

IPGRI FELLOWSHIP ON *VITIS* AT THE UNIVERSITY OF MILAN

D. Maghradze

*Georgian Research Institute of Horticulture, Viticulture and Winemaking
Department of Grapevine and Fruit Crop Research, Genetics and Breeding
6 Marshal Gelovani Ave. 0159. Tbilisi. Georgia*

I, David Maghradze from the Georgian Research Institute of Horticulture, Viticulture and Oenology took part on ten month (1 September 2003 – 1 July 2004) IPGRI funded fellowship within the framework of the international research project, “**Conservation and sustainable use of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic resources in the Caucasus and the Northern Black Sea regions**” at the University of Milan, Italy. The fellowship was being organized by Regional Office for Europe of IPGRI (Director J. Turok) and being supervised by Prof. A. Scienza and Dr. O. Failla in the Dipartimento di Produzione Vegetale.

According to the Scientific Collaboration Program of the University of Milan, the general aim of the fellowship was to transfer basic knowledge to increase *Vitis* research capacity in Georgia.

The goal of the Fellowship was to research biodiversity of Georgian autochthonous varieties by using modern techniques of ampelography and molecular genetics.

The research and education program on Georgian *Vitis* varieties included:

- Modern ampelographic techniques for characterization of varieties based on descriptors defended by O.I.V., IPGRI and UPOV and completion of ampelographic cards;
- Chemical analyses of grape samples. Chemo–taxonomical analyses of berry skins and defining the anthocyanin profile of varieties on the basis of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the phylogenetic mission;
- DNA molecular techniques to detect genetic variation in these genetic resources, specifically Amplified Fragments Length Polymorphism (AFLP) and Simple Sequence Repeats (Microsatellite) (SSR) markers.

The data from these investigations will be used for ampelographic characterization and fingerprinting of the Georgian varieties.

The program of fellowship also included visits to the viticultural regions, research organizations and nurseries in Italy for training throughout the period of study.

In the research was involved plant materials as follow: 150 accessions (147 varieties) of Georgian autochthonous varieties, existing in a collection of Italy; 10 wild forms of grapevine from Georgia and 12 European cultivars, recommended by GENRES 081 project, as standard cultivars for investigation of microsatellite markers; In addition - 22 Georgian local varieties without names for identification existing in Italy and 3 European cultivars for verification.

Ampelographic research

Working Photos for ampelography and ampelometry mission have been taken:

- 694 slides of bunch, berries and leaves in a laboratory, plant with matured grape in the vineyard. These photos by a scanner have been brought in a computer;
- 2826 digital photos of shoot tip and mature leaf in a laboratory and in the field.

These photos have been used to measure and to describe organs of grapevine by the special software for ampelometric study “SuperAmpelo” and by the software “SigmaScan Pro” for making measurements.

Data of phenological observation, type of flower, weight of clusters, berries and seeds were collected in the field and in the laboratory.

On the base of these ampelographic and ampelometric data have been completed descriptors for grapevine and for each variety have been done an ampelographic card, which has been used to characterize grapevine varieties.

Molecular genetics investigation

Genomic characterization of Georgian grapevine germplasm is extremely interesting as for the richness of variability as for the poor knowledge about them.

DNA has been extracted from woody shoots and young leaves. For DNA extraction was used the protocol of Lodhi, M.A. et al. (1994) modified by M. Rossoni at the University of Milan.

DNA was extracted from 198 accessions.

SSR markers have been used to: research better relationship among varieties and define, where possible, parents or relatives; make more exact accurate classification of Georgian local varieties; investigate wild grapevine from Caucasus.

DNA was analysed at the following six microsatellite *loci*: VVMD 5, VVMD 7, VVMD 27, VVS 2, ZAG 62 and ZAG 79.

PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification was performed with a programmable thermal controller (PTC 100, MJ Research Inc., USA). PCR-amplified mixture were analysed by electrophoresis on a sequencing polyacrylamide gel. The gel was finally developed with the silver staining approach.

10 wild forms from Georgia together with Georgian autochthonous varieties were also included in the investigation of molecular markers to compare wild grapevine genotypes and cultivated varieties and to evaluate the degree of genetic distance between these two subspecies of *Vitis* – *V. vinifera* ssp. *sativa* D.C. and *V. vinifera* ssp. *silvestris* Beck.

Chemical and Chemo-taxonomic analyzes

Sugar content, total acid content and pH of must have been determined in the laboratory of ERSA – Gorizia during ripening period of grape and comparatively descriptors have been completed.

Chemo-taxonomic analyses on berry skin with HPLC technique was performed as suggested by Mattivi et al. (1990). 97 varieties with coloured grains have been involved in the research of anthocyanin analyze made by M. Rossoni. Anthocyanin profile was determined at 520 nm using a Shimadzu HPLC LC-10 AD (Shimadzu Co., Tokyo, Japan) connected to a Shimadzu UV-VIS detector SPD-10 A.

Statistical data processing

Data were analyzed by O. Failla using the software SPSS v.11.5 for statistical calculation.

Each microsatellite allele was scored as a binary character for its absence (0) or presence (1). Similarity-dissimilarity matrices were computed with the Jaccard's coefficient. The polymorphic level was estimated through Gene Diversity calculation. The final products of data processing were dendrograms constructed by cluster.

As result of investigation Georgian grapevine biodiversity geographical, phenotypic and genetic grouping of germplasm have been made.

Training

Method of grapevine's seed measurement and description was learned under guidance of Prof. L. Costantini at the Laboratory of Archaibotanic (Rome) during the training in 26-30 April.

Participation in conferences and in expedition

- Scientific conferences in molecular genetics of grapevine at the Institute of Agronomy in S. Michele all'Adige (06.05.04) and about autochthonous grapevine cultivar 'Teroldego' in Mezzolombardo (Trento) (07.05.04) was attendance;
- The seminar for presentation a new laboratory in Arcagna was participated (10.02.04);
- In expeditions for investigation ancient autochthonous varieties of Italy were took part in provinces of Como and Pavia.

Visits

During the Fellowship were visited different viticultural regions, scientific organizations and nurseries in Italy as follows:

- Viticultural regions of Como, Oltrepo Pavese, Val d'Aosta and Lake Garda;

- Collections of germplasm: grapevine in Gorizia (ERSA) and Riccaggioia (ERSAF), autochthonous varieties of apple in Cadriano (Bologna);
- Nurseries: Vivai Cooperativi Rauscedo and Pantianico (ERSAGRICOLA);
- Research Institute of Fruit Growing and its germplasm collections in Rome, Regional Institute of Agriculture in Val d'Aosta and the Institute of Agronomy in S. Michele All'Adige.

Other Activities

In the framework of IPGRI's project together with colleagues from Milan and Gorizia was participated in re-introduction of 44 local Georgian varieties from Italy to Georgia. These varieties were absent in our new Vashlidjvari collection.

In English have been translated: the summary of book written by R. Ramishvili – 'Wildly growing vine of the South Caucasus'; the summary of book of Ianushevich Z.V., Peliakh M.A. – 'Wildly growing vine of Moldavia'; fragments about archaiobotanic remains from R. Ramishvili's book – 'History of Georgian grapevine and wine'.

References

1. Lodhi, M.A., Guang-Ning Y., Norman F. W., Bruce I. R. 1994 - A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis* // Plant Molecular Biology Reporter 12(1): 6-13.
2. Mattivi F., Scienza A., Failla O., Villa P., Anzani R., Tedesco G., Gianazza E., Righetti P. 1990 - *Vitis vinifera* - a chemotaxonomic approach: anthocyanins in the skin. // *Vitis*, Special Issue: 119-33.

СТАЖИРОВКА IPGRI ПО VITIS В МИЛАНСКОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

Д. Маградзе

*Грузинский НИИ садоводства, виноградарства и виноделия
Отдел изучения генофонда, генетики и селекции винограда и плодовых культур
Пр-т Маршала Геловани б. 0159. Тбилиси. Грузия*

Я, Давид Маградзе из грузинского НИИ садоводства, виноградарства и виноделия, проходил свою 10 месячную (1 сентября, 2003 - 1 июля, 2004) стажировку в Миланском университете, Италия, организованную Международным Институтом генетических ресурсов растений (IPGRI) в рамках своего международного проекта "Консервация и устойчивое развитие генетических ресурсов винограда на Кавказе и в северных регионах Черного моря". Стажировка была организована Региональным Отделением для Европы (директор И. Турок), а научное руководство осуществляли проф. А. Шенца и докт. О.Фаилла из Dipartimento di Produzione Vegetale.

Согласно программы Миланского университета, целью стажировки была передать основное знание для повышения научного уровня по *Vitis* в Грузии.

Задачей стажировки была изучение биоразнообразия грузинских аборигенных сортов винограда применением современной техники по ампелографии и молекулярной генетике.

Научная и образовательная программа по грузинским сортам винограда содержала:

- Современную ампелографическую технику для характеристики сортов, основанных на т.н. "Дескрипторы" для винограда, разработанной международными организациями O.I.V., IPGRI, и UPOV и составление ампелографических карт.
- Химический анализ образцов винограда. Хемо-таксономический анализ кожицы ягод винограда и определение антоциановых профилей сортов с применением высоко-разрешающей жидкостной хроматографии (HPLC) для филогенетических целей.

- Применение ДНК молекулярной техники изучения этих генетических ресурсов для определения генетической вариабельности на основе AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) и SSR (Simple Sequence Repeats) (микросателиты) маркеров.

Результаты этих исследований будут использованы для ампелографической и генетической характеристики грузинских сортов винограда.

Программа стажировки дополнительно содержала посещение виноградческих районов, научных организаций и питомников по Италии с целью тренировки.

В опыте было включено 147 сортов (150 образцов) грузинских автоктонных сортов винограда из итальянской коллекции, 10 образцов дикого винограда из Грузии и 12 Европейских сортов, рекомендуемых проектом GENRES 081 как стандартных. Дополнительно в опыте было включено 22 безименных грузинских сортов винограда для идентификации, существующих в Италии и 3 европейских сорта для сравнения.

Ампелографическое изучение

Были сделаны рабочие фотографии для ампелографии и ампелометрии:

- 694 слайдов гроздей и листьев в лаборатории и растений во время созревания гроздей в винограднике. Фотографии с применением сканера были транспортированы в компьютер.

- 2826 цифровых фотографий молодого побега, молодых и зрелых листьев в лаборатории и в поле.

Эти рабочие фотографии были применены для измерения параметров орган виноградной лозы с применением специальной компьютерной программы “SuperAmpelo” для ампелометрических изучений и другой программы “SigmaScan Pro” для измерений.

Данные фенологических наблюдений, типа цветков, массы гроздей, ягод и семян были собраны в поле и в лаборатории.

На базу собранных ампелографических и ампелометрических данных были заполнены “дескрипторы” для частей виноградной лозы, на основе которых для каждого сорта были составлены ампелографические карточки, использованные для характеристики сортов.

Молекулярная генетика

Геномная характеристика грузинской геноплазмы винограда очень интересна как из-за высокой вариабельности, так и из-за низкого знания о них.

ДНК была экстрагирована из одревесных черенков и молодых листьев. Для экстракции ДНК был применен протокол Lodhy et al. (1994), модифицированной М. Россони из Миланского университета.

ДНК была экстрагирована из 198 образцов.

SSR маркеры были применены, чтобы: лучше изучить взаимосвязь среди сортов и определить, где это возможно, родителей и родственников; сделать более точную классификацию грузинских аборигенных сортов винограда; исследовать дикий виноград из Кавказа.

Было изучено 6 микросателитных локусов ДНК: VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, ZAG 62 и ZAG 79.

PCR - амплификация была проведена на программируемой терминал-контролере (PIC 100, MI Research Inc. USA).

Раствор после PCR-амплификации было анализировано путем электрофореза на полиакриламидном геле с последующим применением серебряной окраски (Silver Staining).

10 диких форм из Грузии было также включено в изучение молекулярных маркеров вместе с грузинскими аборигенными сортами с целью сравнения генотипов дикого и культурного винограда и определения генетической дистанции между этих двух подвидов *Vitis - V. vinifera ssp. sativa* D.C. и *V. vinifera ssp. silvestris* Beck.

Химические и хемо-таксономические анализы

Сахаристость, общая кислотность и рН сока была определена в лаборатории ERSA-Горица в динамике созревания винограда. Были заполнены соответствующие дескрипторы.

Хемо-таксономический анализ гроздей на базе HPLC техники был проведен согласно Mattivi et al (1990). 97 сортов окрашенными гроздьями были включены в опыте для антоцианного анализа, сделанной М. Россони. Антоцианные профили были определены на 520нм с применением Shimadru HPLC LC-10 (Shimadru Co, Tokyo, Japan), соединенный с Shimadru UV-VIS детектор SPD-10A.

Обработка статистических данных

Данные были проанализованы О. Фаилла с применением компьютерной программы SPSS v. 11.5 для статистических калькуляций.

Каждый микросателитный аллель был отмечен, как двойной показатель отсутствия (0) или присутствия (1). Матрица подобия-неподобия было просчитано применением коэффициента Jaccard. Финальным продуктом статистической обработки были дендрограммы кластерного анализа.

Как результатом многопланного изучения биоразнообразия грузинских сортов винограда была сделана географическая, фенотипическая и генетическая группировка этого генофонда.

Трейнинг

Методика измерения и описания семян винограда было изучено под руководством проф. Л. Константини в лаборатории археоботаники в Риме во время тренировки 26-30 апреля.

Участие в конференциях и экспедициях

- На научных конференциях по молекулярной генетике винограда в институте Агрономии в Сан Микеле ал' Адидже (06.05.04) и по автоклонному сорту "Teroldego" в Тренто;

- На семинаре в Арканиа в честь открытия новой лаборатории;
- В научной экспедиции по провинциям Комо и Павиа для обнаружения старых местных сортов Италии.

Визиты

Во время стажировки были посещены нижеперечисленные виноградческие районы, научные организации и питомники Италии:

- Виноградческие районы провинции Комо, Ольтрето Павезе, Вал д' Аоста и Озера Гарда;

- Коллекции геноплазмы винограда в Гориция (ERSA) и Рикаджойа (ERSAF), автоклонных сортов яблони в Кадриано (Болонья);

- Питомники: кооператив Раушедо и Пантианико (EPSAGRICOLA);
- Институт плодоводства и его коллекции в Риме, Региональный институт сельского хозяйства в Вал д' Аоста и институт Агрономии в Сан Микеле Ал' Адидже.

Разные активности

В рамках проекта IPGRI в месте с коллегами из Милана и Гориция было принято участие в ре-интродукции 44 грузинских сортов винограда из Италии в Грузию, присутствующих в Италии и отсутствующих в нашей новой коллекции в Вашлиджвари.

По-английски были переведены: резюме книги Р. Рамишвили "Дикорастущий виноград Закавказья"; резюме книги Янушевич З.В. и Пелиях М.А. "Дикорастущий виноград Молдавии"; фрагменты об археоботанических останках из книги Р. Рамишвили "История грузинского винограда и вина".

Литература

1. Lodhi, M.A., Guang-Ning Y., Norman F. W., Bruce I. R. 1994 - A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis* // Plant Molecular Biology Reporter 12(1): 6-13.
2. Mattivi F., Scienza A., Failla O., Villa P., Anzani R., Tedesco G., Gianazza E., Righetti P. 1990 - *Vitis vinifera* - A chemotaxonomic approach: anthocyanins in the skin. // Vitis, Special Issue: 119-33.

Опубликовано в:

It is published in:

"Development of National Programmes on Plant Genetic Resources in Southeastern Europe - Conservation of Grapevine in the Caucasus and Northern Black Sea Region". Second Project Meeting, 16-18 September 2004, Yalta, Ukraine. Book of abstracts English/Russian. Institute Vine & Wine Magarach and International Plant Genetic Resources Institute." – PP. 34-39.