Allegato 6

COSTI PER VARIETA' PER CICLO DI PROVA (EURO, IVA inclusa)

Tipologia	Spese generali di coordinamento	Analisi seme costitutore (per analisi)	Prova descrittiva (per parcella)	Prova agronomica (per parcella)	Analisi qualitative (per analisi)	Biometria seme costitutore (per analisi)	Biometria raccolto (per analisi)	Resa alla lavorazione industriale (per analisi)	Analisi molecolari (per varietà)		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	TOTALE (EURO)	
Linea pura	292,00	101,00	252,00	-	252,00	-	-	-	-	(A+B+2C+E)	**1.149,00**
Varietà non ibrida	292,00	101,00	252,00	303,00	252,00	25,00	50,00	5,00	-	(A+B+2C+9D+E+F+9G+9H)	**4.396,00**
Varietà ibrida (compresi componenti/parentali)	292,00	101,00	252,00	303,00	252,00	25,00	50,00	5,00	384,00	(A+3B+6C+9D+3E+3F+9G+9H+I)	**6.544,00**
Resistenze ad erbicidi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**706,00**
Primo anno di prove sotto sorveglianza ufficiale	292,00	-	-	-	-	-	-	-	-	(A)	**292,00**

Appendice 1

DISPOSIZIONI PARTICOLARI PER LE VARIETÀ IBRIDE

Questa appendice modifica ed integra alcuni paragrafi del presente decreto. Per tutto ciò che non è specificato in questa appendice, si fa riferimento a quanto definito nel testo per le varietà non ibride.

1.2 Questionario tecnico

Il questionario tecnico di un ibrido deve comprendere anche la descrizione dei relativi parentali e delle linee componenti (punto 4 dell'*allegato n. 1*). In applicazione dell'articolo 19 comma 10 della legge n. 1096 del 25 novembre 1971, la parte confidenziale offre ai costitutori di varietà ibride e sintetiche la possibilità di richiedere un trattamento riservato dei dati riguardanti le linee parentali (*allegato 1.1*).

Qualora venga richiesta l'iscrizione di un componente di un ibrido ai sensi dell'art. 15 comma IV D.P.R. 1065/73, fermo restando che questo debba essere adatto alle condizioni pedoclimatiche italiane, si procederà alla sola effettuazione della prova descrittiva.

1.4 Materiale da inviare al Centro di coordinamento

Il Richiedente deve inviare al Centro di coordinamento, per ogni ciclo di semina, entro il:

15 febbraio

il seguente materiale:

- ◊ un campione di 5 kg di seme della nuova varietà.

Al primo anno di prova devono essere inviati, oltre alla semente dell'ibrido, anche i componenti dello stesso:

- ◊ 2 kg di sementi del componente maschile (impollinante),
- ◊ 2 kg di sementi del componente femminile maschiosterile,
- ◊ 2 kg di sementi del componente femminile mantenitrice: solo nel caso in cui il componente femminile sia una linea dotata di maschiosterilità citoplasmatica, in quanto le corrispondenti linee isogeniche fertili sono utili per verificare l'identità morfologica dei due tipi.

Per i componenti o le linee iscritte o protette in Italia non è richiesto l'invio di seme.

2. PROVA DESCRITTIVA

Detta prova è effettuata sulla nuova varietà e sui relativi componenti e/o parentali.

La prova comprende la coltivazione di una parcella per il rilievo dei caratteri morfo-fisiologici, analisi di laboratorio e la verifica della formula mediante l'uso di marcatori molecolari di tipo microsatelliti (SSR).

2.1 Condizioni della prova

Nel caso in cui, sui componenti, sia necessario un ulteriore approfondimento, il Centro di Coordinamento, può chiedere un nuovo invio di sementi dei parentali al secondo anno.

2.2 Collezione di riferimento e scelta dei testimoni varietali

La collezione comprende le varietà iscritte o protette a livello comunitario (in particolare le varietà di riferimento CPVO, almeno (quelle coltivabili negli areali italiani), le varietà protette negli Stati aderenti all'UPOV, ogni altra varietà di comune conoscenza e possibilmente tutti i componenti delle varietà ibride di comune conoscenza.

2.3 Valutazione della distinguibilità

Per valutare la distinguibilità delle varietà ibride si effettua un esame preliminare sulla base delle linee parentali e della formula secondo le seguenti modalità:

a) descrizione delle linee parentali con i caratteri della scheda di cui all'*allegato n. 2*;
b) controllo dell'originalità dei componenti comparati con quelli più simili in confronto con la collezione di riferimento;
c) confronto della formula dichiarata con quella degli ibridi già iscritti e conservati nel database o nella collezione di riferimento;
d) valutazione della distinguibilità dell'ibrido; per quanto riguarda i carattere 36, 37 e 38 dell'*allegato 2* l'accertamento verrà effettuato sul prodotto raccolto.

2.4 Valutazione dell'omogeneità

La varietà viene considerata omogenea se il numero di fuori tipo (inclusi gli individui auto-impollinati che risultino chiaramente self - autofecondazioni) è inferiore o uguale alla soglia indicata nella tabella sottostante che considera una popolazione standard pari a 0,5% con probabilità superiore o uguale al 95%.

N° PIANTE ESAMINATE	NUMERO FUORI-TIPO AMMESSI
1000	9
1500	12
2000	15

La valutazione dell'omogeneità per le linee parentali segue le regole definite per le varietà autoimpollinanti.

2.5 Valutazione della formula dell'ibrido mediante l'uso di marcatori molecolari SSR (*Single Sequence Repeat*)

I loci genomici scelti per la valutazione della formula dell'ibrido sono i cosiddetti microsatelliti o SSR (*Single Sequence Repeats*). Queste regioni del DNA sono caratterizzate dalla presenza di brevi sequenze nucleotidiche costituite da due o più basi ripetute consecutivamente (es: ATATATATAT; CGTCGTCGTCGT). Gli individui analizzati possono distinguersi tra loro per il diverso numero di ripetizioni che compongono tali sequenze.

Gli SSR permettono:

- l'identificazione dei diversi alleli di un sigolo *locus*;
- la definizione della formula degli ibridi poiché sono marcatori codominanti.

2.5.1 Scopo dell'analisi

La descrizione del profilo molecolare ottenuto dalla combinazione di 12 SSR ben distribuiti nel genoma e con un buon livello di polimorfismo è impiegata a complemento della descrizione dei caratteri morfofisiologici sia dei parentali che dell'ibrido per:

◊ la verifica della formula dell'ibrido

Sfruttando la natura codominante dei marcatori SSR è possibile, mediante la descrizione delle linee parentali, desumere la formula teorica dell'ibrido e confrontarla con quella effettivamente rilevata nella varietà ibrida in iscrizione;

◊ la valutazione della omogeneità

La rilevazione del livello e del tipo di disomogeneità (presenza di alleli diversi ad uno stesso locus) nelle linee pure consentirà di spiegare la eventuale variabilità rilevata nell'ibrido e sarà quindi utile per la validazione della formula.

Nella tabella 1 sono riportati i marcatori microsatelliti e le loro principali caratteristiche. I 12 SSR costituiscono il pannello che dovrà essere utilizzato per la descrizione delle linee pure e degli ibridi corrispondenti.

SSR	**Cromosoma**	**Paia di basi**	**Repeat**	**T° annealing**
RM24	1	167-181	$(GA)_{29}$	56° C
RM475	2	182-222	$(TATC)_{8}$	56° C
RM338	3	174	$(CTT)_{6}$	56° C
RM252	4	166-214	$(CT)_{19}$	56°C
RM164	5	234-320	$(GT)_{16}TT(GT)_{4}$	56° C
RM253	6	97-143	$(GA)_{25}$	56° C
RM336	7	140-200	$(CTT)_{18}$	56° C
RM44	8	88-126	$(GA)_{16}$	56° C
RM219	9	180-222	$(CT)_{17}$	56° C
RM215	9	147-155	$(CT)_{16}$	56° C
RM202	11	155-183	$(CT)_{30}$	56° C
RM235	12	86-134	$(CT)_{24}$	56° C

Tabella 1: elenco dei marcatori SSR utilizzati e loro principali caratteristiche.

2.5.2 Riconoscimento degli alleli codificati dai marcatori SSR

I profili elettroforetici ottenuti da 28 varietà testimoni sono utilizzati come riferimento per il riconoscimento degli alleli individuati a ciascun locus SSR (allegato 1).

Nelle tabelle seguenti (Tab. 2, Tab. 3) sono riportati gli alleli identificati ai diversi loci SSR per alcune varietà di riferimento:

Cr1		Cr2		Cr3	
RM24		RM475		RM338	
Alleli	Varietà di riferimento	Alleli	Varietà di riferimento	Alleli	Varietà di riferimento
RM24-a(167bp)	Loto	RM475-a(166bp)	IR64	RM338-a(174bp)	Aiace
RM24-b(169bp)	Cripto	RM475-b(182bp)	S. Andrea	RM338-b(177bp)	IR64
RM24-c(175bp)	Roma	RM475-c(214bp)	Vialone nano		
RM24-d(177bp)	Vialone nano	RM475-d(218bp)	Cripto		
RM24-e(181bp)	Aiace	RM475-e(222bp)	Loto		
Cr4		Cr5		Cr6	
RM252		RM164		RM253	
Alleli	Varietà di riferimento	Alleli	Varietà di riferimento	Alleli	Varietà di riferimento
RM252-b(192bp)	Carnaroli	RM164-a(243bp)	IR64	RM253-a(127bp)	Baldo
RM252-c(194bp)	Aiace	RM164-b(254bp)	Carnaroli	RM253-b(129bp)	Carnaroli
RM252-b(214bp)	IR64	RM164-c(264bp)	Selenio	RM253-c(131bp)	Arborio
		RM164-d(266bp)	Carnise	RM253-d(137bp)	Tequing
		RM164-e(294bp)	Venere	RM253-e(139bp)	IR64
		RM164-f(297bp)	Thaibonnet		
		RM164-g(301bp)	Lemont		

Tabella 2: elenco degli alleli e di alcune varietà testimoni per alcuni *loci* SSR

Cr7		Cr8		Cr9	
RM336		RM44		RM219	
Alleli	Varietà di riferimento	Alleli	Varietà di riferimento	Alleli	Varietà di riferimento
RM336-a(134bp)	Venere	RM44-a(88bp)	Carnise	RM219-a(188)	Carnise
RM336-b(146bp)	Arborio	RM44-b(98bp)	IR64	RM219-b-(192)	Carnaroli
RM336-c(152bp)	Koral	RM44-c(104bp)	Carnaroli	RM219-c(200)	Baldo
RM336-d(155bp)	S. Andrea	RM44-d(108bp)	S.Andrea	RM219-d(218)	IR64
RM336-e(158bp)	Carnise	RM44-e(116bp)	Ariete		
RM336-f(161bp)	Catelmochi	RM44-f(126bp)	Koral		
RM336-g(164bp)	Thaibonnet				
RM336-h(191bp)	IR64				
Cr9		Cr11		Cr12	
RM215		RM202		RM235	
Alleli	Varietà di riferimento	Alleli	Varietà di riferimento	Alleli	Varietà di riferimento
RM215-a-(147bp)	Tequing	RM202-a-(155bp)	Gange	RM235-a (96bp)	Thaibonnet
RM215-b-(149bp)	Baldo	RM202-b(157bp)	Thaibonnet	RM235-b(98bp)	Castelmochi
RM215-c(151bp)	Carnaroli	RM202-c(171bp)	Baldo	RM235-c(100bp)	Selenio
RM215-d-(153bp)	Selenio	RM202-d(179bp)	Tequing	RM235-d(102bp)	S. Andrea
RM215-e(155bp)	Ariete	RM202-e(183bp)	Rombo	RM235-e(110bp)	Tequing
				RM235-f (132bp)	IR 64

Tabella 3: elenco degli alleli e di alcune varietà testimoni per alcuni *loci* SSR

2.5.3 Materiali

Al primo anno di prova per il controllo della formula saranno esaminati 10 individui per ciascun parentale e 4 individui per l'ibrido corrispondente.

Nel caso in cui l'ibrido risulti disomogeneo anche ad un solo locus verranno esaminati altri 6 individui singoli.

Al secondo anno di prova l'analisi verrà effettuata sul nuovo campione di seme ibrido inviato, ciò consentirà di confermare la correttezza della formula e di verificare la stabilità del materiale.

2.5.4 Metodi

Estrazione degli acidi nucleici

Gli acidi nucleici verranno estratti da germinelli di circa 15 giorni secondo il protocollo proposto da Doyle e Doyle (1990) che prevede l'utilizzo di cetyltrimethylammonium

bromide (CTAB), un detergente ionico in grado di formare complessi insolubili con gli acidi nucleici in determinate concentrazioni saline della soluzione di estrazione.
In alternativa possono essere utilizzati kit di estrazione commerciali.

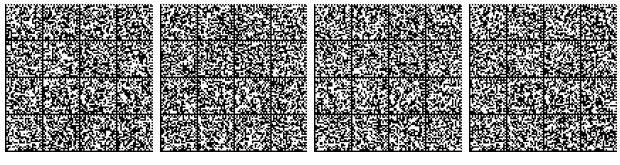
Reazione di Amplificazione e sistemi di rilevazione
Le sequenze dei primer da utilizzare per l'amplificazione dei diversi *loci* SSR sono elencate nella tabella 4.
Data la grande varietà di protocolli disponibili per la reazione di amplificazione e dei sistemi di rilevazione (elettroforesi su gel, elettroforesi capillare) si ritiene inopportuno stabilire una procedura analitica rigida, perciò per l'allestimento delle analisi sarà possibile utilizzare protocolli diversi fermo restando l'impiego del pannello di microsatelliti selezionati e delle varietà testimone indicate.

PRIMER	**SEQUENZA 5'-3'**	**PRIMER**	**SEQUENZA 5'-3'**
RM24-F	gaagtgtgatcactgtaacc	RM336-	cttacagagaaacggcatcg
RM24-R	tacagtggacggcgaagtcg	RM336-	gctggtttgtttcaggttcg
RM475-F	cctcacgattttcctccaac	RM44-F	acgggcaatccgaacaacc
RM475-R	acggtgggattagactgtgc	RM44-R	tcgggaaaacctaccctacc
RM338-F	cacaggagcaggagaagagc	RM219-	cgtcggatgatgtaaagcct
RM338-R	ggcaaaccgatcactcagtc	RM219-	catatcggcattcgcctg
RM252-F	ttcgctgacgtgataggttg	RM215-	caaaatggagcagcaagagc
RM252-R	atgacttgatcccgagaacg	RM215-	tgagcacctccttctctgtag
RM164-F	tcttgcccgtcactgcagatatcc	RM202-	cagattggagatgaagtcctcc
RM164-R	gcagccctaatgctacaattcttc	RM202-	ccagcaagcatgtcaatgta
RM253-F	tccttcaagagtgcaaaacc	RM235-	agaagctagggctaacgaac
RM253-R	gcattgtcatgtcgaagcc	RM235-	tcacctggtcagcctctttc

Tabella 4: Sequenze dei primer forward (F) e reverse (R)

2.5.5 Elaborazione dati

I frammenti di amplificazione verranno misurati grazie all'utilizzo di marcatori di peso molecolare ed il confronto con le varietà di riferimento, di seguito è riportato un esempio di tabella per la raccolta dei dati.



		RM24	RM452	RM338	RM252	RM164	RM253	RM336	RM44	RM219	RM215	RM202	RM235	n°
I anno	Linea femm.	*RM24-a*	*RM452-a*	*RM338-a*	*RM252-a*	*RM164-b*	*RM253-b*	*RM336-e*	*RM44-e*	*RM215-c*	*RM215-a*	*RM202-d*	*RM235-a*	10
I anno	Linea masch.	*RM4-c*	*RM452-a*	*RM338-b*	*RM252-c*	*RM164-d*	*RM253-b*	*RM336-e*	*RM44-a*	*RM215-c*	*RM215-a*	*RM202-c*	*RM235-b*	10
	Ibrido atteso	*RM24-a/c*	*RM452-a/a*	*RM338-a/b*	*RM252-a/c*	*RM164-b/d*	*RM253-b/b*	*RM336-e/e*	*RM44-e/a*	*RM215-c/c*	*RM215-a/a*	*RM202-d/c*	*RM235-a/b*	
I anno	Ibrido	*RM24-a/c*	*RM452-a/a*	*RM338-a/b*	*RM252-a/c*	*RM164-b/d*	*RM253-b/b*	*RM336-e/e*	*RM44-e/a*	*RM215-c/c*	*RM215-a/a*	*RM202-d/c*	*RM235-a/b*	4
II anno	Ibrido	*RM24-a/c*	*RM452-a/a*	*RM338-a/b*	*RM252-a/c*	*RM164-b/d*	*RM253-b/b*	*RM336-e/e*	*RM44-e/a*	*RM215-c/c*	*RM215-a/a*	*RM202-d/c*	*RM235-a/b*	4

Tabella 5: Schema per la raccolta dei dati per la descrizione dell'ibrido

2.6 Iscrizione con un anno di prove sotto sorveglianza ufficiale

Il costitutore deve inviare al 1° anno di prova sotto sorveglianza ufficiale al Centro di coordinamento entro il 15 febbraio, un campione di 200 g di semi dell'ibrido e un campione di 100 g di semi per ciascun parentale e componente.

Bibliografia

Sundaram *et al*. (2008). Identification of informative SSR markers capable of distinguishing Hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. Euphytica 163: 215-224.

Yashitola *et al*. (2002). Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. Crop Sciences 42: 1369-1373.

Hasshemi *et al*. (2009). Identification of rice hybrids using microsatellites and RAPD markers. African Journal of Biotechnology 8 (10): 2094-2101.

Guangjie *et al*. (2008). Molecular characterization of the recombinant inbred line population derived from a *japonica- indica* rice cross. Euphytica 159: 7382.

Rahman *et al*. (2009). DNA fingerprinting of rice (*Oryza sativa*) cultivars using microsatellites markers. Australian Journal of Crop Sciences 3(3): 122-128.

Sundaram Ganesh Ram *et al*. (2007). Genetic diversity among cultivars, landraces and wild relatives of rice as revealed by microsatellites markers. Journal Applied Genetics 48 (4): 337-345.

Sundaram R.M. *et al*. (2008). Identification of informative SSR markers capable of distinguishing hybrids rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. Euphytica 163: 215-224.

Rajendracumar *et al*. (2007). A mitochondrial repeat specific marker for distinguishing Wild abortive type cytoplasmic male sterile from their cognate isogenic maintainer lines. Crop Sciences 47: 207-211.

Yashitola *et al*. (2004). A sequence specific PCR marker for distinguishing rice lines on the basis of wild abortive cytoplasm from their cognate maintainer lines. Crop Sci. 44: 920-924.

Filho *et al*. (2007). A set of multiplex panels of microsatellites marker for rapid molecular characterization of rice accessions. BMC Plant Biology 7:23.

Casarini *et al*. (2008). First comparative test on DNA based methods: final report of the Variety C Working Committee Working Group. ISTA Seed Testing International n°135 April 2008.

Sito Internet www.gramene.org

Doyle and Doyle (1990). Focus 12:13-15.

14A02976