50 volte: il loro impiego per la genotipizzazione dei primati risale agli anni '70 (Smith, Science, 1976)
- i MICROSATELLITI sono stati impiegati per la genotipizzazione della vite dal 1993 (Thomas e Scott, TAG, 1993)



cos'è la PCR o Polymerase Chain Reaction?

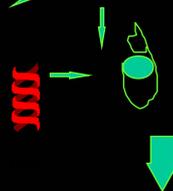


POTENZIALITA'

- amplificazione di un gene fino ad un miliardo di volte
- sviluppo di nuovi strumenti diagnostici molecolari



mix di reazione



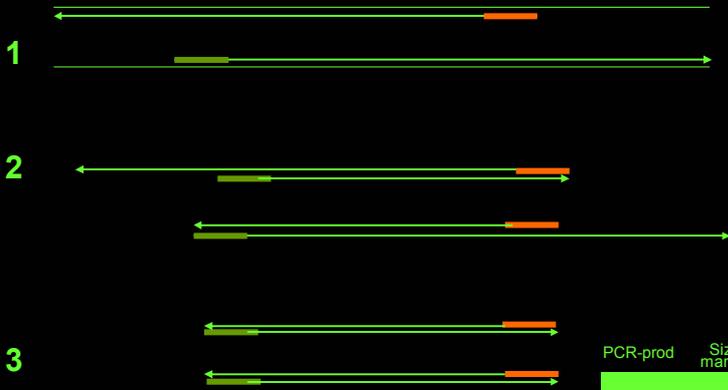
Analisi varietale o diagnosi di patologie virali della vite



PCR products (I)



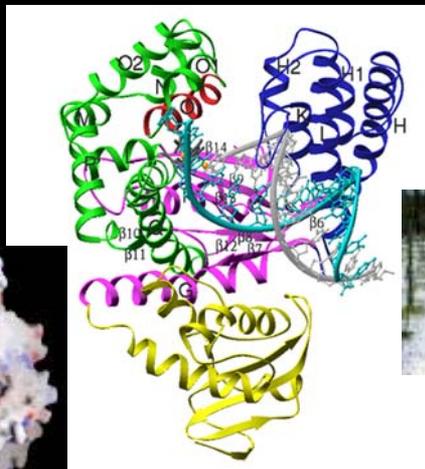
Cycle nr



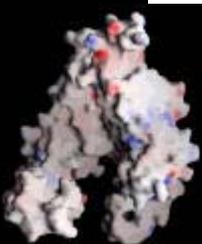
Electrophoresis



Taq DNA polymerase



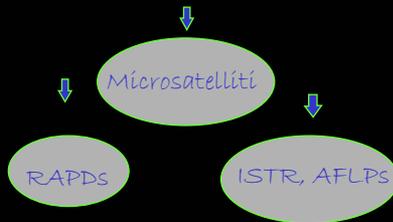
Thermus aquaticus





Progressi compiuti per i tests *in vitro*

- Tests basati su PCR



- Tests non basati sulla PCR



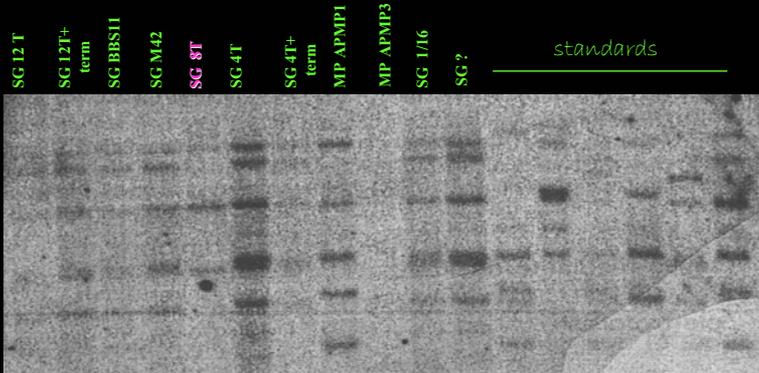
METODI *in vitro* Vantaggi e svantaggi

- riduzione dei tempi di analisi
- riduzione dei costi
- mancanza di standardizzazione
- circoscritta possibilità di applicazione

Gli attuali tests *in vitro* permettono di distinguere geneticamente tra varietà e di identificare precocemente alcuni patogeni (virus, batteri)



RFLP (Random Amplified Polymorphic DNAs)



Vignani et al., *Tecnologie avanzate per l'identificazione varietale...*
Proceedings Agro-Bio-Frut '94; pp. 97-102

DNA Analysis In Paternity Testing

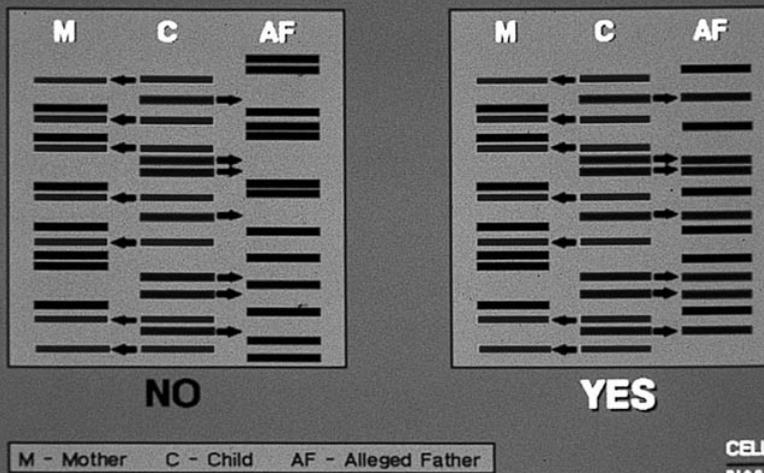


FIGURE 11.3p1 To establish paternity, DNA fingerprints of the mother, child, and alleged father are compared. The bands from the mother and child that co-migrate are identified, and the bands remaining in the child's fingerprint pattern are compared with those of the alleged father. The bands that do not match the mother's must come from the biological father. Schematic example: NO means alleged father is excluded and YES means alleged father is identified as the biological father.



Pattern RFLP Sangiovese (SG 8T)

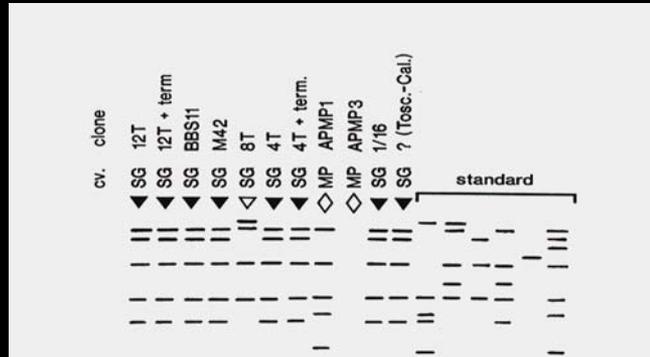


Fig. 3 - Rappresentazione schematica dei profili dei vitigni e dei cloni saggiati all'analisi RFLP. Si identificano 3 diverse tipologie, rappresentate rispettivamente dai cloni di Montepulciano (MP), dal clone classificato come Sangiovese SG 8 T e da tutti gli altri cloni di Sangiovese (SG), incluso quello coltivato in California.



RAPDs

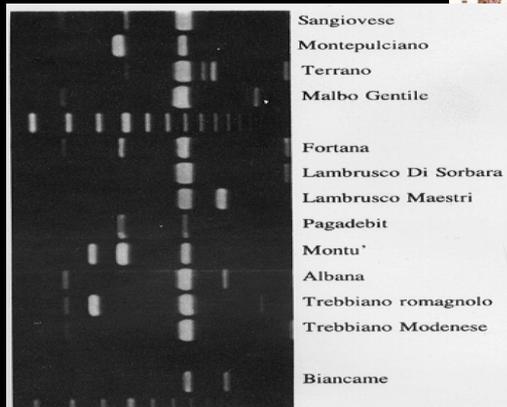


Fig. 2 - Single accessions of 13 different grape varieties characterized by RAPD amplicons with Operon primer A07. Unlabelled lanes are the 100 bp ladder (except for one empty lane).

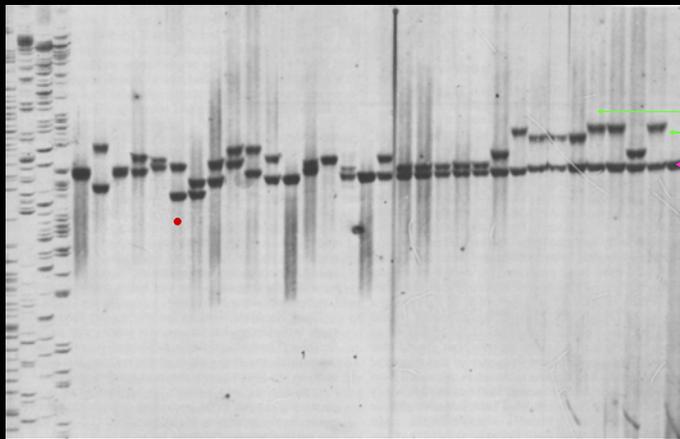


Fig. 3 - Five samples of Sangiovese and one of Montepulciano. The identity of the unknown Sangiovese sample, was first correctly identified by ampelometric analysis, and here confirmed by RAPD analysis with Operon primer A05.

Mulchay et al.,
Adv. Hort. Sci. (1995): 185-187



Microsatelliti: analisi dei polimorfismi

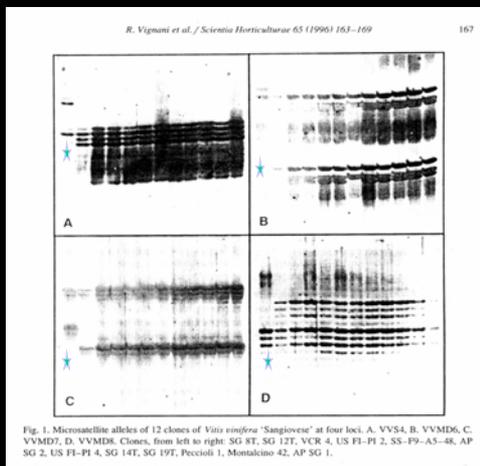


VVMD7

Bowers et al., *Genome* (1996): 39, 628-633



SG 8T; Sangiovese?



Vignani et al., *Sci. Hort.* (1996) 65; 163-169



AFLPs ed ISTRs su "Sangiovese" e "Colorino"

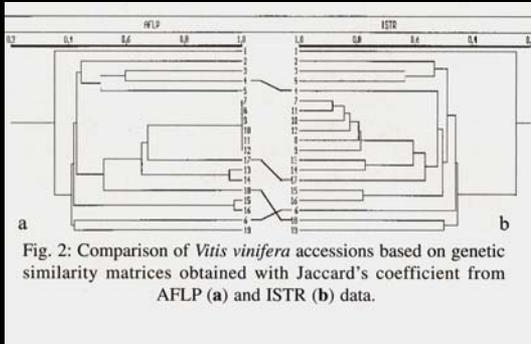
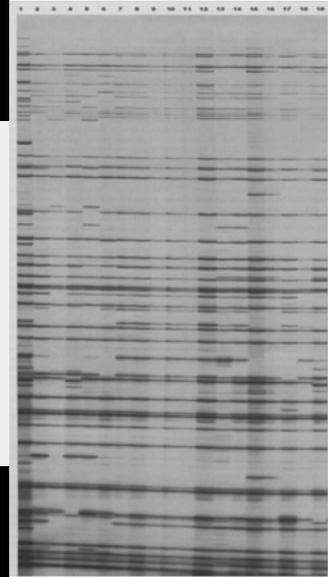


Fig. 2: Comparison of *Vitis vinifera* accessions based on genetic similarity matrices obtained with Jaccard's coefficient from AFLP (a) and ISTR (b) data.



Sensi et al., *Vitis* (1996) 35: 183-188



"Fortana", origine policlonale?

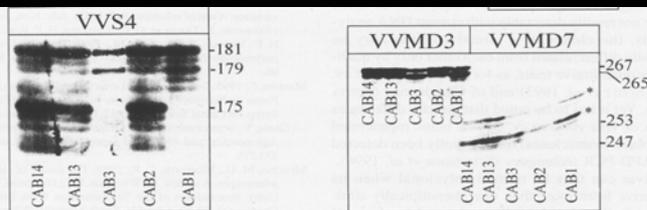


Figure: Genetic profiles of 5 Fortana clones obtained by PCR amplification of 6 microsatellite *loci* and subsequent electrophoresis of polyacrylamide gels and silver staining. Allele sizes are indicated on the right side of each gel.

Table 2

Allele sizes (bp) of 5 Fortana clones analysed at 6 microsatellite *loci*, previously distinguished into two morphological types

Clone	Morphological type	<i>Locus</i>					
		VVS1	VVS2	VVS4	VVMD3	VVMD6	VVMD7
CAB 2	1	188 182	153 137	181 175	267	212 211	253 247
CAB 13	1	188 182	153 137	181 175	267	212 211	253 247
CAB 14	1	188 182	153 137	181 175	267	212 211	253 247
CAB 1	2	190 182	153 145	181 179	267 265	212 194	253 247
CAB 3	2	190 182	153 145	181 179	267 265	212 194	253 247
Polymorphism		yes	yes	yes	yes	yes	no

Silvestroni et al., *Vitis*
36; 147-150



Vitigni autoctoni campani



- "Casavecchia" 1. VVS2
- "Pallagrello Nero" 2. VVS4
- "Aglianico" 3. VVS29
- "Mangiaguerra" 4. VVMD6
- "Piedirosso" 5. VVMD7
- 6. VVMD17
- 7. VVMD21
- 8. VVMD24

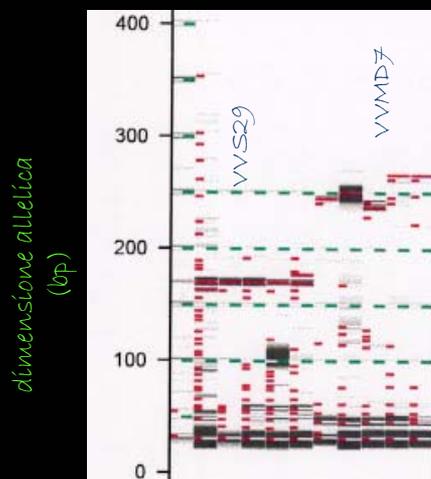


l'automazione dei test di microsatelliti





output dei dati



generazione di un
tabulato che
dimostra le
dimensioni alleliche
calcolate



tabella riassuntiva delle dimensioni alleliche

vitigno	VVS2	VVS4	VVS29	VVMD6	VVMD7	VVMD21	VVMD17	VVMD24
"Casavecchia"	133	169	163- 170	207 214	245	250 257	221	210
"Pallagrello N."	133	169	170	207 214	250	250 259	221	210
"Aglianico"	161	160 169	170	207 214	237	241	221	213
"Mangiaguerra"	158	160 169	170	207 214	266	249	221	210 214
"Piedirosso"	161	160 169	177	207 214	266	249	221	210 214



AlleleLinks™ 1.00

- dimensionamento automatico degli alleli
- genotipizzazione (controllo Mendeliano, valutazione della probabilità, ecc.)
- interfaccia con databases on-line
- possibilità di aggiornare o creare propri databases



genotipizzazione

amonsunpharmacia bioctch

AlleleLinks
Prelinkage Data

Used files: 251020-1.alx provacas.fmv

Pedigree	Ind	Fa	Mo	Sx	St	Li	VVS29	VVMD7
Aglanico	Aglanico	0	0	M	U	1	4 4	2 2
Casavecchia	Casavecchia	0	0	M	U	1	1 4	4 4
Mangiaguerra	Mangiaguerra	0	0	M	U	1	4 4	13 13
Pallagrello Nero	Pallagrello Nero	0	0	M	U	1	4 4	6 6
Piedrosso	Piedrosso	0	0	M	U	1	4 5	13 13

locus analizzato

VVMD7	VVS29
1 = 233 bp	1 = 163 bp
2 = 237 bp	2 = 171 bp
3 = 240 bp	3 = 175 bp
4 = 245 bp	4 = 170 bp
5 = 249 bp	5 = 177 bp
6 = 250 bp	
7 = 252 bp	
8 = 253 bp	
9 = 255 bp	
10 = 257 bp	
11 = 259 bp	
12 = 263 bp	
13 = 266 bp	



conclusioni

- degli 8 locus analizzati 6 risultano polimorfici (VVS2, VVS4, VVS29, VVMD7, VVMD21, VVMD24)
- si conferma la tipicità dei singoli vitigni
- la condivisione di alcuni alleli può far ipotizzare un certo grado di inbreeding (coterritorialità?)



Interpretare i dati





Interpretare i dati di analisi del DNA

- Ricerca di risposte quantitative e non semplicemente descrittive
- Valutazione comparativa dei programmi statistici disponibili (Allelelinks, Arlequin, Identity)
- Validazione dei test, creazione di standard genotipici (frequenza allelica)



Progetto ARSIA vite 1997-2001: obiettivi attesi

- Sviluppare test molecolari per la vite
- Descrizione degli standard genotipici a livello varietale
- Sviluppo di banche dati universali
- Trasporre i dati scientifici in strumenti di supporto per il mantenimento e il potenziamento del germoplasma viticolo toscano



L'impiego dei microsatelliti per l'identificazione di individui e per la stima della frequenza allelica nell'assegnazione dei parentali è subordinata al fatto di:

1. analizzare un grande numero di loci
2. avere un alto livello di polimorfismo in ciascun locus testato
3. avere indipendenza tra gli alleli



Il potere dei test sul DNA risiede nel **POLIMORFISMO** e nel **NUMERO** dei loci impiegati nonché nel tipo di campione (ampiezza di campionamento)