

DENUMIREA PROIECTULUI:

Dezvoltarea și modernizarea colecțiilor de germoplasmă viticolă în scopul conservării pe termen lung a materialului biologic de valoare națională (ADER 3.1.3.)

Perioada de desfășurare: - data începerii: 22 octombrie 2015
- data finalizării: 31 octombrie 2018

Bugetul total al proiectului /cofinantare: 712.850 lei / 0 lei

Contractor proiect: Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Biotehnologii în Horticultură Ștefănești-Argeș

Parteneri în consorțiu:

- ⇒ P1 Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Valea Călugărească
- ⇒ P2 Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Blaj
- ⇒ P3 Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Bujoru
- ⇒ P4 Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Drăgășani
- ⇒ P5 Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Odobești
- ⇒ P6 Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Cultura Plantelor pe Nisipuri Dăbuleni

Colaborarea în rețea a unităților de cercetare implicate în conservarea și valorificarea resurselor genetice de viță-de-vie este esențială. Lucrul în echipă asigură punerea în valoare a potențialului uman, precum și evaluarea și valorificarea biodiversității viticole existente, în paralel cu mărirea acestei diversități. O evaluare reală, la nivel național, privind situația diversității genetice a sortimentului viticol, completată cu îmbunătățirea cantitativă și calitativă a materialului genetic din colecțiile de germoplasmă, reprezintă priorități naționale și obiective strategice pentru cercetarea horticola românească.

Pornind de la toate aceste considerente, proiectul ADER 3.1.3, cu titlul ***Dezvoltarea și modernizarea colecțiilor de germoplasmă viticolă în scopul conservării pe termen lung a materialului biologic de valoare națională*** a avut următoarele obiective specifice:

- I. Evaluarea situației actuale a colecțiilor de germoplasmă viticole;
- II. Caracterizarea sortimentului din colecții, cu precădere a soiurilor vechi - autohtone, aplicând metodele standardizate și actualizate pentru descriptorii ampelografici, în paralel cu determinări eno-carpologice, biochimice și moleculare;
- III. Extinderea și modernizarea colecțiilor de germoplasmă viticole conform standardelor OIV (Organizația Internațională a Viei și Vinului).

CONȚINUT TEMATIC

În proiect au fost implicați specialiști (viticultori, amelioratori, biologi, chimiști, tehnologi) din 7 unități de cercetare, toate deținătoare de colecții de germoplasmă viticole. Obiectivele specifice ale proiectului au fost stabilite pornind de la necesitățile pe plan național pentru cunoașterea valorii reale a varietăților existente în colecțiile noastre și pentru a deschide noi perspective de valorificare a acestei diversități. Noutatea acestui proiect a constat în faptul că s-a finalizat prin stabilirea, perfecționarea și implementarea unui evidențe standardizate pentru a) înregistrarea colecțiilor de germoplasmă și a accesionilor existente și / sau introduse în colecții; b) aplicarea unui sistem unitar pentru caracterizarea cât mai completă a varietăților existente și / sau introduse în colecțiile de germoplasmă; c) documentarea accesionilor de viță-de-vie din colecții pentru diferiți beneficiari (alte colecții, amelioratori, pepinieriști, fermieri, procesatori).

În toate unitățile participante la proiect, specialiștii au aplicat aceeași metodologie pentru caracterizarea ampelografică la 4 soiuri de referință (soiuri recunoscute internațional și care sunt prezente în toate colecțiile) și la 10, 11, sau 22 varietăți autohtone de viță-de-vie, reprezentative pentru zona viticolă respectivă.

Pentru verificarea autenticității materialului viticol existent în fiecare colecție, toți partenerii au efectuat aceleași determinări și evaluări numerice, după același sistem, recunoscut internațional, respectiv conform Manualului OIV al descriptorilor standardizați pentru *Vitis*, actualizat în 2009. Astfel, toate datele au fost centralizate, comparate și au fost semnalate și corectate eventualele greșeli de înregistrare și / sau descriere a accesionilor analizate. Determinările ampelografice, biometrice și biochimice au fost efectuate de fiecare partener la varietățile de referință și la cele autohtone, selectate.

Pentru confirmarea autenticității și / sau unicității varietăților din colecțiile de germoplasmă ale participanților la proiect, descrierea ampelografică a fost completată cu analizele moleculare. Conform planului stabilit de comun acord, a fost ales un număr de 54 de soiuri vechi, considerate autohtone și care prezintă risc de dispațiție. Rezultatele obținute din determinările moleculare cu 9 markeri SSR (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79) la Centrul de Cercetare de la Conegliano (Italia), sub directă coordonare a d-nei Manna Crespan, au fost verificate și comparate cu informațiile primite în alte două laboratoare de genetică moleculară, respectiv la Geilweilerhof (Germania) și Montpellier (Franța). Datele obținute au fost esențiale pentru caracterizarea completă a celor 54 accesioni de viță-de-vie și au fost înregistrate în bazele de date europene. Utilizarea setului de 9 markeri SSR pentru caracterizare moleculară și compararea datelor obținute cu cele existente în baza de date europeană (cuprinzând evidența tuturor colecțiilor de germoplasmă viticolă din Europa), pe lângă metodologia unitară de înregistrare a colecțiilor de germoplasmă (cea de înregistrare a celor 48 descriptori ampelografici și oeno-carpologici), a reprezentat noutatea tehnico-științifică a proiectului ADER 3.1.3.

Principalele rezultate obținute au fost: a) caracterizarea completă a unui număr de 75 de varietăți de viță-de-vie considerate autohtone (Fig. 1) și reprezentative pentru colecțiile respective, precum și pentru 8 varietăți de *Vitis sylvestris* (Fig 2); b) obținerea unui sistem unic de înregistrare a colecțiilor de germoplasmă viticole din România; c) modernizarea și extinderea colecțiilor de germoplasmă deținute de unitățile participante la proiect; d) diseminarea rezultatelor proiectului prin lucrări publicate în reviste de specialitate (18 articole științifice), sau cu ocazia manifestărilor științifice (12 prezentări - Fig. 4); e) publicarea unei cărți cu titlul "Strategii și principii pentru conservarea resurselor genetice viticole în colecții *ex situ*", care a inclus următoarele capitole: Capitolul I. Ghid pentru înființarea, menținerea și valorificarea colecțiilor de germoplasmă pentru viță-de-vie; Capitolul II. Descrierea și caracterizarea celor mai apreciate soiuri vechi de vită-de-

vie, considerate autohtone; Capitolul III. Identificarea și caracterizarea resurselor genetice viticole cu markeri SSR.

Fig. 1 Fișa soiului

NEGRUVARTOS (ROM051-263)

Descriptors related to trueness to type:

Trueness to type (of the variety)	yes
“Remarks to the accession name”	true name
“Variety number VIVC”	8466
“Confirmation by ampelography”	yes
“Confirmation by SSR-markers”	yes
“Confirmation by bibliography”	yes

Synonyms: 20 (Corb, Negru bătut, Gordan negru, Beilar Cherasi, Negru bulgar, Negru tare, Negru tare, Negru bulgăresc, Gordan negru, Cerno tvtrdo, Garvan, etc.)



Fig. 2. Diversitatea caracterelor ampelografice la varietăți de *Vitis sylvestris*

Caracterizarea ampelografică

OIV-001 deschiderea vârfului lăstarului



Vs10 G



Vs Letea 1



Vs3eb G

OIV-051 culoarea frunzei tinere



Vs3eb G



Vs Letea 1



Vs9dm H

Frunza matură: mărimea (065), formă (067), numărul lobilor (068), etc.



Vs6 S



Vs9 G



Vs9dm H



Vs12 G



Vs14 G



Vs Letea 2

Strugurele: mărimea (202), compactitatea (204), culoare pielița (225), etc.



Vs3eb G



Vs14 G



Vs10 G



Vs Letea 2

PERFORMANȚE REALIZATE:

- *Actualizarea înregistrărilor colecțiilor de germoplasmă după un sistem unic.* Pornind de la cerințele formulate în O.M. nr. 708/2015 și de la activitățile programate în propunerea de proiect ADER 3.1.3, toți participanții (CP, P1, P2, P3, P4, P5 și P6) au luat în considerație cerințele formulate în Acordul semnat de România la Programul de Cooperare Europeană pentru Resursele Genetice Vegetale. Fiecare unitate a început pregătirea dosarului de prezentare a colecției de germoplasmă viticolă pe care o deține - conform cerințelor internaționale.

- *Actualizarea descrierii sortimentului selectat (varietăți de viță-de-vie autohtone și soiuri de referință din sortimentul mondial).* Au fost selectate în vederea caracterizării un număr de 83 soiuri vechi ce viță-de-vie, considerate autohtone, (respectiv: 24 soiuri pentru masă, 34 soiuri pentru vinuri albe, 13 soiuri pentru vinuri roșii, 4 soiuri pentru vinuri aromate) și 8 varietăți de *Vitis vinifera subsp. sylvestris*. S-a finalizat descrierea acestor accesiuni după verificarea caracterelor ampelografice pe durata celor 3 ani de derulare a proiectului.

- S-a efectuat *analiza moleculară cu 9 markeri SSR* la 54 soiuri de viță-de-vie vechi, considerate autohtone (Fig. 3), în vederea:

- confirmării / infirmării autenticității lor;
- verificării sinonimiei lor cu alte varietăți existente în colecțiile naționale, sau internaționale;
- dovedirea omonimiei cu alte varietăți deținute de alte colecții de germoplasmă viticole din țară, sau din alte țări europene;
- demonstrarea unicității unor accesiuni pentru care se impun în viitor măsuri speciale de protecție și înmulțire;
- identificarea accesiunilor incorrect înregistrate.

- Toate determinările au avut drept scop obținerea descrierii complete a soiurilor vechi de viță-de-vie, multe dintre ele în pericol de a fi pierdute. Numai în baza unei descrieri complete și conforme cu cerințele pentru colecțiile de germoplasmă europene, s-au întocmit corect fișele pentru soiurile din fiecare colecție și, în baza lor, se vor efectua schimburi de material genetic între colecțiile naționale, sau între cele naționale și colecțiile de germoplasmă viticolă din alte țări.

- Ca urmare a activităților desfășurate în perioada 2015-2018, a schimbului de experiență între specialiștii participanți la proiect, au fost acceptate și utilizate *formularele standard*, pentru înregistrarea colecțiilor de germoplasmă viticolă conform cerințelor internaționale, precum și a celor pentru caracterizarea completă a accesiunilor existente și / sau introduse în colecții, aceste documente fiind esențiale pentru valorificarea eficientă a varietăților de viță-de-vie deținute.

În concordanță cu obiectivele proiectului, ne-am propus următoarele:

- să contribuim la susținerea conservării resurselor genetice viticole în colecții de germoplasmă regionale;
- să promovăm conservarea biodiversității genetice a varietăților de viță-de-vie specifice arealului românesc;
- să stimulăm interesul cercetătorilor pentru reevaluarea diversității sortimentului existent în colecțiile noastre de germoplasmă viticolă, documentarea acestei diversități și promovarea zestrei viticole naționale la nivel mondial.

Genotipurile autohtone de viță-de-vie, păstrate în colecțiile de germoplasmă trebuie readuse în atenția specialiștilor, reconsiderate și valorificate la justa lor importanță biologică.

Fig. 3. Metoda moleculară utilizată pentru identificarea soiurilor de viță-de-vie

Markerii microsatelitici - SSR

La vița de vie markerii moleculari SSR se folosesc pentru:

1. Generarea profilului unic pentru soi
 - stabilirea identității reale a soiurilor;
 - dovedește fidelitatea materialului de înmulțire;
 - documentează eliminarea erorilor care pot apărea la înregistrare, sau la înmulțire
2. Identificarea și caracterizarea materialului genetic - pentru selectarea materialului parental în programele de ameliorare
3. Managementul eficient al colecțiilor de germoplasmă (care înseamnă identificarea și păstrarea mai ales a soiurilor unice, precum și eliminarea materialului redundant (soiuri sinonime și soiuri homonime)).
4. Datele obținute au fost comparate cu bazele de date existente la:
 - Centre of Viticultural Research (CREA-VIT), CONEGLIANO, Italia / **Manna Crespan**;
 - JKI - Julius Kühn-Institut für Rebenzüchtung GEILWEILERHOF, Germania / **Erika Maul**;
 - INRA, Montpellier - VASSAL collection, Franța / **Thierry Lacombe și Valerie Laucou**

54 soiuri de viță de vie, considerate autohtone

extracția ADN - Qiagen DNeasy Plant mini-kit

9 markeri SSR: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79

Accession name	VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD25	VVMD27	VVMD28	VVMD32	VrZAG62	VrZAG79									
Alb românesc (misnomer)	149	151	226	238	247	249	253	273	179	189	247	261	241	273	185	195	250	254
Ardeleancă	133	143	226	234	239	249	245	259	185	194	251	261	251	273	193	203	242	250
Băbească neagră	143	143	236	238	249	253	253	259	181	194	231	237	257	273	199	201	256	258
Bacator	133	133	226	240	239	253	245	245	179	185	237	251	251	273	187	193	250	250
Bășicată	133	143	226	246	247	249	243	259	185	194	251	263	253	273	193	203	248	248
Bătută neagră Negru românesc	133	143	232	246	239	249	243	253	185	194	237	239	253	253	187	203	248	250
Berbecel	143	143	238	246	239	249	253	259	187	189	251	263	253	259	187	193	242	250
Busuioacă de Bohotin	133	133	228	236	233	249	245	253	179	194	249	271	265	273	185	195	250	254
Iordană	133	143																
Gordan	133	133	240	246	239	249	243	245	179	185	231	263	251	253	195	203	236	250
Zemoasă	133	133																
Bragină albă	133	135	226	246	239	239	243	243	179	194	231	239	265	273	187	187	248	250
Bragină roz	133	135	226	240	239	239	243	245	179	181	239	239	257	273	187	195	250	258
Cabernet Sauvignon	139	151	232	240	239	239	243	253	175	189	237	239	241	241	187	193	246	246
Heunisch weiss	133	143	234	240	239	249	243	259	179	181	231	249	251	273	195	203	236	242
Schiava grossa	135	155	236	238	247	247	245	259	181	185	239	247	253	273	191	193	238	258

Fig 4. Poster cu rezultate parțiale obținute



UNIVERSITY OF PITEȘTI
FACULTY OF SCIENCES, PHYSICAL EDUCATION AND INFORMATICS
INTERNATIONAL SCIENTIFIC SYMPOSIUM CURRENT TRENDS IN NATURAL SCIENCES
April 19-21, 2018



COMBINING MICROSATELLITE MARKERS AND AMPELOGRAPHY FOR BETTER MANAGEMENT OF ROMANIAN GRAPEVINE GERMLASM COLLECTIONS

Carmen Florentina Popescu¹⁾, Manna Creșpan²⁾

¹⁾ National Research and Development Institute for Biotechnology in Horticulture (NROBIR) Ștefănești-Argeș, Romania

²⁾ Council for Agricultural Research and Economics - Centre of Viticulture and Enology Research, Conegliano (TV), Italy


A comprehensive characterization of accessions preserved in germplasm collections entails ampelographic description with standardized descriptors and molecular analyses with an internationally shared set of SSR markers. The two approaches ensure accurate identification and guarantee authenticity of plant material used in research work, preserved in germplasm collections, or distributed for establishing new vineyards. Aiming to investigate the correspondence of phenotypic variability and molecular markers, 60 varieties of *Vitis vinifera* ssp. *vinifera*, aneuploid grapevine varieties grown on Romanian territory, were selected to be analyzed. All varieties were subjected to ampelographic analyses with OIV descriptors and also to molecular analyses with 13 microsatellites.

Ampelographic description


From the total of fifty (50) varieties:

- 5 are very well appreciated and grown in many other countries with long time viticulture tradition;
- 7 are major local cultivars, extensively grown in our country;
- 2 are minor local cultivars, fairly utilized in wine production;
- 36 are considered autochthonous, grown for centuries on the territory of our country, but today rarely notified in private households, or preserved in few germplasm collections.

BĂBEASCĂ NEAGRĂ




Young shoot tip Mature leaf




Bunches of Băbească neagră

All features and their descriptor records were compared with those in the reference literature. Some characters were slightly different, such as: intensity of anthocyanin coloration of the shoot tip, colour of upper side of the young leaf, shape of the mature leaf, degree of opening/overlapping of petiole sinus, shape of petiole sinus, density of prostrate hairs between main veins on lower side of mature leaf, bunch density, bunch shape, berry shape, sugar content of must and total acidity of must. These differences are often explained as different responses of each variety to variable cultural conditions, healthy status of the plants, observer subjectivity.

VULPEA
ROM061-272, MVC 13106



Young shoot tip Mature leaf



Bunch of Vulpea

SSR profiles for identifying synonyms, homonyms, misnomers and unique genotypes

Corroborating the genetic profiles for 13 SSR markers with reference literature information, we came to the following conclusions:

- were confirmed 10 synonymies mentioned in old documents;
- were not confirmed 3 synonymies presented in reference old literature:
Busuioacă de Bohotin is a red somatic variant for berry colour of 'Muscat à petits grains blancs' and not a synonym with 'Muscat rouge de Madere';
Galbenă uriașă SSR profile matched that of 'Mikovaca' and is not a clonal variant of 'Galbenă de Odobești';
Tămăloasă românească was proven not to share the same SSR profile of 'Muscat à petits grains blancs', it is supposed the existence of a mixture of at least two varieties of Tămăloasă românească in our vineyards;
- synonyms were found for 4 accessions for which there is no information in the Romanian ampelographic literature;
- new synonyms, which will be added to the previous mentioned in the literature, for 4 varieties;
- for the first time in our literature were documented the synonymies in three groups of accessions;
- was proved the unicity of three Romanian accessions: Măroștină, Negru mare and Românie;
- for 15 varieties the genetic profiles were identical to those already recorded in the databases.

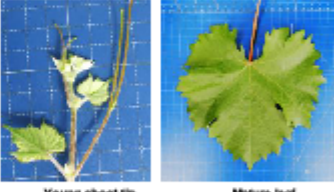
SSR markers for assessing genetic diversity in Romanian grapevine varieties

Genetic markers and parameters applied to analyze their effectiveness to highlight genetic variability from the grapevine germplasm collection


Locus	Na	Ne	Ho	He	PiC
VYS2	9	3.99	0.644	0.758	0.710
VWM05	8	7.23	0.933	0.871	0.848
VWM07	8	3.27	0.733	0.703	0.681
VWM25	8	4.09	0.822	0.785	0.713
VWM27	8	4.57	0.844	0.790	0.748
VWM28	13	8.16	0.887	0.887	0.895
VWM32	11	5.09	0.911	0.813	0.780
VZAG82	8	4.51	0.887	0.787	0.748
VZAG79	10	5.13	0.822	0.814	0.784
ISV2	8	3.57	0.822	0.729	0.673
ISV3	7	2.74	0.800	0.842	0.568
ISV4	8	5.03	0.889	0.810	0.771
VMCNG4B9	10	5.49	0.822	0.827	0.784
Mean values	8.62	4.84	0.829	0.784	0.742

Aiming to evaluate the markers efficiency in assessment of the genetic diversity among studied varieties, were calculated: number of alleles per locus (Na), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), polymorphic information content (PiC) and probability of identity (Pi). Beside the nine recommended SSR markers, were remarked the ISV4 and VMCNG4B9 markers, which displayed the highest diversity levels regarding the expected heterozygosity with some of the highest values of PiC and the lowest values of Pi.

GALBENĂ DE ODOBEȘTI
ROM061-258, MVC 12727



Young shoot tip Mature leaf



Bunch of Galbenă de Odobești

CONCLUSIONS

Variety identification is important to breeders, curators, grape growers, winemakers and grape and wine consumers and, also it is a proof of a good traceability system throughout producing of grapevine planting material and winemaking process.

Beside ampelographic description, the DNA analyses are necessary to verify grapevine identity prior acquisition for germplasm collection, before to distribute or exchange plant material, before planting and establishing a vineyard or to invest in wine production.

These data are essential for improving the knowledge on Romanian grape varieties, completing our information on the existence of synonyms with other varieties in European germplasm collections, as well as identifying unique genotypes that require particular attention for preservation.