

RICCARDO VELASCO, GIUSEPPE FORLANI, DANIELE MIGLIARO,
TYRONE POSSAMAI, LOREDANA MOFFA, MARTINA PASETTI

Strategie alternative di lotta ai patogeni: caso studio delle resistenze genetiche a Peronospora e Oidio nella cultivar Glera (Vitis vinifera sp.)

1. Introduzione

In Italia il comparto del vino rappre-

senta una componente di primo piano per il settore agro-alimentare. La Federvini ha stimato che nel 2020 il totale della super-

Tabella 1 – Produzione di vino e mosti in Italia dal 2014 al 2020. Fonte dati www.istat.it

Produzione vino e mosti regioni italiane (hl/1000)							
Regione	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Abruzzo	2.224	2.936	3.899	3.110	3.112	3.088	2.887
Basilicata	102	87	86	85	86	86	91
Calabria	314	404	428	337	337	305	280
Campania	1.183	1.614	1.286	1.293	1.376	1.391	1.403
Emilia-Romagna	6.334	6.752	7.165	5.457	7.340	5.766	6.659
Friuli Venezia-Giulia	1.367	1.872	1.856	1.639	1.709	1.709	1.624
Lazio	1.284	1.676	1.524	1.135	1.289	1.443	1.450
Liguria	63	79	69	76	78	84	79
Lombardia	1.424	1.410	1.473	1.183	1.719	1.327	1.476
Marche	915	959	956	860	878	878	932
Molise	297	292	250	339	467	451	402
Piemonte	2.402	2.467	2.549	2.043	2.658	2.525	2.571
Puglia	4.593	7.313	8.792	9.070	9.806	9.773	9.764
Sardegna	746	794	804	466	841	629	602
Sicilia	3.824	5.476	5.334	4.725	4.989	5.685	4.465
Toscana	2.778	2.825	3.025	1.901	2.597	2.627	2.603
Trentino Alto-Adige	1.029	1.230	1.213	1.018	1.355	1.153	1.133
Umbria	670	765	741	609	630	629	644
Valle D'Aosta	15	14	21	10	20	19	21
Veneto	8.177	9.733	10.145	8.473	12.866	10.293	10.826

ficie vitata supera i 666.000 mila ettari, di cui il 60% è concentrata in solo 5 regioni: Veneto, Sicilia, Puglia, Toscana ed Emilia-Romagna. Secondo l'ISTAT, nel biennio 2019/2020 la produzione di vino ha sfiorato i 50milioni di ettolitri, di cui il 70% del totale rappresenta vini a Denominazione di Origine Controllata (DOC), o a Indicazione Geografica Tipica (IGT), e il 57% del totale è rappresentato dai vini bianchi. Inoltre, dai dati risulta che la regione in testa alla classifica, per quanto riguarda la produzione, è il Veneto, con circa 10,5 milioni di ettolitri prodotti (Tab. 1).

Il grande successo della regione Veneto in campo enologico è anche dovuto al suo patrimonio di vitigni autoctoni, tra i quali troviamo "Glera". Già in epoca romana erano note le uve di questo vitigno, coltivato inizialmente nella località Prosecco, vicino a Trieste. Con l'istituzione della DOCG Prosecco di Conegliano-Valdobbiadene, però, è sorta la necessità di tutelare la denominazione di origine, e si è quindi posta l'attenzione a non confon-

dere il nome del vino con quello del vitigno. Grazie al D.M. 21/07/2009 il vitigno Prosecco prende ufficialmente il nome di Glera. (Fig. 1)

La viticoltura in Italia e in Veneto ha origini antichissime, dai romani fino al medioevo, dove i valori religiosi assunti dal vino, insieme ai fattori economici, contribuirono a incrementare la coltivazione della vite. Con l'avanzare dei secoli si ha una sempre maggiore espansione della cultura del vigneto, non solo in campagna, ma anche nelle grandi città, come Verona, Padova e Venezia (www.piandellevette.it). L'inizio dell'Ottocento, invece, segna un momento di decadenza per la viticoltura a causa della diffusione di malattie sconosciute quali peronospora e oidio. I vigneti affetti da queste due fitopatologie subiscono danni sia qualitativi per l'apporto di sostanze sgradite nei frutti, sia quantitativi a causa di una riduzione della superficie fotosintetica che porta alla caduta delle foglie e del grappolo (ENCIN *et al.*, 2007). Perciò, se prima la vite era coltivata in

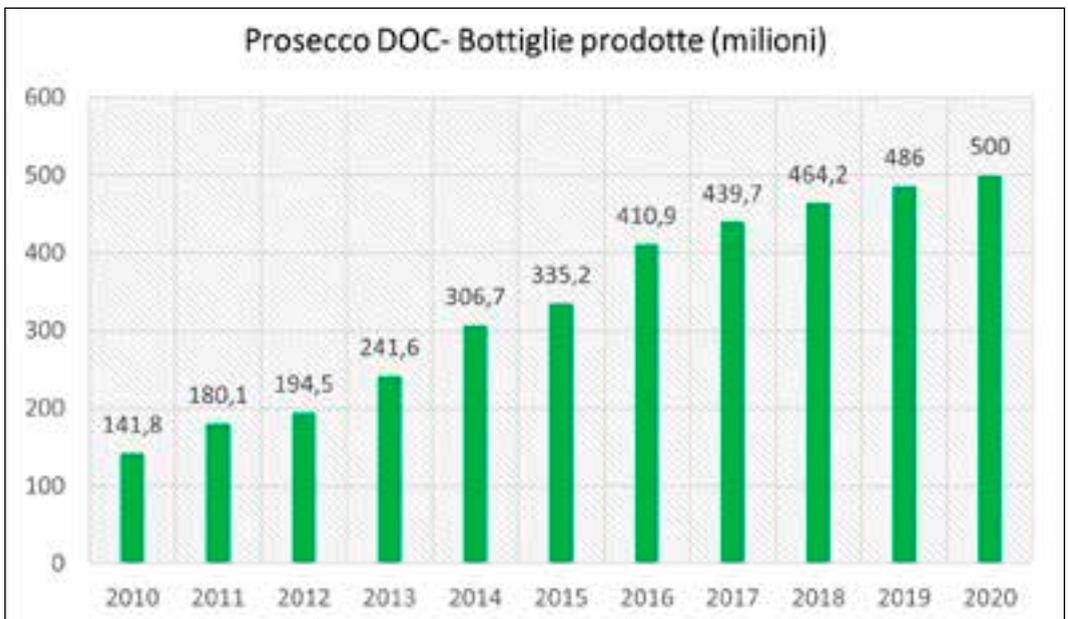


Figura 1 – Andamento della produzione di bottiglie di Prosecco DOC dal 2010 al 2020. Fonte "Consorzio di tutela del Prosecco DOC", sito online www.prosecco.wine.



Figura 2 – Presenza di *P. viticola* sulla pagina inferiore di una foglia di vite.



Figura 3 – Foglia di vite che mostra macchie polverulente sulla pagina superiore.

modo sostenibile, senza ricorrere a particolari strategie di difesa, con l'arrivo delle nuove patologie si è reso necessario l'uso degli agrofarmaci (CAPRARO *et al.*, 2008).

La peronospora è causata da *Plasmopara viticola*, un oomicete parassita obbligato della vite, che attacca tutti i tessuti fotosintetici della pianta come foglie, infiorescenze, acini di piccole dimensioni e l'asse del germoglio (Fig.2) (BRILLI *et al.*, 2018). Lo sviluppo del fungo è strettamente correlato alla disponibilità di acqua tanto che le zone con microclima più umido registrano una maggiore diffusione del patogeno (ARMUO *et al.*, 2016).

Erisiphe necator è invece un fungo ascomicete ed è l'agente eziologico dell'oidio, anche conosciuto come "mal bianco", in quanto la malattia si manifesta come macchie pulverulente sulla pagina superiore dei tessuti verdi della vite (Fig.3) (QIU *et al.*, 2015). A differenza della peronospora, questa malattia è sfavorita dalla presenza di acqua sulle foglie ma al tempo stesso l'aumento di umidità relativa che si registra dopo la pioggia favorisce la crescita del patogeno (GADOURY *et al.*, 2012).

La lotta a peronospora e oidio, ma più in generale a tutte le fitopatologie gestibili attraverso interventi fitosanitari, è un argomento di cui si è spesso dibattuto negli ultimi anni, soprattutto a fronte della necessità di gestire in modo più sostenibile

il vigneto e dell'insorgenza di resistenze ai fitofarmaci da parte dei patogeni. Esistono in commercio preparati compatibili con i disciplinari di lotta integrata e lotta biologica, che permettono di ridurre il danno ambientale causato dalle sostanze chimiche, ma che purtroppo non risolvono tutti i problemi legati alle colture (AVENOT *et al.*, 2010).

In natura le piante possiedono dei meccanismi di difesa verso i patogeni, basati su processi chimici, biochimici ed enzimatici. Le strategie di risposta delle piante sono in continua evoluzione e consentono alle specie di sopravvivere agli attacchi e ai cambiamenti, sempre più frequenti, dei patogeni (PERESSOTTI *et al.*, 2010). Le specie appartenenti al genere *Vitis* possono portare nessuno, uno o più meccanismi di difesa verso peronospora e/o oidio, e questo si traduce nella presenza di accessioni che possono essere classificate come suscettibili, parzialmente resistenti e completamente immuni alle malattie (ENCIN *et al.*, 2007).

Nel 2007 è stato completamente sequenziato il genoma di *Vitis vinifera* e questo ha permesso di conoscere l'organizzazione, il contenuto e la struttura del suo DNA (JAILLON *et al.*, 2007; VELASCO *et al.*, 2007). Tra i geni studiati durante il sequenziamento si trovano quelli che controllano le interazioni pianta-patogeno, ovvero quei meccanismi che portano all'attivazione di una via

di difesa chiamata “gene-per-gene”. Questa via è molto comune e si basa sull’interazione tra specifici geni del patogeno e i geni della pianta (DANGL *et al.*, 2001).

Nel caso di *V. vinifera*, si è scoperto che la resistenza a peronospora e oidio è data dalla presenza di QTL, o Quantitative Trait Loci (regioni del genoma associate ad un carattere) dove però sono presenti molte sequenze geniche deputate all’attivazione dei meccanismi di risposta all’attacco dei patogeni (COLLARD *et al.*, 2005).

I QTL di resistenza a peronospora finora identificati sono 31 (<http://www.vivc.de/>) anche se i più studiati sono *Rpv1*, *Rpv3* e i suoi alotipi, *Rpv10* e *Rpv12*, mentre i QTL di resistenza a oidio sono 14 (<http://www.vivc.de/>), ma *Run1*, *Ren1* e *Ren3* sono i loci maggiormente utilizzati nell’ambito della ricerca.

Le specie resistenti a peronospora e oidio sono state ampiamente sfruttate per il trasferimento dei caratteri di interesse nelle varietà europee di *V. vinifera* suscettibile ai patogeni (SCHOUTEN *et al.*, 2006). Il miglioramento genetico di *V. vinifera* attraverso incrocio permette di trasmettere in sicurezza le resistenze alle malattie ma, allo stesso tempo, deve anche garantire la loro durata in termini di tempo. Per questo motivo nel breeding convenzionale si ricerca la piramidazione delle resistenze, ovvero l’introggressione in una pianta di più loci contrastanti la stessa malattia, che a loro volta attivano nell’organismo più livelli di difesa. La piramidazione rende, quindi, le resistenze più efficaci e rallenta l’evoluzione dei meccanismi di virulenza sviluppati dai patogeni (JOHNSON, 1984).

Oggi, i progetti di breeding convenzionale sono affiancati da pratiche di biologia molecolare e non si basano più sulla sola osservazione fenotipica. La MAS, o Marker Assisted Selection, è uno strumento basato sull’associazione esistente tra marcatori molecolari e caratteri fenotipici che permettono di selezionare precocemente gli individui ottenuti dagli incroci tradizionali. In questo modo è possibile ridurre i tempi di valutazione di nuo-

ve piante da qualche anno a pochi mesi, razionalizzando l’attività di miglioramento genetico (COLLARD *et al.*, 2008).

La selezione di varietà resistenti alle principali malattie è di grande interesse in viticoltura in quanto permettono di ridurre l’uso dei fitofarmaci e l’insorgenza di ceppi patogeni resistenti ai maggiori principi attivi di sintesi (ZYPRIAN *et al.*, 2016).

Il Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l’Analisi Economica Agraria (CREA), in particolare la sezione Viticoltura ed Enologia (CREA-VE) di Conegliano, ha intrapreso un progetto di sviluppo di nuovi genotipi di vite resistenti a peronospora e oidio basato sull’incrocio tradizionale e una selezione preliminare tramite i marcatori molecolari (SSR). Il programma verte sul miglioramento della varietà “Glera” particolarmente suscettibile a entrambe le ampelopatie. A tal fine, incroci tra Glera e differenti cultivar resistenti sono stati attuati negli scorsi anni per introgredire e piramidare molteplici loci di resistenza.

2. Materiali e metodi

2.1 Parentali e combinazioni di incrocio

Negli incroci sono stati utilizzati differenti cloni della varietà “Glera” selezionati in passato dal CREA (all’epoca Istituto Sperimentale per la Vitecoltura- ISV): Glera ISV 10, Glera ISV 14 e Glera ISV 19.

I parentali resistenti sono stati scelti in base a due principali caratteristiche: la resistenza ai patogeni e le proprietà enologiche delle uve prediligendo cultivar a bacca bianca. Le varietà resistenti provengono da diversi centri di breeding presenti in tutta Europa (www.vivc.de): una parte è già stata immessa nel mercato, mentre altre sono ancora in fase di selezione.

Per poter seguire tutte le fasi di incrocio sono state prese in considerazione le popolazioni segreganti degli anni 2017, 2018 e 2019. Nelle tabelle che seguono (Tab. 2 e 3) sono elencate le combinazioni d’incrocio e le caratteristiche di tutti i parentali impollinatori utilizzati.

Tabella 2 – Descrizione degli incroci seguiti durante il 2018/2019 ottenuti negli anni 2017,2018 e 2019.

ANNO DI INCROCIO	PARENTALE PORTA SEME	PARENTALE IMPOLLINATORE
2017	Glera ISV19	Soreli
2017	Glera ISV10	Muscaris
2017	Glera ISV19	Muscaris
2018	Glera ISV19	Calardis Blanc
2018	Glera ISV10	Calardis Blanc
2018	Glera ISV19	SK-00-1/2
2018	Glera ISV14	SK-00-1/2
2018	Glera ISV10	SK-00-1/1
2018	Glera	C50
2018	C50	Glera 10
2018	Glera	Cabernet Cantor
2018	Glera ISV10	Cabernet Cantor
2018	Glera ISV19	Cabernet Cantor
2019	Glera	Artaban
2019	Glera	881
2019	Glera ISV10	Vidoc
2019	Glera ISV19	Vidoc
2019	Glera ISV10	VC531.039
2019	Glera ISV19	VC531.039
2019	Glera ISV10	686
2019	Glera ISV19	686
2019	Glera ISV10	Voltis
2019	Glera ISV19	Voltis
2019	Glera ISV10	Floreal
2019	Glera ISV19	Floreal



Figura 4 – Grappolo demascolato dentro al sacchetto di pergamino.

2.2 Ottenimento delle progenie segreganti

Le progenie F1 del 2019 sono state ottenute tramite impollinazione incrociata presso i campi sperimentali del CREA di Spresiano (TV) e di Susegana (TV). Le in-

Tabella 3 – Elenco principali loci di resistenza portate dalle varietà scelte e confermati attraverso preliminari analisi con marcatori SSR.

PARENTALE IMPOLLINANTE	ANNO DI INCROCIO	PERONOSPORA				OIDIO			COLORE BACCA
		Rpv11	Rpv32	Rpv103	Rpv124	Ren3/Ren95	Ren16	Run11	
Soreli	2017		X		X				Bianco
Muscaris	2017			X		X			Bianco
Calardis Blanc	2018		X			X			Bianco
Cabernet Cantor	2018		X	X		X			Nero
C50	2018		X		X	X			Bianco
SK-00-1/1	2018		X		X	X			Bianco
SK-00-1/2	2018		X		X	X			Bianco
01-1-881	2019	X			X			X	Bianco
01-1-686	2019	X			X			X	Bianco
VC531.039	2019	X	X		X		X	X	Bianco
Artaban	2019	X	X			X		X	Nero
Vidoc	2019	X	X			X		X	Nero
Floreal	2019	X	X			X		X	Bianco
Voltis	2019	X	X			X		X	Bianco



Figura 5 – Aspetto del grappolo dopo l'allegagione.



Figura 6 – Grappolo post- allegagione dentro al sacchetto di tulle.

fiorescenze selezionate sono state private della caliptra e degli stami (emasculazione) 7-10 giorni prima della fioritura per evitare fenomeni di autofecondazione. Mantenendo i grappoli dentro i sacchetti di pergamino (Fig. 4), ad alcuni giorni di distanza il polline è stato versato sul grappolo e distribuito uniformemente tramite insufflazione.

Il grappolo è stato mantenuto nel sacchetto di pergamino fino alla completa allegagione (Fig. 5). Dopo questa fase si sono utilizzati dei sacchetti in tulle che permettono al grappolo di respirare e ricevere tutto il sole necessario per la maturazione degli acini, ma al tempo stesso di essere protetto da insetti e uccelli (Fig. 6).

2.3 Estrazione e germinazione dei vinaccioli

In questo caso il protocollo di estrazione e germinazione è stato eseguito sugli incroci del 2018, i cui grappoli sono stati raccolti nel mese di settembre dello stesso anno.

Ogni singolo vinacciolo è stato estratto, ripulito e poi mantenuto in acqua a 4°C per 24 h. Trascorso quest'arco di tempo, è stato fatto un secondo lavaggio in perossido di

idrogeno 0.5 M per altre 24 h a temperatura ambiente. I vinaccioli sono poi stati sciacquati con acqua, ripuliti con carta e fatti vernalizzare per almeno tre mesi in capsule Petri di vetro contenenti sabbia umida.

In primavera i semi sono stati lavati dalla sabbia con acqua sterile e poi tenuti in una soluzione di perossido di idrogeno al 50% per 15-30 minuti. Dopo un ulteriore risciacquo i vinaccioli sono stati messi a germinare in nuove piastre Petri su un foglio di carta da filtro inumidito con acqua deionizzata autoclavata, in camera di crescita a 26°C seguendo un ciclo giornaliero di 16 ore di luce e 8 di buio. In queste condizioni la germinazione nella maggior parte dei casi è stata raggiunta in 6-10 giorni. Successivamente i vinaccioli sono stati prelevati singolarmente e seminati in vasetti contenenti terra mista a perlite. Le piante sono poi state mantenute irrigate in serra e dopo circa due mesi hanno subito un rinvaso.

2.4 MAS: Marker Assisted Selection

Il passaggio successivo ha previsto la selezione degli individui delle progenie da

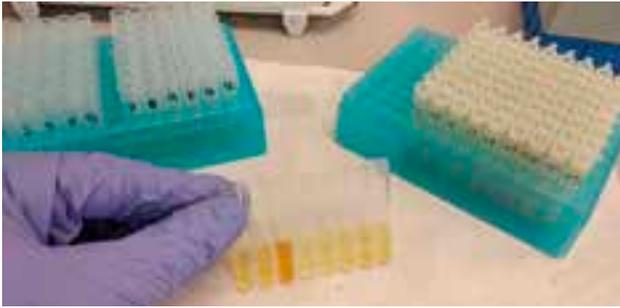


Figura 7 – Estrazione del DNA con kit commerciale.



Figura 8 – Strumento utilizzato per campionare il materiale vegetale (1 cm).

incrocio tramite amplificazione e analisi di marcatori molecolari. Da ogni pianta è stata prelevata una foglia e da essa sono stati ricavati 3 dischetti da 1 cm di diametro e posizionati in Collection Microtube da 96 (DNAasy 96 kit plant della Qiagen) per essere poi liofilizzati. Gli incroci su cui è stata operata la selezione molecolare sono quelli eseguiti nel 2017 (Fig.7 e 8).

Prima del campionamento è stata fatta una pre-selezione negativa, su base fenotipica, degli individui più sintomatici. Infatti, grazie ad una infezione naturale da oidio avvenuta in serra nel mese di settembre

2018 è stato possibile valutare ed eliminare un numero significativo di piante perché visibilmente non resistenti.

2.5 Estrazione e quantificazione del DNA genomico

La corsa elettroforetica su gel ha permesso di controllare l'integrità del DNA genomico estratto. Le immagini delle corse sono state sfruttate per una analisi semiquantitativa dei campioni. Partendo dall'informazione ottenuta al NanoDrop One e dall'intensità della banda di alcuni campioni di

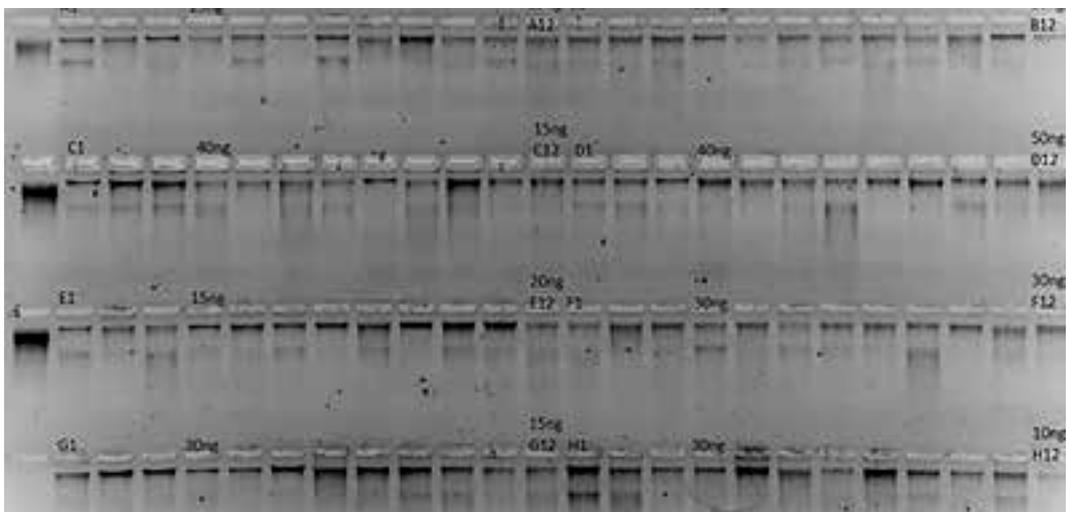


Figura 9 – Esempio di analisi semiquantitativa. I numeri in corrispondenza di alcuni pozzetti sono i dati ottenuti dalla quantificazione al NanoDrop One.

riferimento, è stato possibile stimare la concentrazione del DNA degli altri campioni (Fig.9).

Il gel di agarosio 1% (AppliChem GmbH, Darmstad, Germany) è stato preparato con TBE 0.5X e come intercalante è stato usato il Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Germany).

Ogni pozzetto è stato caricato con 5 µl di DNA genomico e 5 µl di Loading Buffer Blue 2X (glicerolo 20-30%, Bionline Company). La corsa elettroforetica è avvenuta con un voltaggio di 100V per almeno 40 minuti. Le foto-documentazioni dei gel sono state rilevate con lo strumento Gel Doc XR+ System (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) mentre l'immagine è stata elaborata con il Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA).

Dopo la fase di quantificazione tutti i campioni di DNA genomico estratto sono stati diluiti con acqua DNase free ad una medesima concentrazione di lavoro di 2 ng/µl.

2.6 Amplificazione del DNA genomico

I loci di resistenza seguiti sono: *Rpv3-1*, *Rpv10*, *Rpv12* per peronospora e *Ren3/Ren9* per oidio. Nella popolazione 'Glera ISV19 x Soreli' i marcatori analizzati sono stati VMC7F2 e UDV737 per il locus *Rpv3*, UDV350 e UDV360 per il locus *Rpv12*, che identificano due diverse resistenze a peronospora. Mentre per le popolazioni 'Glera ISV 19 x Muscaris' e 'Glera ISV10 x Muscaris' gli SSR erano GF09-46 e GF09-47 per il locus *Rpv10*, GF15-28, GF15-30 e CenGen6 per il locus *Ren3/9*.

I primers *forward* di ogni SSR sono stati marcati con dei diversi fluorocromi per la successiva visualizzazione su corsa elettroforetica capillare e per poter eseguire delle multiplex PCR (Tab. 4 e 5). Le reazioni sono state ottimizzate utilizzando la Taq Polimerasi KAPA2G Plant PCR Kit (Kapa Biosystem Inc., Wilmington, Massachusetts)

La mix di PCR è stata preparata per un volume finale di 12.5µl:

Le amplificazioni sono state eseguite

Tabella 4 – Condizioni finali di PCR della popolazione "Glera ISV19 x Soreli".

Mix multiplex PCR "Glera ISV19 x Soreli" (Vf= 12.5µl)	
Reagente	Concentrazione finale
H ₂ O distillata	A volume
Kapa2G PCR Buffer	1X
MgCl ₂ 15 mM	2 mM
VMC7F2 (f e r)	0.02 µM
UDV737 (f e r)	0.16 µM
UDV350 (f e r)	0.1 µM
UDV360 (f e r)	0.056 µM
Kapa2G Polimerasi	2.5 u/µl

Tabella 5 – Condizioni di PCR delle popolazioni segreganti "Glera ISV10/19 x Muscaris"

Mix multiplex PCR "Glera ISV 10/19 x Muscaris" (Vf= 12.5µl)	
Reagente	Concentrazione finale
H ₂ O distillata	A volume
Kapa2G PCR Buffer	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTP's	0.2 µM
GF09-46 (f e r)	0.08 µM
GF09-47 (f e r)	0.048 µM
GF15-28 (f e r)	0.1 µM
GF15-30 (f e r)	0.14 µM
Kapa2G Polimerasi	2.5 u/µl

Tabella 6 – Programma di PCR.

Profilo termico multiplex PCR 12.5 µl		
Denaturazione iniziale	94 °C	4 minuti
35 cicli	Denaturazione 94 °C	45 secondi
	Appaiamento 56 °C	1 minuto e 30 secondi
	Allungamento 72 °C	1 minuti
1 ciclo	Allungamento finale 72 °C	20 minuti

nel termociclatore TC-412 della TECHNE (Staffordshire, OSA, UK) con il seguente programma (Tab. 6)

L'esito della PCR è stato verificato in gel d'agarosio (1%) su alcuni campioni random. Questa analisi ha permesso di verificare la bontà e la specificità delle amplificazioni, nonché di valutare il parametro di diluizione più appropriato dei prodotti di amplificazione prima della loro separazione tramite elettroforesi capillare.

2.7 analisi dei genotipi tramite corsa elettroforetica capillare

I prodotti ottenuti dalla reazione di PCR sono stati diluiti e corsi in elettroforesi capillare. Lo strumento utilizzato per il sequenziamento è ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied biosystem, Darmstadt, Germany) a 16 capillari, che permette la separazione dei frammenti di PCR e la determinazione delle misure alleliche dei differenti marcatori studiati.

Il protocollo di caricamento dei campioni nel sequenziatore è il seguente:

1. I campioni sono stati caricati su piastre da 96 pozzetti dentro i quali sono stati aliquotati 9.35 μ l di formamide (Applied Biosystem, Darmstadt, Germany), 0.15 μ l di un marcatore di peso molecolare (Genescan-500 LIZ size standard, Applied Biosystem, Darmstadt, Germany) e 0.5 μ l di prodotto di PCR;
2. I campioni sono stati posti su un termociclatore per 5 minuti a 96°C per denaturare il DNA e permettere alla formamide di legarsi alle singole eliche evitando che queste si richiudessero;
3. Infine, le piastre sono state posizionate nell'apposito alloggiamento del sequenziatore.

I dati ottenuti dall'analisi dei frammenti di PCR (genotyping) sono stati elaborati mediante il software GeneMapper 4.0 (Applied Biosystem, Darmstadt, Germany), in cui è stato precedentemente impostato un "Bin set" ottimale per i marcatori analizzati, inserendo in un pannello di analisi il nome, il range di lunghezza del marcatore, il colore del fluorocromo combinato con il primer forward e gli alleli possibili per ogni marker (individuati da un range stretto che prende il nome di bin). La definizione del

"Bin Set" consente quindi l'assegnazione e la trascrizione automatica degli alleli di ogni SSR.

In base ai risultati ottenuti dalle analisi dei genotipi, le piante ritenute idonee sono state messe a dimora in vigneto a fine marzo, franche di piede, a distanza di 50 cm l'una dall'altra. Esse sono state poste in campo sulla base della progenie di appartenenza e dei loci di resistenza ereditati. In ordine, sono stati piantati i genotipi delle popolazioni "Glera ISV10 x Muscaris", "Glera ISV19 x Muscaris" e infine "Glera ISV19 x Soreli".

3. Risultati e discussione

3.1 Incroci convenzionali

Nel 2019 sono stati operati 11 incroci a partire dalla cultivar "Glera" con diversi parentali resistenti, per un totale di 102 grappoli. Il 50% dei grappoli, però, è risultato non vitale, perché si ipotizza che al momento dell'impollinazione gli ovari delle infiorescenze fossero ad uno stadio di maturazione avanzato. In oltre il polline dei parentali "Artaban", "Vidoc", "Floreal" e "Voltis" era in uno stato di conservazio-



Figura 10 – Stadio ottimale di germinazione dei vinaccioli.

Tabella 7 – Numero di vinaccioli estratti e germinati per ogni incrocio ottenuto del 2018.

INCROCI 2018	VINACCIOLI OTTENUTI	DATA DI GERMINAZIONE	VINACCIOLI GERMINATI	% GERMINAZIONE
GLERA CC X CAL.BLANC	1501	30/03/19	1185	78%
GLERA 19 X 881	840	30/03/19	658	79%
GLERA 10 X 686	1990	04/04/19	1752	88%
GLERA 14 X 881	593	04/04/19	470	79%
GLERA 10 X CAL.BLANC	1596	10/04/19	1393	87%
GLERA 19 X CAL.BLANC	544	10/04/19	464	79%
GLERA CC X C50	1104	19/04/19	862	78%
C50 X GLERA 10	792	19/04/19	270	35%
GLERA CC X CAB CANTOR	235	19/04/19	152	64%
GLERA 10 X CAB CANTOR	1650	26/04/19	1346	82%
GLERA 19 X CAB CANTOR	798	26/04/19	544	68%
TOTALI	11643		9096	78%

ne non ottimale, ed è quindi probabile che parte del materiale fosse fin dall’inizio di scarsa qualità.

Dagli incroci ottenuti nel 2018, invece, sono stati estratti in totale 11643 vinaccioli. Al fine di evitare una sovrapposizione del carico di lavoro durante il successivo periodo di semina la germinazione è stata programmata settimanalmente (Tab.7).

La percentuale di germinazione dei vinaccioli è stata in media del 78.1% (Fig.10 e 11). “C50 x Glera10”, l’incrocio posto in evidenza, è l’unico che invece ha mostrato una per-



Figura 11 – Crescita dei semenzali in serra a due settimane dalla semina.

centuale di germinazione molto bassa (35%) rispetto agli altri in cui “Glera” stata è usata come porta seme e non come impollinante.

3.2 Estrazione del DNA ed analisi quantitative

L’analisi molecolare è avvenuta per gli 872 individui ottenuti dagli incroci “Glera ISV19 x Soreli”, “Glera ISV10 x Muscaris” e “Glera ISV19 x Muscaris” del 2017. Dovendo processare molti campioni, la liofilizzazione ha permesso di procedere con l’estrazione del DNA in un arco temporale di alcune settimane di lavoro, senza compromettere la qualità del materiale vegetale di partenza.

Di tutti i campioni processati è stato estratto il DNA. Le concentrazioni finali oscillavano da 10 a 60 ng/μl di acido nucleico con una media poco superiore a 20 ng/μl. All’interno di una stessa piastra le concentrazioni rilevate per i diversi campioni sono risultate disomogenee, probabilmente dovuto a una differente età/qualità del tessuto di partenza (foglie meno giovani o in cattivo stato hanno dato risultati quali-quantitativi inferiori) piuttosto che da casualità occorse durante il processo di estrazione.

Anche l’aspetto qualitativo per alcuni campioni si è mostrato critico. La quanti-

ficazione al NanoDrop One ha mostrato i rapporti di assorbanza $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ non ottimali (ad esempio il rapporto $A_{260/A280}$ compreso tra 1,3 e 1,6 e il rapporto $A_{260/A230}$ compreso tra 1 e 2).

Al fine di aumentare la qualità del DNA estratto, ad alcune piastre, è stata aggiunta al buffer di lisi una aliquota di PVP 40 al 2% per eliminare i residui di parete cellulare, zuccheri e polifenoli formati durante la disgregazione del tessuto vegetale. I risultati dell'analisi qualitativa e quantitativa del DNA estratto non hanno però mostrato differenze significative rispetto ai valori misurati nei campioni estratti senza PVP 40 ($A_{260/280}$ tra 1,4 e 1,7 con PVP40 e tra 1,5 e 1,7 senza; $A_{260/230}$ tra 1,7 e 5,5 con PVP e tra 2,4 e 6,9 senza).

3.3 Amplificazione del DNA, separazione elettroforetica, analisi dei dati e selezione

Per ogni individuo ottenuto dagli incroci, la PCR è stata condotta con la Taq Polimerasi KAPA2G Plant PCR Kit, amplificando contemporaneamente gli SSR scelti per seguire l'introggressione dei loci di resistenza. Essa ha dato una percentuale di successo del 97,52%. I campioni che non avevano dato esito positivo sono stati amplificati nuovamente utilizzando la MyTaq Plant kit PCR. In questo modo è stato possibile ottenere dei prodotti di PCR utili alla selezione molecolare di tutti gli 872 genotipi.

L'utilizzo del "bin set" nel software GeneMapper ha consentito una più rapida assegnazione allelica, anche in presenza di taglie leggermente sfalsate (1 bp) o di segnali non completamente chiari. Le assegnazioni automatiche sono state comunque ricontrollate manualmente per correggere eventuali errori. La piastra 1-96 dell'incrocio "Glera ISV10 x Muscaris" è stata inizialmente amplificata per il locus *Ren3/9* con il marcatore CenGen6 che però si è dimostrato poco informativo perché omozigote in "Muscaris" e quindi non utile a discriminare, tra i due alleli, quello di resistenza. Esso è stato perciò sostituito dal marcatore GF15-30. Considerando nel dettaglio i singoli marcatori, è stato osservato che: i marcatori

GF09-46 e GF15-30 sono i più informativi perché mostrano 4 diversi alleli nei due parentali, i marcatori GF09-47 e GF15-28 ne mostrano 3 ma la resistenza ha un allele proprio. Anche i marcatori utilizzati per l'incrocio "Glera ISV19 x Soreli" sono risultati informativi: UDV350 ha 4 forme alleliche mentre i parentali per i marcatori VMC7F2, UDV737 e UDV360 ne hanno 3 perché i due parentali condividono l'allele non associato alla resistenza (Tab.8).

In generale i marcatori SSR, o microsattelliti, sono facilmente ereditabili, rapidi e poco costosi da analizzare nella progenie, in particolare i marcatori del gruppo GF perché sono polimorfici, privi di alleli nulli e in laboratorio hanno una buona resa nella reazione di PCR consentendo di ottenere dei risultati chiari e sicuri.

Dall'analisi dei profili è risultato che 851 piante derivano effettivamente dagli incroci "Glera ISV19 x Soreli", "Glera ISV10 x Muscaris" e "Glera19 x Muscaris", con rispettivamente 227, 394 e 230 individui. Le restanti 8 piante possedevano solo gli alleli del parentale porta-seme "Glera" e perciò derivanti da autoimpollinazione. Non sono emersi alleli inattesi, perciò, si presume che non ci siano state contaminazioni con pollini diversi da quelli di "Soreli" e "Muscaris".

I genotipi analizzati derivanti da "Muscaris" sono stati suddivisi in 4 classi di resistenza: resistenti a peronospora e oidio, resistenti solo a peronospora, resistenti solo a oidio, e infine non resistenti (Tab.9)

Considerando i dati di segregazione per ciascun locus, sono state confrontate le frequenze attese con quelle osservate. Sugli individui degli incroci è stata fatta una selezione fenotipica preliminare in serra per oidio, perciò, non ci si aspetta che questo abbia influenzato le frequenze dei loci *Rpv*. Infatti, sia nell'incrocio "Glera ISV10 x Muscaris" sia in "Glera ISV19 x Muscaris" le differenze fra frequenze osservate e attese per il locus *Rpv10* non erano statisticamente significative (test del Chi-Quadro) con un p-value pari a 0.988 nel primo incrocio e uguale a 0.984 nel secondo. Invece, le differenze tra valori osservati e attesi per il

Tabella 8 – Profili allelici dei parentali degli incroci analizzati. In grassetto e sottolineate sono evidenziate le taglie alleliche dei marcatori associate alla resistenza a peronospora e oidio.

Avversità	Peronospora												Oidio					
	Rpv3				Rpv10				Rpv12				Ren3-9					
Markers	VMC7F2		UDV737		GF09-46		GF09-47		UDV350		UDV360		CenGen6		GF15-28		GF15-30	
Muscaris					388	410	292	297					283	283	342	366	429	445
Soreli	200	211	282	287					302	308	201	208						
Glera ISV10/19	200	204	293	287	417	419	294	294	null	322	201	211	262	274	361	366	413	461

Tabella 9 – Numeri e percentuali di individui in ogni categoria per gli incroci con la varietà “Muscaris”.

Incrocio	Resistenti a peronospora (Rpv10)		Resistenti a oidio (Ren3/9)		Totalmente resistenti		Non resistenti		Totale individui analizzati
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	
Glera ISV10 x Muscaris	80	20,3	125	31,8	120	30,5	68	17,3	393
Glera ISV19 x Muscaris	30	12,9	86	37,06	83	35,7	33	14,2	232

Tabella 10 – Numeri e percentuali di individui in ogni categoria per l'incrocio “Glera ISV19 x Soreli”.

Incrocio	Rpv3-1		Rpv12		Totalmente resistenti		Non resistenti		Totale individui analizzati
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	
Glera ISV19 x Soreli	52	22,6	53	23,04	62	26,9	63	27,3	230

locus *Ren3/9* si sono dimostrate statisticamente significative in entrambe le popolazioni ($p < 0.05$). Tale risultato è dovuto alla selezione fenotipica precoce che ha permesso di eliminare il 24% degli individui dell'incrocio “Glera ISV10 x Muscaris” e il 27% per l'incrocio “Glera ISV19 x Muscaris”, ottenendo così un numero di genotipi senza *Ren3/9* inferiore rispetto a quello atteso.

La stessa analisi è stata fatta sulla popolazione di incrocio “Glera ISV19 x Soreli”. In questo caso, le quattro classi in cui le piante sono state suddivise, sono: resistenti a peronospora, genotipi con solo *Rpv3*, genotipi con solo *Rpv12* e suscettibili (Tab. 10).

Anche su questa popolazione è stata fatta la pre-selezione fenotipica per oidio che però non ha influenzato significativamente

le frequenze degli *Rpv*. Il test del Chi-Quadro è stato applicato sia per *Rpv3* sia per *Rpv12* mostrando corrispondenza tra le frequenze osservate da quelle attese ($p = 0.999$ e $p = 1$ rispettivamente). La popolazione del “Soreli” è stata seguita solo per la resistenza a peronospora e non per oidio perché questa varietà è tollerante a *E. necator* ma non porta alcun allele di resistenza noto.

Gli individui resistenti sono stati poi piantati in vigneto insieme a 4 testimoni per ogni incrocio, 2 suscettibili, 2 parzialmente resistenti e i genotipi risultati ricombinanti (Fig. 12 e 13). Per l'incrocio “Glera ISV19 x Soreli” sono state poste in campo 65 piante, di cui 3 ricombinanti per *Rpv12*. Per l'incrocio “Glera ISV10 x Muscaris” 125 piante sono state messe in vigneto di cui 1 è ricombinante per *Rpv10* e 4 per *Ren3/9*, mentre il numero dell'incrocio “Glera ISV19 x



Figura 12 – Filari del vigneto sperimentale in cui sono stati piantati i genotipi selezionati.



Figura 13 – Piante disposte a 50 cm l'una dall'altra.

Muscaris” è di 83, comprese 1 ricombinante per *Rpv10* e 4 per *Ren3/9*. In appendice sono riportati gli elettroferogrammi delle corse elettroforetiche di ogni categoria per tutte le popolazioni di incrocio e i profili genetici dei parentali “Glera”, “Soreli” e “Muscaris” (appendice numeri da 1 a 12).

4. Conclusioni

Il numero di piante ottenute dagli incroci del 2018 conferma gli ottimi risultati riscontrati nel processo di fecondazione e germinazione dei vinaccioli. Ciò è dipeso dall'affinità che le varietà impollinanti hanno con “Glera” e soprattutto il ruolo di quest'ultima come genitore porta seme.

La selezione assistita da marcatori molecolari dei genotipi del 2017, resistenti a peronospora e oidio, ha consentito la raccolta di 6976 taglie alleliche su 872 piante, l'identificazione di 408 individui portatori di almeno una delle due resistenze e di 266 che invece hanno ereditato entrambi i loci prescelti. Di questi ultimi, 203 sono resistenti a entrambe le ampelopatie e 63 solo a peronospora per i loci *Rpv3* ed *Rpv10*. Dalle viti piantate (maggio 2019) nel campo sperimentale del Centro (Susegana) ci si aspetta caratteri legati alla fenologia, alla struttura del grappolo e alle proprietà dell'uva molto diverse. La cosa certa è

che la totalità degli individui sarà a bacca bianca, e potranno essere conservate sia le piante più simili a “Glera” sia le piante diverse dalla varietà autoctona, ma portatrici di caratteri interessanti dal punto di vista agronomico ed enologico. Le nuove varietà non sostituiranno quelle tradizionali già affermate, ma piuttosto contribuiranno a rendere la viticoltura più sostenibile, soprattutto laddove la difesa della vite comporta pesanti costi di produzione e rischi per le persone e l'ambiente.

Il passo successivo sarà quello di verificare la corrispondenza tra il dato molecolare e fenotipico, cioè l'effettiva resistenza a peronospora e oidio dei genotipi conservati. La fenotipizzazione sarà fatta prevalentemente in campo e solo nel caso di resistenze da accertare o ancora poco note si procederà anche alla valutazione tramite saggio di infezione su dischetto fogliare in cui sarà possibile osservare le risposte difensive che si attivano in presenza del patogeno. Inoltre, le piante saranno valutate anche per altri caratteri agro-enologici d'interesse. Si ritiene, infatti, che il gruppo d'individui selezionati abbia dimensioni adeguate per esprimere l'elevata variabilità della popolazione originale. Infine, saranno eseguite delle nano e microvinificazioni allo scopo di approfondirne il potenziale enologico dei nuovi genotipi resistenti.

BIBLIOGRAFIA

CAPRARO F., SPARACIO A., BORGO M., (2008). *Epidemie di peronospora della vite in vigneti del nord e sud Italia*. M. C.R.A.-Centro di Ricerca per la Viticoltura (Conegliano), Istituto Regionale della Vite e del Vino (Palermo).

ARMIO, G., SCHLECHTER, R., AGURTO, M., MUÑOZ, D., NUÑEZ, C., & ARCE-JOHNSON, P. (2016). *Grapevine pathogenic microorganisms: understanding infection strategies and host response scenarios*. 7 (March), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00382>

AVENOT, H. F., & MICHAÏLIDES, T. J. (2010). *Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi*. *Crop Protection*, 29(7), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.02.019>

BRILLI, M., ASQUINI, E., MOSER, M., BIANCHEDI, P. L., PERAZZOLLI, M., & SI-AMMOUR, A. (2018). *A multi-omics study of the grapevine-downy mildew (Plasmopara viticola) pathosystem unveils a complex protein coding- and noncoding-based arms race during infection*. *Scientific Reports*, (December 2017), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19158-8>

COLLARD, B. C.Y., JAHUFER, M. Z. Z., BROUWER, J. B., & PANG, E. C. K. (2005). *An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts*. *Euphytica*, 142(1–2), 169–196. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>

COLLARD, BERTRAND C.Y., & MACKILL, D. J. (2008). *Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1491), 557–572. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>

DANGL, J. L., & JONES, J. D. G. (2001). *Plant pathogens and integrated defence responses to infection* 411826a0. 411(June). <https://doi.org/10.1038/35081161>

ENCIN, F. EL, ALBERCA, L., MAGARACH, W., KEREM, E., & BIOTECHNOLOGIE, D. (2007). *Multiple origins of cultivated grapevine (Vitis vinifera L. ssp. sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms*. (2006), 3707–3714. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03049.x>

GADOURY, D. M., CADLE-DAVIDSON, L., WILCOX, W. F., DRY, I. B., SEEM, R. C., & MILGROOM, M. G. (2012). *Grapevine powdery mildew (Erysiphe necator): A fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph*. *Molecular Plant Pathology*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00728.x>

JAILLON, O., AURY, J. M., NOEL, B., POLICRITI, A., CLEPET, C., CASAGRANDE, A., ... WINCKER, P. (2007). *The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla*. *Nature*, 449(7161), 463–467. <https://doi.org/10.1038/nature06148>

JOHNSON, R. (1984). *A Critical Analysis of Durable Resistance*. *Annual Review of Phytopathology*, 22(1), 309–330. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.22.090184.001521>

PERESSOTTI, E., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S., DELMOTTE, F., BELLIN, D., DI GASPERO, G., TESTOLIN, R.,

... MESTRE, P. (2010). *Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety*. *BMC Plant Biology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-147>

QIU, W., FEECHAN, A., & DRY, I. (2015). *Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (Erysiphe necator), the causal agent of powdery mildew disease*. (March), 1–9. <https://doi.org/10.1038/hortres.2015.20>

SCHOUTEN, H. J., KRENS, F. A., & JACOBSEN, E. (2006). *Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: International regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis*. *EMBO Reports*, 7(8), 750–753. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400769>

VELASCO, R., ZHARKIKH, A., TROGGIO, M., CARTWRIGHT, D. A., CESTARO, A., PRUSS, D., ... VIOLA, R. (2007). *A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety*. *PLoS ONE*, 2(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001326>

ZYPRIAN, E., OCHSSNER, I., SCHWANDER, F., ŠIMON, S., HAUSMANN, L., BONOW-REX, M., ... TÖPFER, R. (2016). *Quantitative trait loci affecting pathogen resistance and ripening of grapevines*. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(4), 1573–1594. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1200-5>

Riccardo Velasco Daniele Migliaro

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura
e l'Analisi dell'Economia Agraria,
sezione Viticoltura ed Enologia
CREA-VE, Conegliano (TV)

Giuseppe Forlani Martina Pasetti

Università degli studi di Ferrara,
Dipartimento Scienze della Vita e Biotecnologie

Tyrone Possamai

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura
e l'Analisi dell'Economia Agraria,
sezione Viticoltura ed Enologia
CREA-VE, Conegliano (TV)

Università degli Studi di Udine,
Dipartimento di Scienze Agroalimentari,
Ambientali e Animali

Loredana Moffa

Università degli Studi di Udine,
Dipartimento di Scienze Agroalimentari,
Ambientali e Animali

Parole chiave: viticoltura, economia, miglioramento genetico, Prosecco

RIASSUNTO

Il comparto del vino rappresenta una componente di primo piano per il settore agro-alimentare in particolare per la regione Veneto, la quale è famosa in tutto il mondo per la produzione di vini certificati DOC e DOCG. Grazie alle previsioni vendemmiali completate da Assoenologi, Ismea e Unione Italiana Vini è stato possibile quantificare le perdite relative alla produzione nazionale degli ultimi anni. Nel 2019 si è registrata una riduzione del 16% rispetto al 2018 e nel 2020 il valore è sceso ancora del 4%. I cambiamenti climatici, però, influenzano l'andamento di molte fitopatologie della vite, tra cui Peronospora e Oidio, rendendo così indispensabile l'uso degli agrofarmaci, i quali possono risultare tossici se usati in eccesso, sia per l'ambiente sia per l'uomo.

Una strategia di lotta nettamente più ecologica è quella che prevede l'uso di varietà resistenti a queste malattie, per questo il Centro di Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA-VE) di Conegliano (TV) ha intrapreso un progetto di incroci convenzionali tra varietà resistenti a Peronospora e Oidio e la cultivar "Glera", il vitigno usato come da disciplinare per la produzione del Prosecco D.O.C e D.O.C.G.

Lo scopo del progetto è selezionare genotipi resistenti alle due fitopatologie avvalendosi di tecniche di biologia molecolare che permettono di discriminare geneticamente centinaia di individui in poco tempo. Di 872 individui esaminati solo 203 sono risultati essere resistenti ad entrambe le malattie, dai quali ci si aspetta caratteri legati alla fenologia, alla struttura del grappolo e alle proprietà degli acini molto diverse. Le nuove varietà non sostituiranno quelle tradizionali già affermate, come "Glera", ma piuttosto contribuiranno a rendere la viticoltura più sostenibile, soprattutto laddove la difesa della vite comporta pesanti costi di produzione e rischi per le persone e l'ambiente.

Key words: viticulture, breeding, Prosecco-wine, market-analysis

ABSTRACT

The wine sector represents a major component of the agri-food industry, especially for the Veneto region, which is famous worldwide to produce DOC and DOCG certified wines. Thanks to the harvest forecasts completed by Assoenologi, Ismea and Unione Italiana Vini, it was possible to quantify the losses related to national production in recent years. In 2019 there was a 16% reduction compared to 2018 and in 2020 the value fell by 4% again. Climate change, however, influences the trend of many vine phytopathologies, including Downy mildew and Powdery mildew, thus making it essential to use agrochemicals, which can be toxic if used in excess, both for the environment and for humans.

A much more ecological control strategy is the use of varieties resistant to these diseases. For this reason, the Centre for Research in Agriculture and Analysis of Agricultural Economics (CREA-VE) in Conegliano (TV) has undertaken a project of conventional crosses between varieties resistant to Downy and Powdery mildew and the "Glera" cultivar, which is used to produce Prosecco D.O.C and D.O.C.G.

The aim of the project is to select genotypes resistant to the two phytopathologies using molecular biology techniques that allow to genetically discriminate hundreds of individuals in a short time. Of 872 individuals tested, only 203 were found to be resistant to both diseases, from which we expect very different characters related to phenology, bunch structure and berry properties. The new varieties will not replace the traditional ones already established such as "Glera", but rather contribute to make viticulture more sustainable, especially where wine protection involves heavy production costs and risks for people and the environment.

Appendice

Elettroferogrammi dei profili molecolari dei genotipi appartenenti alle differenti classi di resistenza individuate e dei parentali “Glera”, “Soreli” e “Muscaris”. Le taglie alleliche portatrici della resistenza sono evidenziate in grassetto mentre in rosso si trovano quelle condivise da entrambi i parentali.

Per l'incrocio “Glera ISV10 x Soreli”:

1. Resistente a peronospora per entrambi i loci Rpv3-1 e Rpv12;
2. Non resistente;

Per gli incroci con la varietà “muscaris”:

3. Resistente a peronospora e oidio amplificato con il marcatore CenGen6 (solo “Glera ISV10 x Muscaris”);
4. Resistente a peronospora e oidio amplificato con il marcatore GF15-30;
5. Non resistente

In ultimo si trovano i parentali:

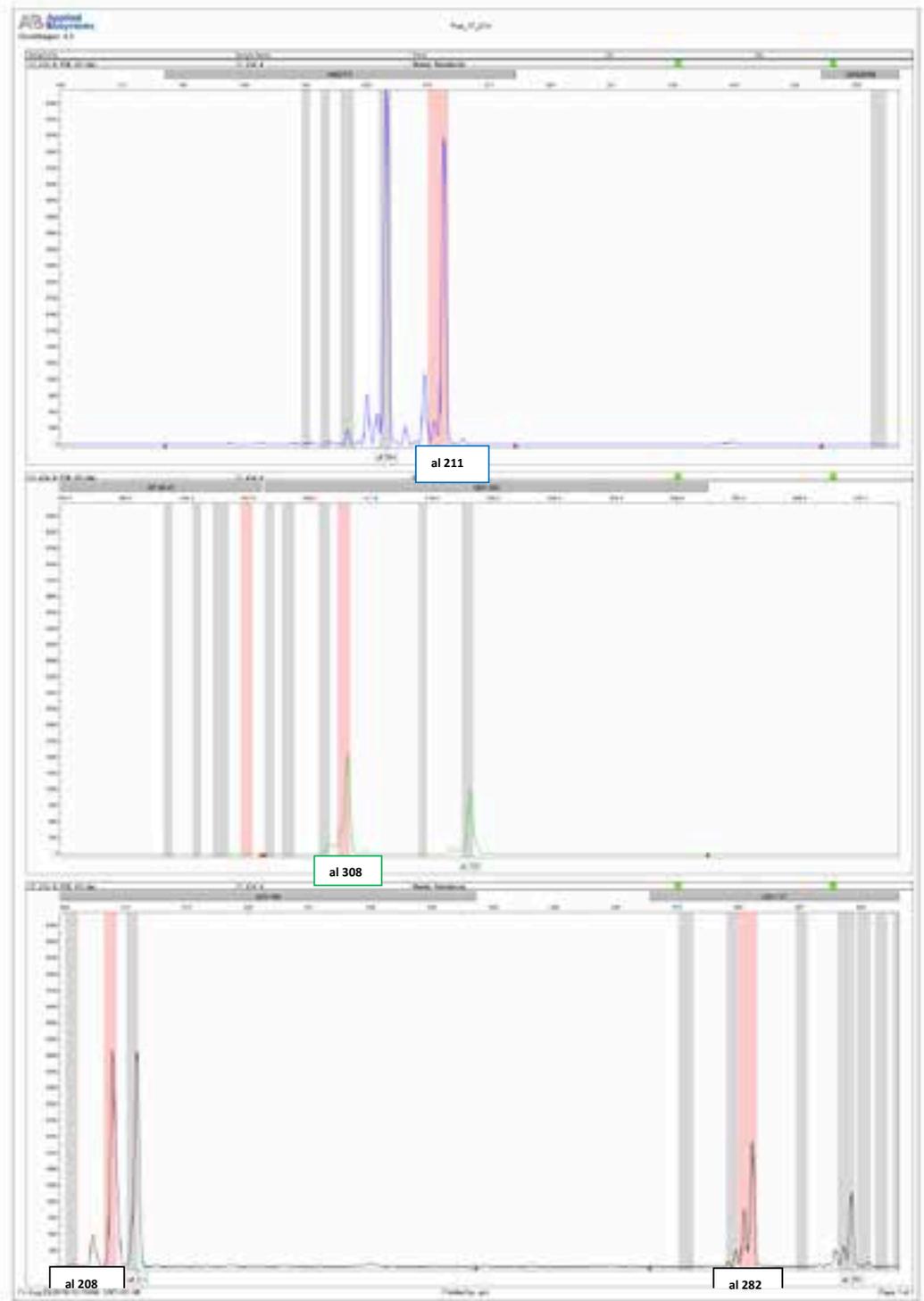
6. “Glera” amplificata con tutti i marcatori (6a, 6b, 6c);

7. “Soreli” per i marcatori VMC7F2, UDV737, UDV350 e UDV360;
8. “Muscaris” amplificato con i marcatori GF09-46, GF09-47, GF15-28 e GF15-30.

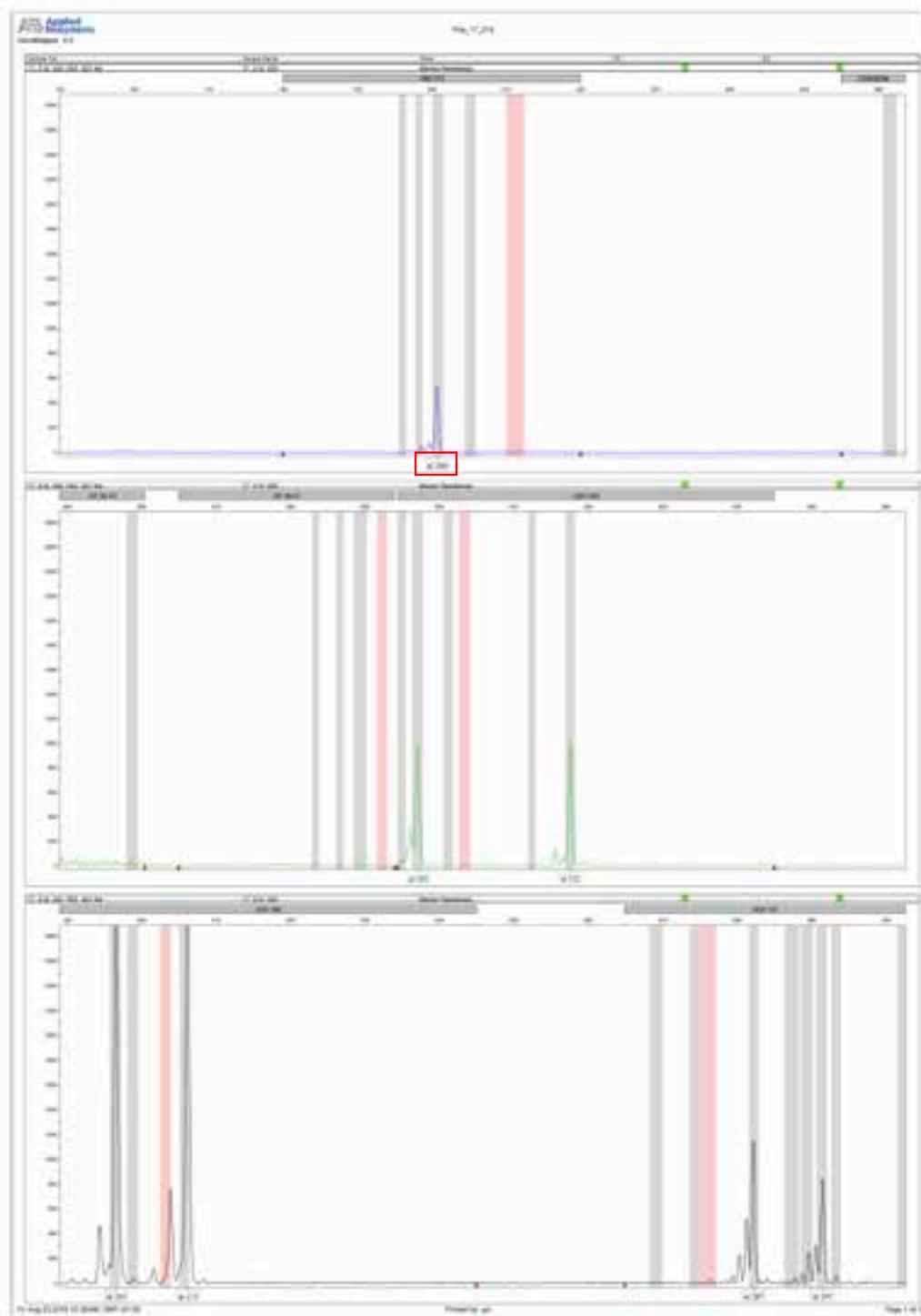
Dagli elettroferogrammi si possono notare:

- I range di lunghezza dei marcatori (in pb) che sono delimitati dai triangoli rossi sulla parte bassa dell'elettroferogramma;
- I “bin-set” disegnati e corrispondenti ai possibili alleli assumibili dai marcatori che sono indicati dalle colonne colorate sullo sfondo, rosa per gli alleli associati alla resistenza e grigie per gli altri;
- Il colore della fluorescenza del fluorocromo associato al primers forward di ciascun marcatore (il colore nero corrisponde alla fluorescenza gialla);
- La forma specifica dei picchi dei diversi marcatori.

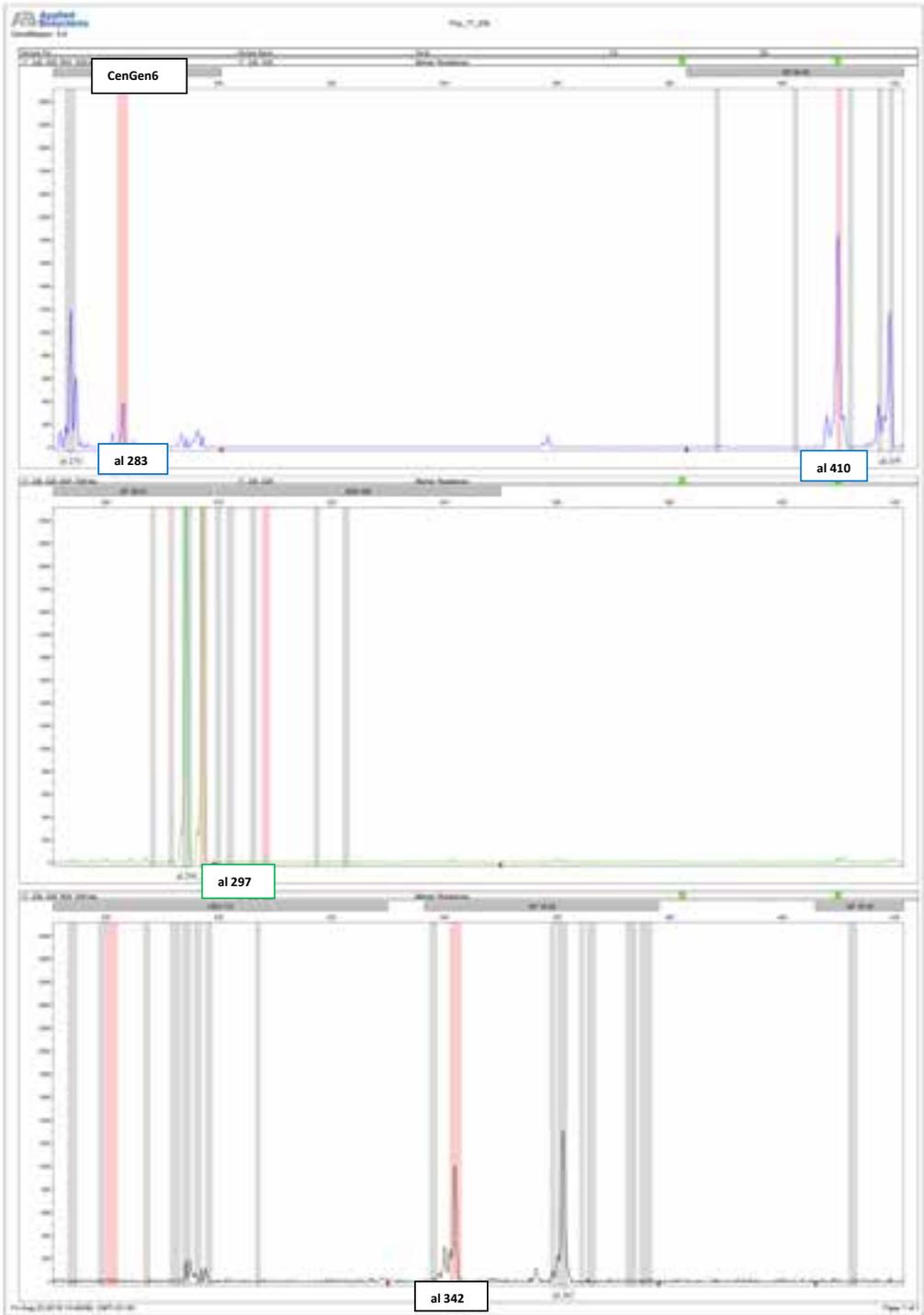
1)



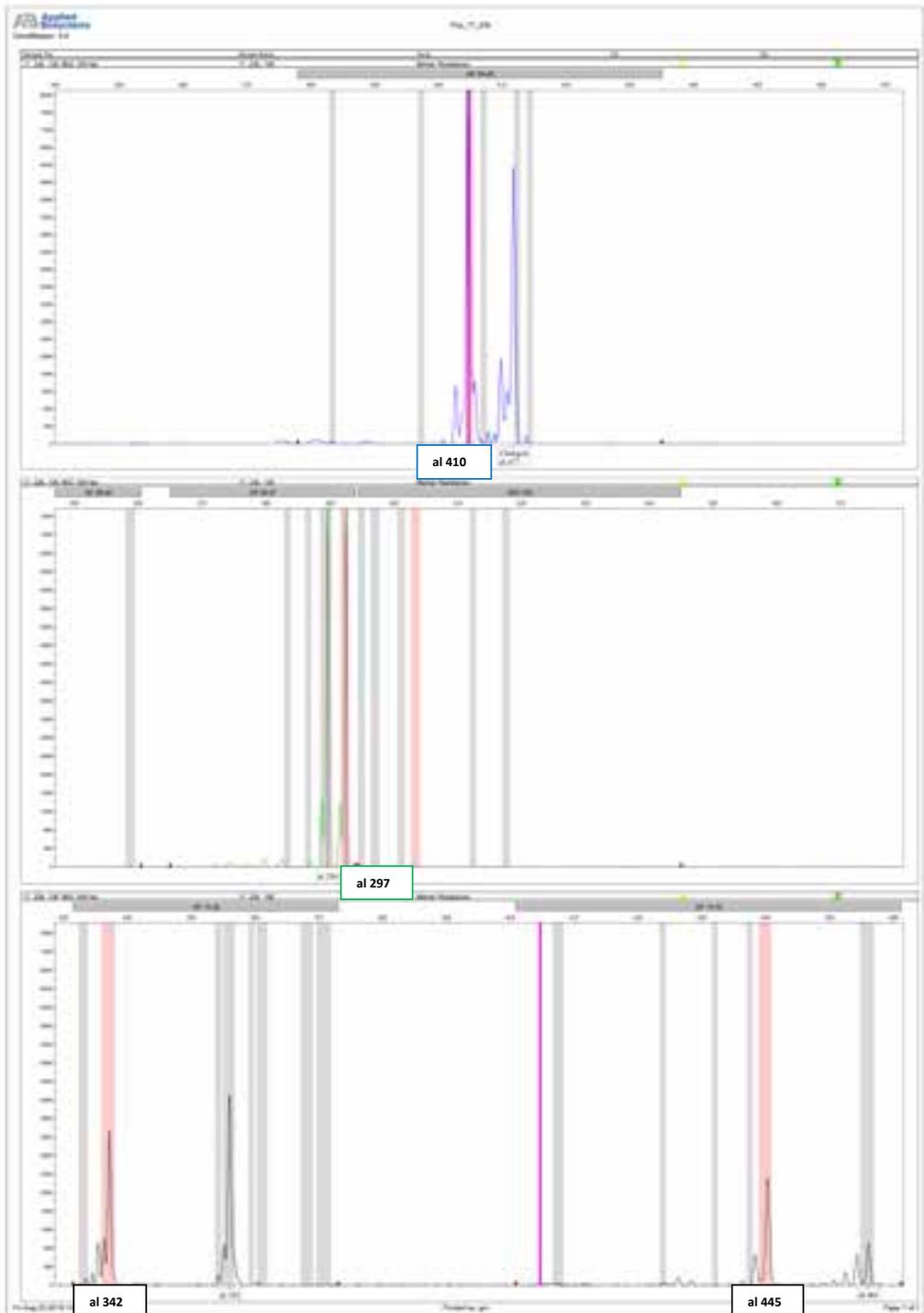
2)



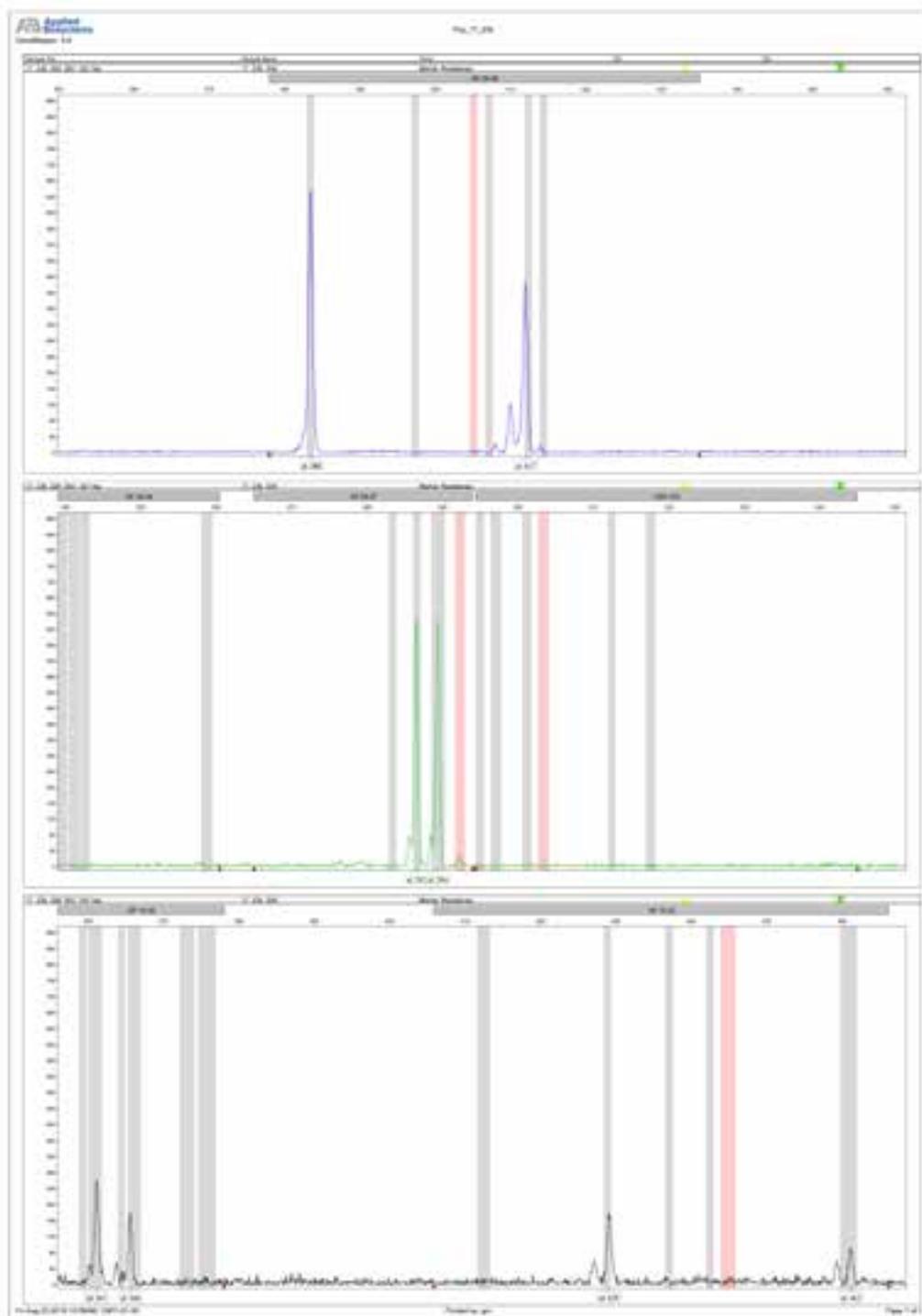
3)



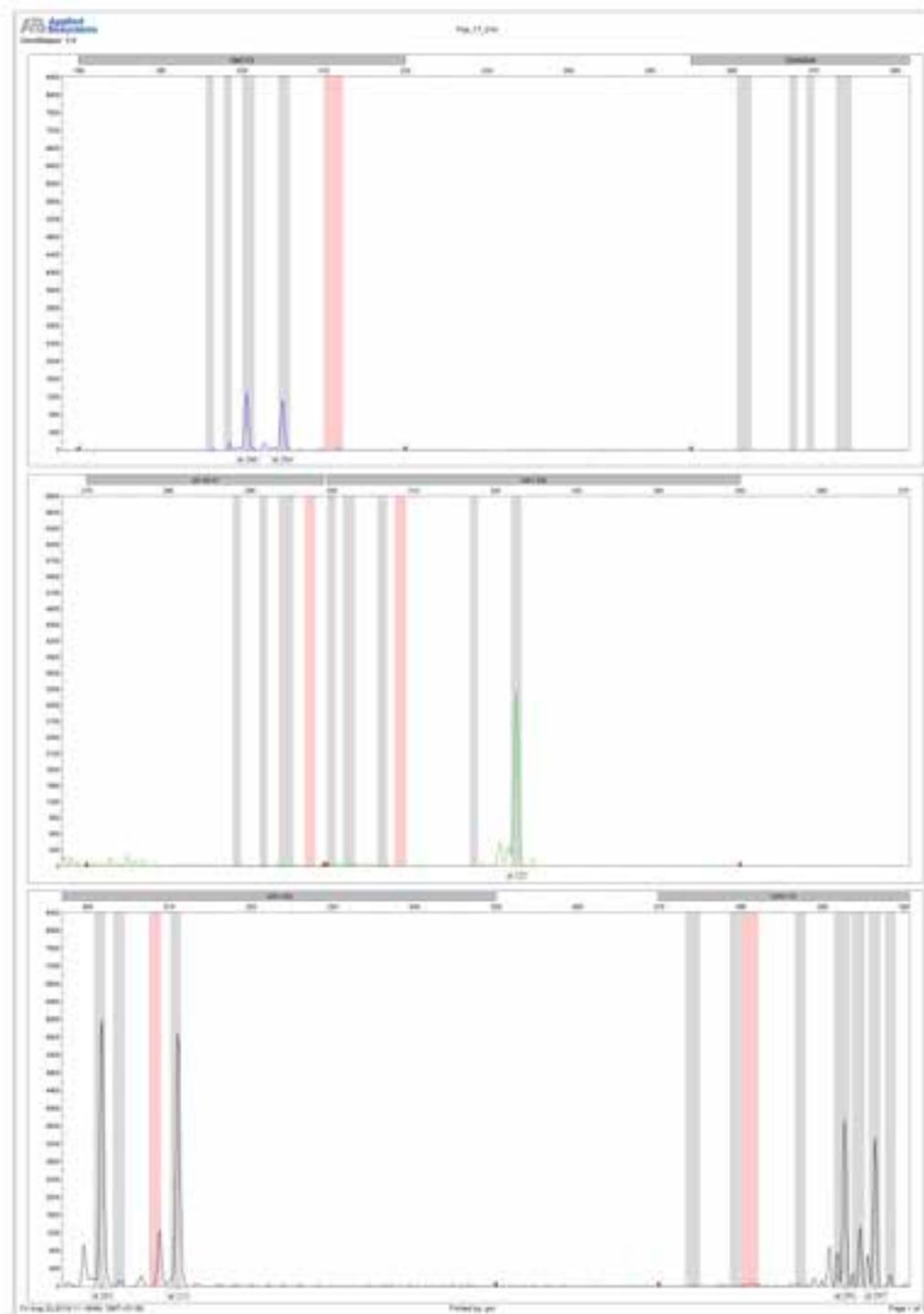
4)



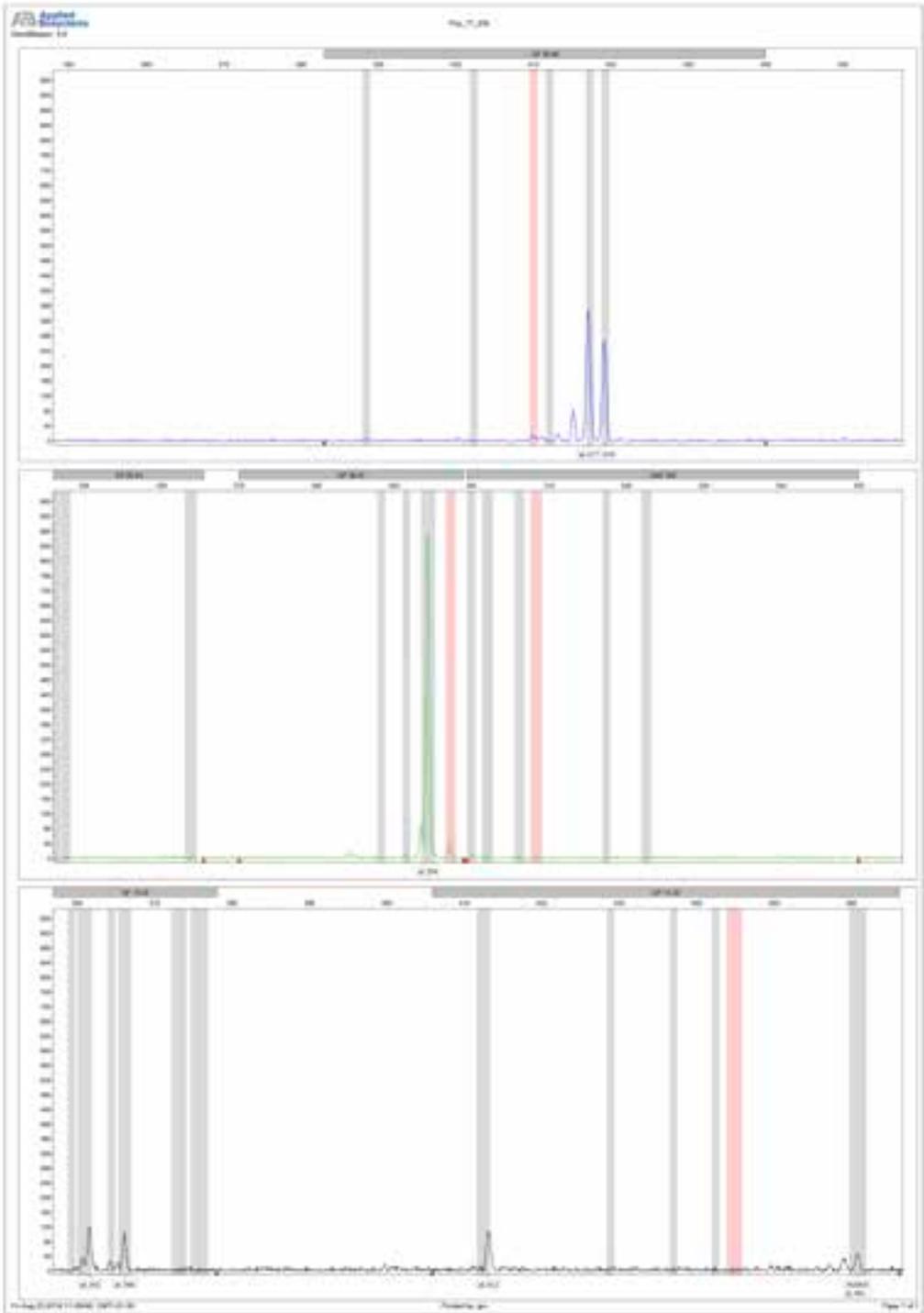
5)



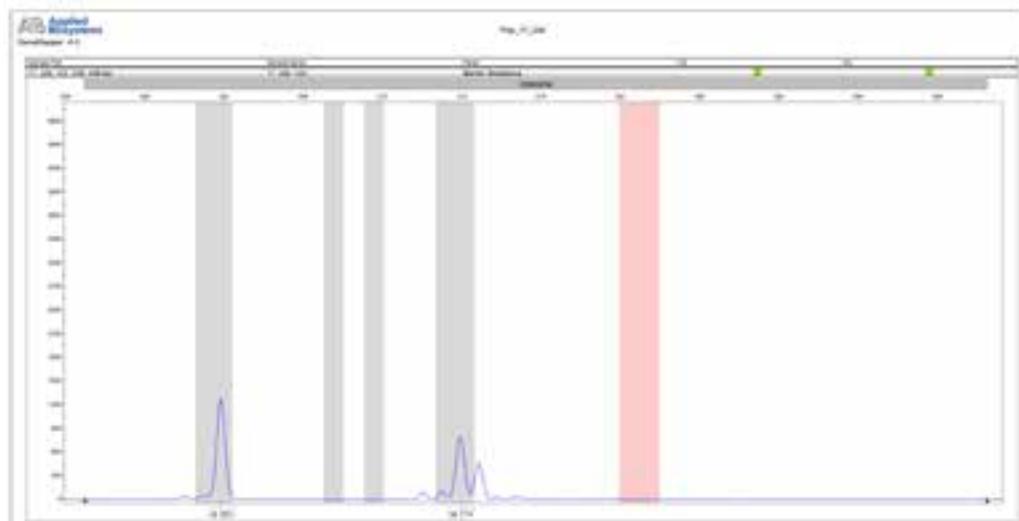
6a)



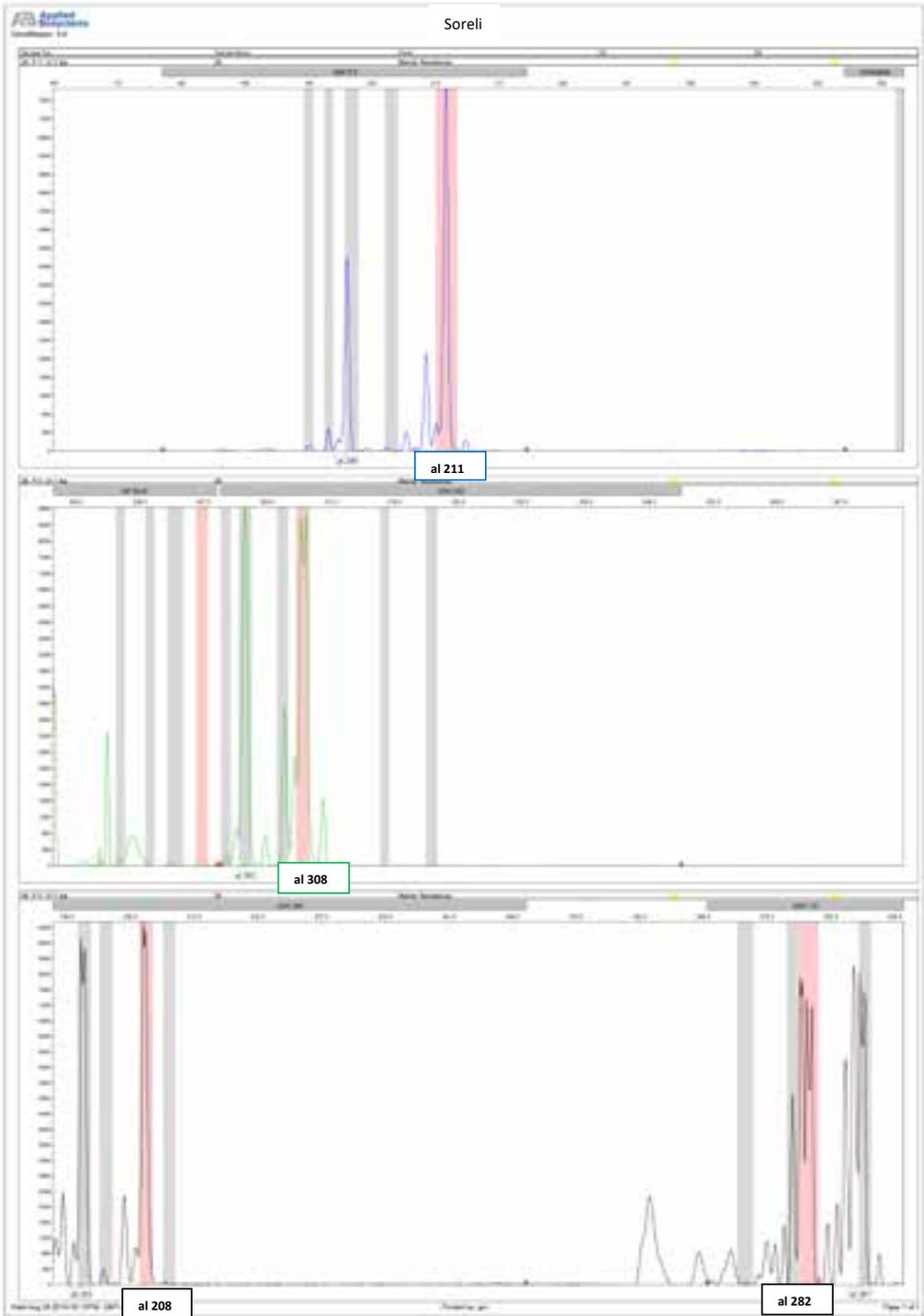
6b)



6c)



7)



8)

