



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Territori e Sistemi Agroforestali

Corso di laurea triennale in Scienze e Tecnologie
Viticole ed Enologiche

**Biodiversità in vite: origine, caratterizzazione,
conservazione e funzione applicativa**

Relatore

Prof. Serena Varotto

Correlatore

Dott. Massimo Gardiman

Laureando
Vignoni Nicolò

Matricola n. 1223049

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

RIASSUNTO	2
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUZIONE	4
2 BIODIVERSITÀ IN VITE.....	5
2.1 Origine ed evoluzione del patrimonio genetico della vite	5
2.2 Conservazione della biodiversità viticola	11
2.2.1 Le tecniche di conservazione	13
2.2.2 La collezione del CREA.....	15
3 CARATTERIZZAZIONE DEI VITIGNI	17
3.1 Caratterizzazione ampelografica classica	17
3.2 Caratterizzazione molecolare	21
3.2.1 Simple Sequence Repeats	23
3.2.2 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)	27
3.2.3 Confronto tra SSRs e SNPs.....	28
4 IL MIGLIORAMENTO GENETICO DELLA VITE	29
4.1 Il ruolo della genetica e la selezione assistita da marcatori molecolari (MAS).....	31
4.2 Le varietà resistenti	34
4.3 Genome editing	38
5 CONCLUSIONE.....	41
6 BIBLIOGRAFIA.....	44

RIASSUNTO

La biodiversità in vite rappresenta l'insieme dei diversi genotipi appartenenti al genere *Vitis*.

Comparsa nella Terra decine di milioni di anni fa, la vite selvatica ha colonizzato diversi ambienti aventi caratteristiche pedoclimatiche nettamente differenti. Sottoposta ad un lungo percorso di domesticazione adottato dall'uomo e atto all'ottenimento di genotipi sempre più performanti dal punto di vista produttivo, la vite ha potuto adattarsi ed evolversi generando così un pool genetico formato da un numeroso gruppo di cloni significativamente diversi tra loro.

È compito della società, nella sua interezza, salvaguardare e proteggere tale patrimonio, così immenso, ma allo stesso tempo così fragile, attraverso adeguati programmi di conservazione e promozione delle cultivar minoritarie locali, frenando in tal modo l'omologazione varietale che caratterizza la viticoltura da diversi decenni.

Indispensabile, inoltre, risulta essere la caratterizzazione del patrimonio genetico della vite. Negli ultimi anni, grazie al rapido sviluppo della genomica, la caratterizzazione è passata da essere esclusivamente ampelografica, ovvero basata su osservazioni della morfologia, a prevalentemente molecolare. La caratterizzazione molecolare, grazie all'utilizzo di specifiche sequenze nucleotidiche (marcatori molecolari), consente la discriminazione dei diversi genotipi di vite in modo rapido e preciso, e la quale, recentemente, ha permesso l'identificazione di un elevato numero di sinonimi e omonimi tra le varietà.

Tuttavia, nel settore vitivinicolo la genetica ha acquisito negli ultimi anni un'altra importante funzione, ossia quella d'assistenza verso i programmi di miglioramento genetico, in larga parte orientati all'ottenimento di varietà tolleranti ai principali stress, biotici e abiotici, che caratterizzano la viticoltura odierna.

ABSTRACT

Biodiversity in grapevine represents the set of different genotypes belonging to the genus *Vitis*.

After appearing on Earth tens millions years ago, the wild grapevine colonized various environments with markedly different soil and climate characteristics. By following a long path of domestication adopted by man and aimed at obtaining genotypes with increasingly higher production performance, grapevine was able to adapt and evolve, thus generating a gene pool composed of a huge number of significantly different clones.

It is the task of society as a whole to safeguard and protect this heritage, so immense but at the same time so fragile, through appropriate conservation and promotion programmes for local minority cultivars, thus curbing the varietal homologation against which the viticulture has been fighting for several decades.

The correct characterisation of the genetic heritage is particularly important in today's wine market, where important legal and cultural aspects arise. In recent years, thanks to the rapid development of genomics, the characterisation has moved from being exclusively ampelographic, which is based on morphological observations, to being essentially molecular. Molecular characterisation, thanks to the use of DNA sequences (molecular markers), enables the identification of the different grapevine genotypes in a remarkably rapid and precise manner, and has recently enabled the discrimination of many synonyms and homonyms between varieties.

In the wine-growing sector, however, genetics has acquired another important function in recent years, namely that of assisting breeding improvement programmes, largely aimed at obtaining varieties that are resistant to the main biotic and abiotic stresses that characterise today's viticulture.

1 INTRODUZIONE

Con un numero di cultivar iscritte al Registro Nazionale delle Varietà di Vite prossimo a 600, molte delle quali autoctone[1], e con il 75% della superficie vitata coperta dalle 80 varietà più coltivate, l'Italia risulta essere di gran lunga il paese con la maggiore biodiversità viticola al mondo[2]. Tale traguardo è stato raggiunto grazie ai fortissimi legami storici e culturali instaurati dalle antiche popolazioni della penisola italiana con la vite, e un clima particolarmente idoneo alla sua coltivazione, i quali hanno permesso un'elevata intensità e continuità di quei processi che costituiscono la base della variabilità genetica, ossia[3]:

1. l'isolamento di popolazioni diverse attraverso barriere geografiche invalicabili o ampie estensioni spaziali (*deriva genetica*);
2. le mutazioni genetiche;
3. la selezione naturale;
4. la selezione antropica.

In particolare, l'uomo e i continui processi di domesticazione e di selezione della vite perpetuati fino a i nostri giorni, hanno permesso la espressione ottimale dei caratteri fenotipici di maggiore rilevanza per quanto concerne la produzione di uva e di vino, e allo stesso tempo hanno garantito un marcato ampliamento della diversità genetica della vite.

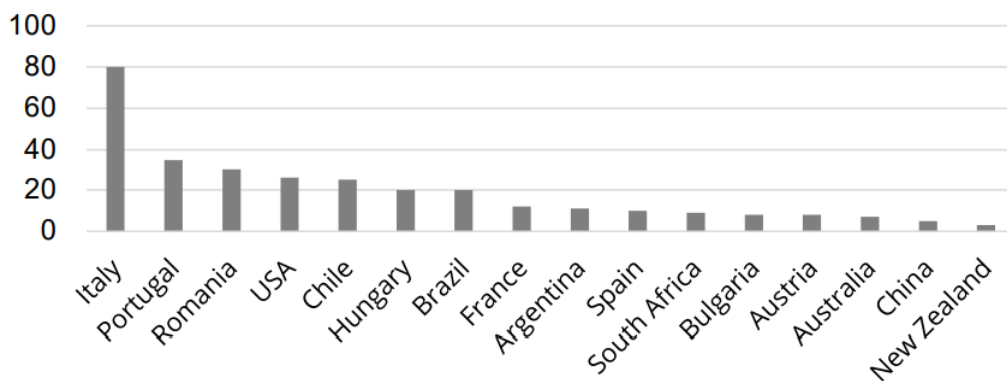


Figura 1.1 - Numero delle principali varietà che coprono il 75% della superficie vitata nazionale[2].

L'importante perdita del patrimonio varietale alla quale si è assistito negli ultimi tempi, causato principalmente dalla comparsa della fillossera, afide appartenente alla famiglia delle Phylloxeridae, introdotto in Europa dal Nord America nel XIX secolo, e della più recente centralizzazione nella produzione e nel consumo verso un gruppo ristretto di poche varietà in seguito alla globalizzazione[4] hanno evidenziato la fragilità della biodiversità in vite. Questa fragilità rappresenta un campanello d'allarme al quale l'intero settore vitivinicolo mondiale deve prestare particolare attenzione.

Preservare la variabilità genetica della vite non risulta indispensabile solamente per proteggere un patrimonio naturale e culturale da un graduale e irreversibile impoverimento, ma è anche un mezzo per garantire lo sviluppo futuro della viticoltura stessa. Infatti la biodiversità in vite, accompagnata dall'applicazione di studi e tecnologie genetiche come marcatori molecolari e banche dati, è una risorsa fondamentale per il miglioramento genetico della vite e per soddisfare le esigenze del settore vitivinicolo odierno e futuro.

Molto del patrimonio genetico del genere *Vitis* resta però inesplorato e per questo motivo un sistema di caratterizzazione efficiente risulta essere essenziale, non solo per identificare la diversità intervarietale sfruttabile dal miglioramento genetico, ma anche per l'individuazione di sinonimi (genotipi uguali aventi nomi diversi) e omonimi (genotipi diversi aventi lo stesso nome)[5] e per definire l'origine di molte varietà coltivate valorizzandone così i relativi prodotti e suscitando interesse nel consumatore[3].

2 BIODIVERSITÀ IN VITE

2.1 Origine ed evoluzione del patrimonio genetico della vite

La vite fa parte della famiglia delle *Vitaceae*, più precisamente del genere *Vitis*, composto da circa 60 specie fertili tra loro[6]. Le specie sono distribuite quasi esclusivamente nelle zone temperate dell'emisfero settentrionale, molte sono indigene del Nord America e Asia dell'Est e interessanti principalmente per la

produzione di portainnesti e d'ibridi resistenti alle principali fitopatie che colpiscono l'intera viticoltura mondiale[7].

Apparsa circa 65 milioni di anni fa e unica specie del genere indigena dell'Eurasia, *Vitis vinifera* L. è stata, fin da tempi remoti, soggetta alla pressione selettiva dell'uomo che ha imposto, nella forma selvatica, diversi e drastici cambiamenti quali[4]:

1. l'aumento delle rese e dimensioni di grappoli e acini;
2. l'incremento del contenuto zuccherino, tale da garantire un miglioramento dei processi fermentativi;
3. un andamento più omogeneo e stabile delle produzioni;
4. e il passaggio della vite da una pianta dioica a pianta con fiori ermafroditi.

Tali trasformazioni hanno portato alla suddivisione della specie in due sottospecie, ovvero: *Vitis vinifera* ssp. *sativa* (coltivata) e *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (selvatica).

Durante il percorso evolutivo di *Vitis vinifera* alcuni processi come l'ibridazione, le mutazioni genetiche e la propagazione vegetativa hanno giocato un ruolo fondamentale nella trasformazione della specie e nell'espansione della sua diversità genetica[8]. La propagazione vegetativa, largamente utilizzata sia nella viticoltura moderna che antica, può essere considerata però un'arma a doppio taglio in quanto, da un lato consente all'uomo di fissare nella coltura alcune caratteristiche ottimali e ricercate, ma dall'altro interrompe bruscamente l'evoluzione della specie rendendola di fatto incapace di adattarsi autonomamente a stress abiotici e biotici. Inoltre durante il processo di domesticazione, l'uomo selezionando gli individui più performanti dal punto di vista produttivo, ha scatenato un'involontaria e importante perdita tratti genetici di resistenza appartenenti a individui di vite selvatica.

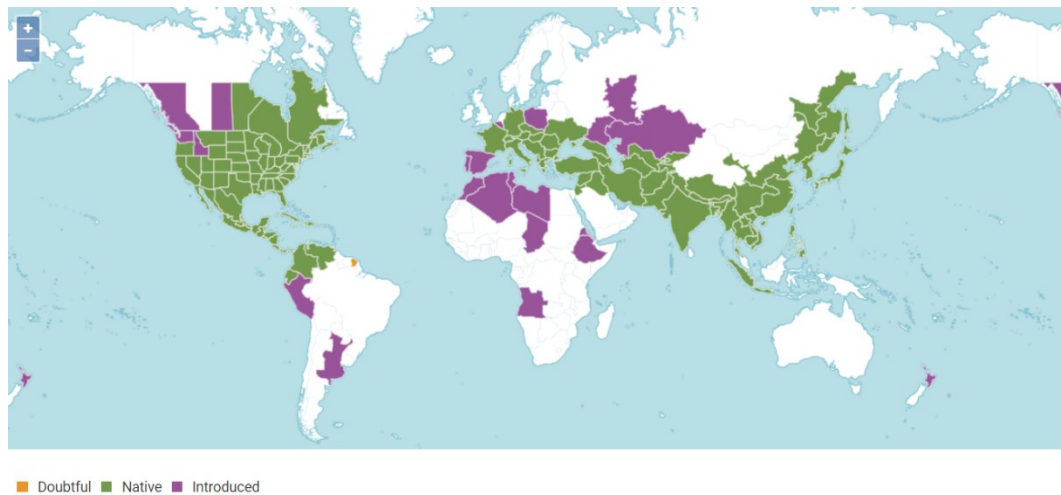


Figura 2.1 - Distribuzione geografica del genere *Vitis*[9].

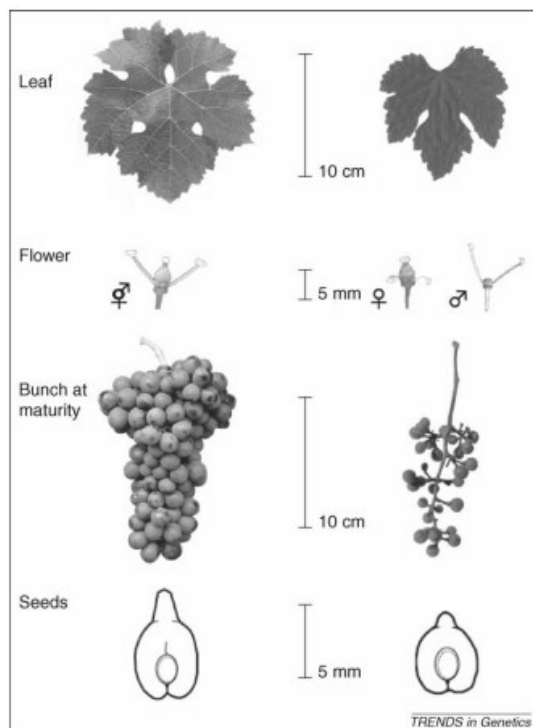


Figura 2.2 - Le principali differenze morfologiche tra vite coltivata (*ssp. sativa*) e vite selvatica (*ssp. sylvestris*)[4].



Figura 2.3 - Individuo di vite selvatica (*Vitis vinifera ssp. sylvestris*)[8].

I primi processi di domesticazione della vite selvatica sono iniziati con grande probabilità nel Vicino Oriente, nella zona compresa tra il Mar Nero e l'Iran, durante il Neolitico e tra il settimo e il quarto millennio BP[6], contemporaneamente al passaggio dell'uomo da una vita nomade a stanziale[10]. Successivamente la

viticoltura si è diffusa progressivamente fino a raggiungere, circa 5000 anni fa, le zone limitrofe della Mesopotamia e dell'Egitto, per poi espandersi nel Mediterraneo e venendo così introdotta ad alcune delle più importanti civiltà della storia come quelle dei Fenici, Assiri, Greci, Romani, Etruschi e Cartaginesi[4].

Nel VIII secolo a.C. la colonizzazione greca della parte meridionale della penisola italiana (Magna Grecia), fu un avvenimento centrale per la diffusione di *V. vinifera* in tutta la zona del Mediterraneo occidentale, ma anche per la promozione del patrimonio varietale italiano, frutto del processo d'introgresione genetica tra viti selvatiche autoctone e viti addomesticate di provenienza orientale[3].

Furono successivamente i Romani, che ereditarono le tradizioni sia della viticoltura etrusca sia di quella greca, a espandere l'areale di coltivazione della vite nelle principali aree temperate dell'Europa, spesso seguendo le principali vie commerciali; quella dei romani, inoltre, fu la prima civiltà ad assegnare diversi nomi alle varietà di vite[4].

La caduta dell'Impero romano d'Occidente, avvenuta nel 476 d.C., e la simultanea crisi agricola, che comportò un generale abbandono delle campagne, ridussero la viticoltura italiana dell'Alto Medioevo in condizioni quasi disperate. Tuttavia, grazie alla produzione di vino da parte dei monaci benedettini e cluniacensi, utilizzato sia per scopi liturgici sia come bevanda, la coltivazione della vite sopravvisse, seppur inizialmente circoscritta a piccoli spazi ben protetti[10].

Bisogna considerare però il Medioevo, nella sua interezza, come un'epoca di nuova espansione della viticoltura, coincidente con quella della Chiesa Cattolica che di fatto sostituì l'Impero romano, e di arricchimento complessivo della variabilità genetica dovuto a scambi di germoplasma di vite che avvennero durante le Crociate e l'espansione del clero verso il Nord Europa[4].

Durante il Rinascimento l'aumento nel consumo di vino, dovuto sia a un incremento demografico, sia a un maggiore potere d'acquisto delle varie classi sociali, permise una capillare diffusione dei terreni vitati sottratti alle aree boschive[11].

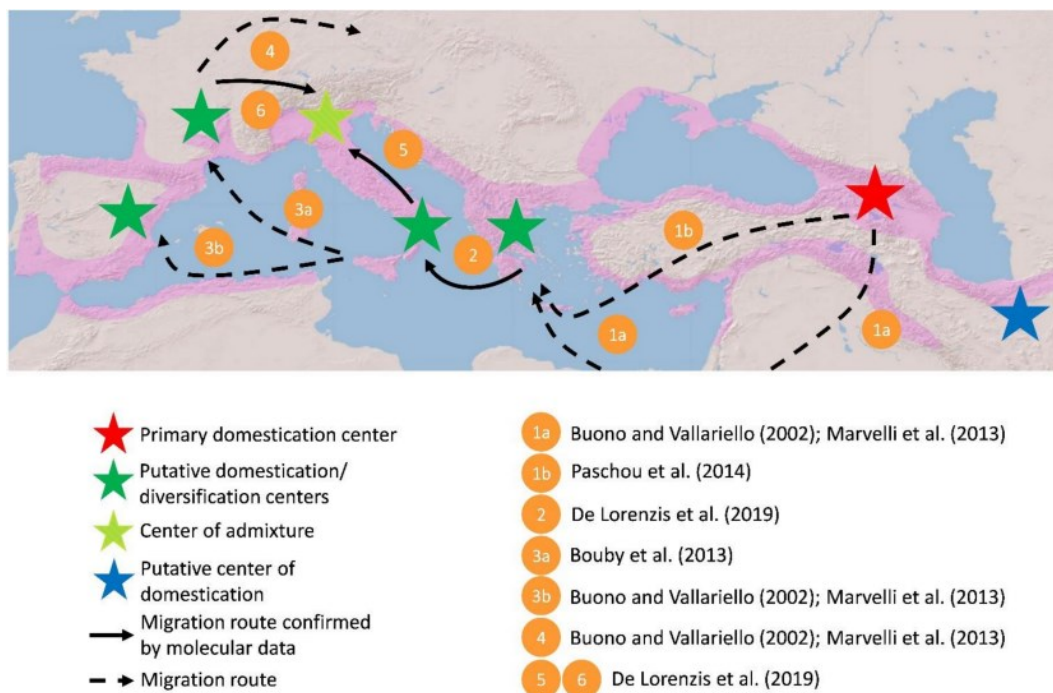


Figura 2.4 - Mappa raffigurante i probabili centri di addomesticamento e diversificazione della vite (stelle) e le principali rotte migratorie (freccie). La zona rosa scuro mostra l'areale della vite selvatica[8].

Con le scoperte geografiche, che segnarono l'inizio dell'Era Moderna (1492), *V. vinifera* colonizzò da subito le terre del Nuovo Mondo grazie alla sua introduzione da parte dei missionari europei, attraverso il trasporto nelle navi prima di semi, facili da trasportare, e poi di talee di diversa provenienza[4]. La prima regione del Nuovo Mondo colonizzata fu l'America, seguirono poi nel XIX secolo l'espansione nelle zone del Sud Africa, dell'Australia, della Nuova Zelanda e infine del Nord Africa[4].

Verso la fine del XIX secolo l'importazione di materiale vegetale d'origine americana comportò l'introduzione in Europa di agenti patogeni alloctoni, sia di origine fungine che animale, che decretando di fatto la fine di diversi millenni di espansione quasi ininterrotta della viticoltura. In particolare lo sviluppo della fillossera (*Daktulosphaira vitifoliae* F.), afide parassita, segnalato per la prima volta in Francia tra il 1867 e 1869[11], attraverso gravi ferite all'apparato radicale e la conseguente morte delle piante, mise rapidamente in ginocchio l'intera viticoltura europea portandola sul vero e proprio orlo dell'estinzione.

Proprio in questo periodo di enorme incertezza e difficoltà per la viticoltura la variabilità genetica del genere *Vitis* si rivelò di vitale importanza per la sua sopravvivenza. Attraverso l'introduzione di diverse specie di vite d'origine americana, infatti, vennero creati i primi portainnesti e ibridi interspecifici, che garantirono l'arresto del processo distruttivo della fillossera e la ripresa della viticoltura europea. Ciò nonostante, il XIX secolo si rivelò un periodo estremamente buio, nel quale una gran parte dell'enorme diversità di *V. vinifera*, sia coltivata che selvatica, venne di fatto distrutta e persa definitivamente[4].

Il processo d'erosione della biodiversità in vite non sembra però essersi arrestato. Le cause sono molteplici e di diversa natura, ma tra di esse è fondamentale sottolineare il peso [3, 4]:

1. del processo di globalizzazione delle aziende vinicole e del mercato del vino, traducibile in una domanda orientata al consumo di prodotto derivato prevalentemente da un gruppo ristretto di varietà conosciute e coltivate a livello internazionalmente, come ad esempio Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah e Chardonnay;
2. della selezione di cloni sani ed esenti da malattie, che hanno portato a una riduzione non solo del numero di cultivar ma anche di cloni;
3. dei cambiamenti climatici, che hanno danneggiato e danneggiano tutt'ora in modo particolare la viticoltura mediterranea;
4. dell'abbandono dalle campagne europee, che ha interessato il periodo compreso tra il XIX e il XX secolo.

Per interrompere questa lenta e perseverante erosione della variabilità genetica della vite, e per evitare che gran parte del patrimonio genetico resti relegato all'interno delle grandi collezioni genetiche, si rendono necessari piani europei e nazionali che mirino alla ricerca, salvaguardia e valorizzazione di questa ricchezza, costituita da genotipi profondamente legati alla storia, cultura e ambiente delle diverse aree viticole, spesso circoscritte. Tuttavia, per la riuscita di questa impresa risulta indispensabile favorire sia la fase di produzione che di consumo dei prodotti derivanti da tale risorsa attraverso programmi di sostegno efficaci per viticoltori e

vinificatori e programmi di promozione locali e internazionali, volti, invece, a richiamare l'attenzione del consumatore.

2.2 Conservazione della biodiversità viticola

Nella viticoltura moderna solo una piccola frazione dei genotipi di vite viene effettivamente coltivata per la produzione di uva e vino, basti pensare che in molti paesi come Francia, Spagna, USA, China e Argentina, solamente i 5 vitigni più coltivati coprono all'incirca la metà della superficie vitata nazionale, e che delle circa 10000 varietà di vite presenti solamente 33 rappresentano il 50% della superficie vitata globale; fortunatamente in Italia la situazione è ben diversa (figura 2.5), con una piattaforma ampelografica molto più ricca e con una più omogenea distribuzione di superficie tra vitigni[2].

Analizzando questi dati generali particolarmente preoccupanti, è possibile affermare quindi che un elevatissimo numero di genotipi di vite è relegato in una piccola superficie, spesso in continua diminuzione, e che una grossa fetta di questi è potenzialmente in via d'estinzione.

Il completo abbandono di alcune varietà di vite e la conseguente erosione genetica del patrimonio ampelografico mondiale, causato principalmente dall'introduzione di patogeni dalle Americhe (vedi fillossera, oidio, peronospora), le preferenze del mercato internazionale verso un numero ristretto di varietà, e l'irrigidimento del sistema legislativo e normativo del mondo vitivinicolo, passa prima attraverso un periodo più o meno lungo di sottoutilizzazione ed una mancata trasmissione delle varietà in questione da gli agricoltori più anziani, depositari della coltura agro-alimentare locale, e le successive generazioni[12]. Risulta quindi essere fondamentale incentivare il passaggio del patrimonio varietale locale tra le diverse generazione cercando di evitare un'omologazione generale, sia a livello produttivo che varietale, tra le diverse zone di produzione, in quanto sono proprio le differenze tra le stesse a renderle uniche e particolarmente importanti per il panorama vitivinicolo nel suo insieme.

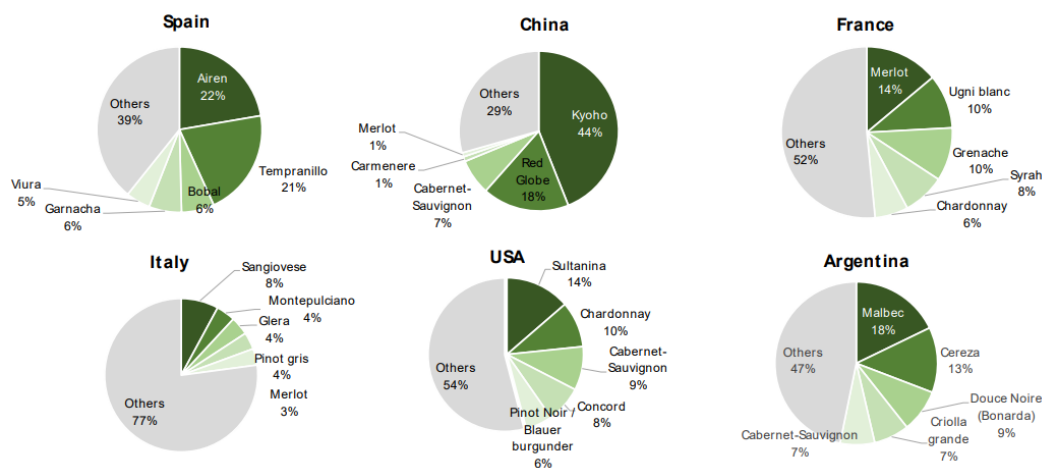


Figura 2.5 - Distribuzione delle varietà di vite più diffuse nei principali paesi vitivincoli mondiali[2].

Negli ultimi decenni tali dinamiche hanno portato la comunità mondiale a rivolgersi sull'argomento preoccupazioni crescenti, che si sono tradotte nell'esigenza di politiche internazionali e programmi di ricerca atti a valutare, utilizzare, valorizzare e conservare tutte le Risorse Genetiche Vegetali (RGV) a rischio d'estinzione, e che si sono concretizzate sostanzialmente con[12]:

- la Convenzione sulla Biodiversità (CBD), entrata in vigore nel 1994, la quale sancisce 3 punti fondamentali:
 1. le risorse genetiche passano da essere un bene ad accesso libero ad uno su cui hanno sovranità i Governi degli Stati dove esse hanno avuto origine e si trovano;
 2. la conservazione è strettamente legata all'uso sostenibile delle Risorse;
 3. l'accesso alle risorse deve essere regolato dal Previo Consenso Informato (PIC) delle comunità detentrici e di un accordo di equa ripartizione degli eventuali benefici derivanti dall'utilizzo di tali risorse.
- Il Trattato Internazionale sulle Risorse Genetiche Vegetali per l'Alimentazione e l'Agricoltura (ITPGRFA), recepito dall'Italia nel 2004 che presenta come obiettivi l'uso sostenibile delle RGV, la loro

conservazione, la giusta ed equa ripartizione dei benefici derivanti dal loro utilizzo e la creazione di un meccanismo multilaterale per favorire lo scambio e la condivisione di RGV tra Stati aderenti.

2.2.1 Le tecniche di conservazione

La salvaguardia delle risorse genetiche vegetali può avvenire secondo diverse metodologie, raggruppabili in 2 principali tecniche di conservazione[12]:

- Conservazione *ex situ*: il materiale genetico viene conservato in apposite strutture lontane dal luogo di origine, e che vengono scelte a seconda della biologia della specie. Le collezioni *ex situ* possono essere raggruppate in:
 1. Collezioni di piante in vaso, in serra o in pieno campo;
 2. Banche di semi/germoplasma;
 3. Collezioni di materiale in vitro o in crioconservazione.

Quello *ex situ* è di fatto un sistema di conservazione statico che consente di sottrarre il materiale alla pressione antropica ed ambientale, e quindi alla sua evoluzione, favorendo così il mantenimento di una diversità genetica costante nel tempo. Inoltre, tutte le risorse genetiche vegetali conservate *ex situ* devono essere gestite in modo da minimizzare i rischi di perdita di biodiversità. Tale gestione prevede un continuo e attento monitoraggio e la conservazione di duplicati del germoplasma in località diverse.

- Conservazione *in situ/on farm*: prevede il mantenimento delle popolazioni all'interno degli ambienti dove le stesse hanno evoluto le loro caratteristiche distintive. In questo caso il sistema di conservazione è dinamico in quanto le popolazioni saranno soggette alla pressione selettiva ambientale ed antropica, consentendo loro di evolvere. Qualora il materiale riguardi forme coltivate e non selvatiche, si parla di conservazione *on farm*.

È importante sottolineare che i 2 sistemi non dovrebbero essere visti come alternativi ma come azioni complementari alla protezione di una determinata specie/varietà. Tuttavia per piccole popolazioni, la conservazione *in situ/on farm*, innesca un processo evolutivo che tende verso una riduzione della diversità genetica e che quindi potrebbe portare alla loro definitiva estinzione[12].

Nel mondo vitivinicolo le varietà di vite sono sottoposte a fortissime pressioni selettive antropiche che si traducono spesso nella sostituzione di genotipi locali in favore di varietà alloctone, inducendo così una graduale riduzione in superficie di diversi genotipi di vite. L'elevato rischio d'estinzione di numerose e preziose risorse genetiche che caratterizza la viticoltura odierna obbliga al ricorso del sistema *ex situ* come strumento per la corretta conservazione e salvaguardia delle diverse specie, varietà e cloni di vite. In particolare, il sistema più diffuso e importante è quello della conservazione delle viti in pieno campo che consente anche di eseguire la caratterizzazione ampelografica e la valutazione della produzione e degli stadi fenologici di ogni singolo individuo presente. Un'altra tecnica utilizzata per la salvaguardia delle vite, anche se meno diffusa, è quella condotta in vitro, dove il materiale vegetale viene mantenuto in ambiente controllato e in condizioni di sterilità[13]. Questo sistema non consente di valutare le caratteristiche morfologiche, produttive e fenologiche del materiale, e richiede comunque un certo livello tecnologico ed elevati costi di manutenzione. Tuttavia, grazie alla possibilità di conservare un elevato numero di accessioni in spazi ridotti e di ridurre l'incidenza di attacchi patogeni, condizioni ambientali avverse e pressioni antropiche, questo sistema ha visto, soprattutto negli ultimi anni, una discreta espansione che può rivelarsi particolarmente utile nella conservazione dei duplicati di collezioni in pieno campo[13].



Figura 2.6 - Sistema di conservazione *ex situ* della vite in pieno campo situato in Puglia[62].



Figura 2.7 - Fase iniziale di micropropagazione della vite in vitro[13].

2.2.2 La collezione del CREA

Questo paragrafo fa riferimento all'articolo scientifico: "The Vitis Germplasm Repository at the CRA-VIT, Conegliano (Italy): Conservation, Characterization and Valorisation of Grapevine Genetic Resources" (M. Gardiman, L. Bavaresco)[14].

Fondata nel 1923 a Conegliano (TV) e ampliata negli anni da costanti attività d'aggiornamento e ampliamento in seguito a numerose ricerche condotte in diverse aree di coltivazione, e da scambi di materiale con altri istituti, sia nazionali che internazionali, la collezione del CREA viene considerata attualmente uno dei centri di conservazione del germoplasma viticolo più importanti al mondo, nonché punto di riferimento a livello nazionale. Oggigiorno la collezione prevede il mantenimento di più di 3600 accessioni appartenenti a 20 specie del genere *Vitis* e derivanti da ben 45 paesi differenti, di cui l'Italia è la zona d'origine più rappresentata (42%). Tuttavia questi numeri devono essere considerati piuttosto dinamici, in quanto all'interno della collezione sono previste continue oscillazioni in seguito all'introduzione e alla rimozione di diversi genotipi.

Per quanto riguarda la vite il sistema di conservazione generalmente adottato è quello *ex situ*, dove il materiale viene disposto in vigneti dedicati, nei quali viene mantenuto un numero minimo di ceppi per ogni accessione (in genere 5). Inoltre parte del germoplasma della collezione viene mantenuto all'interno di serre, ed un piccolo numero di accessioni è stato duplicato e conservato *in vitro*. È importante sottolineare che la collezione nella sua interezza è ramificata in sotto-collezioni localizzate in diverse aziende sperimentali del centro di ricerca, come il vigneto a Susegana (TV), cuore centrale della collezione e "campo catalogo" del Registro Nazionale delle Varietà di Vite, conservato e aggiornato dal CREA, sotto affidamento da parte del MIPAF, il vigneto a Spresiano (TV), dove vengono mantenute cultivar minoritarie, e quello situato a Montelibretti (Roma), dove vengono mantenute le accessioni presenti nel vigneto di Susegana come duplicati di sicurezza.

Per garantire un'efficiente gestione di un numero elevato di genotipi ed assicurare il loro mantenimento a lungo termine e le diverse attività di ricerca ad essi applicate,

è necessario identificare correttamente ogni singola accessione, che avviene attraverso:

1. la compilazione del “passport data” (comprendente informazione basilari come la provenienza, il donatore, il pedigree ecc.);
2. la caratterizzazione ampelografica dell’accessione, dove vengono misurati e descritti caratteri altamente ereditari e capaci di essere espressi in ambienti differenti, riguardanti principalmente le differenze morfologiche di foglie e grappoli;
3. analisi genomiche con l’utilizzo di marcatori molecolari.

In passato la caratterizzazione ampelografica è stata l’unica risorsa applicabile per l’identificazione dei singoli genotipi e, sebbene essa sia piuttosto affidabile e replicabile, necessita di operatori esperti e lunghi tempi d’analisi. Attualmente tutte le accessioni vengono analizzate anche a livello genomico attraverso l’utilizzo di almeno 11 microsatelliti (SSR) in grado di evidenziare all’interno della collezione la presenza di omonimi, sinonimi e di nome erroneamente assegnati, favorendo in tal modo una migliore organizzazione e sistemazione della collezione stessa.

L’importanza di una collezione genetica di grandi dimensioni come quella del CREA non si esplica soltanto nell’azione di salvaguardia e gestione di un numero elevatissimo di genotipi differenti, ma anche in altre attività secondarie orientate principalmente alla ricerca scientifica, che contribuiscono di fatto all’ampliamento e miglioramento delle conoscenze tecniche applicabili in campo nazionale ed internazionale. Tra le funzioni secondarie più importanti della collezione del CREA si annoverano:

- la costituzione di una preziosa fonte di geni potenzialmente utili nei programmi di miglioramento genetico della vite;
- la possibilità l’esecuzione di studi comparativi relativi alla resistenza agli stress biotici/abiotici e di modelli fenologici delle varie cultivar, attuabile grazie al raggruppamento di un elevato numero di genotipi all’interno di una singola area circoscritta;

- l'individuazione di omonimi e sinonimi e d'informazioni relative all'origine e ai parietali dei vari genotipi, rilevabili principalmente tramite l'utilizzo di marcatori molecolari.

3 CARATTERIZZAZIONE DEI VITIGNI

Identificare in modo preciso ed accurato un vitigno ed associarlo ad un determinato genotipo, rappresenta un elemento essenziale per la filiera vitivinicola moderna, in quanto ne derivano aspetti normativi, commerciali e culturali d'estrema importanza. Di minor rilievo, anche se comunque fondamentali, sono le identificazioni dei cloni, per l'acquisto di barbatelle certificate dai vivaisti, e dei portainnesti, che diventano particolarmente importanti qualora il terreno del nuovo impianto presenti caratteristiche limitanti (come ad esempio: sale, calcare, siccità o ristagni idrici frequenti)[15].

I metodi e le tecnologie idonee al riconoscimento di un'identità genetica sono numerose, e negli ultimi anni tendono ad essere sempre più affidabili e accurate, specialmente per i vitigni e portainnesti (meno per i cloni), dove, oltre alla tradizionale caratterizzazione ampelografica, che si basa prettamente su osservazioni di tipo morfologico, e la più recente caratterizzazione molecolare, basata invece sull'utilizzo di microsatelliti, si sono aggiunte negli anni altre metodologie strumentali alternative e minoritarie, come[15]:

- l'ampelometria;
- l'analisi di alcuni metaboliti secondari dell'uva;
- l'analisi elettroforetica di sistemi isoenzimatici;
- La spettrometria di massa per electrospray di proteine PR dell'uva.

3.1 Caratterizzazione ampelografica classica

Per un lunghissimo periodo di tempo l'unico metodo adatto alla descrizione e identificazione varietale e clonale della vite è stata la caratterizzazione ampelografica tradizionale, ovvero quella disciplina che si basa sull'osservazione e la valutazione dei descrittori ampelografici discriminanti, generalmente rilevati a

livello visivo. I caratteri della pianta che vengono analizzati possono essere suddivisi in[16]:

- qualitativi: caratteri che presentano livelli d'espressione discontinui e discreti;
- quantitativi: caratteri che presentano livelli d'espressione continui;
- alternativi: caratteri che possono essere presenti oppure assenti.

La numerosità delle varietà di vite esistenti, da descrivere o individuare, e l'elevato potere discriminante di alcuni caratteri morfologici utilizzati per i loro riconoscimento, hanno stimolato la cooperazione internazionale tra OIV, UPOV e IPGRI (oggi Biodiversity International) volta ad individuare alcuni descrittori comuni, presentati per la prima volta nel 1983 all'interno "Codice dei caratteri descrittivi delle varietà e delle specie di *Vitis*"[17]. Nel 2009, una seconda edizione del Codice ha introdotto diverse migliorie e innovazioni volte ad uniformare le modalità di rilevazione dei caratteri e, attraverso l'adozione di un linguaggio comune, a rendere più facilmente confrontabili le diverse descrizioni[16]. Ciò ha segnato il passaggio da una descrizione ampelografica di tipo verbale a numerica, dove ogni carattere viene individuato da un codice e dal suo relativo livello d'espressione, traducendosi in una più efficiente gestione informatica ed una semplificazione delle operazioni relative al confronto e all'archiviazione dei dati[16].

La lista conta attualmente 151 descrittori, dove sono compresi anche alcuni caratteri atti a fornire informazioni e valutazioni utili riguardanti le attitudini agronomiche e tecnologiche dei genotipi in questione[17]. Per una descrizione rapida e precisa delle varietà di vite è stata proposta, dal Genres 96 No 81, una cosiddetta "lista prioritaria di descrittori primari" comprendente 14 descrittori caratterizzati da un buon potere discriminante e, per la maggior parte di essi, da una facile rilevazione[18]. Un altro gruppo di descrittori, definiti come "accessori", vengono invece impiegati per una maggiore precisione e completezza nella caratterizzazione, utili in particolare nella definizione della variabilità intra-varietale[17]. Inoltre, nel caso delle collezioni di germoplasma risulta utile

aggiungere alla descrizione delle varietà alcune informazioni complementari costituenti il “Multicrop Passport Descriptor List”[18].

Codice OIV	Descrittore
OIV 001	Giovane germoglio: apertura dell'apice
OIV 004	Giovane germoglio: densità di peli striscianti dell'apice
OIV 016	Germoglio: numero di viticci consecutivi
OIV 051	Foglia giovane: colore della pagina superiore del lembo (4 ^a foglia)
OIV 067	Foglia adulta: forma del lembo
OIV 068	Foglia adulta: numero dei lobi
OIV 070	Foglia adulta: distribuzione della pigmentazione antocianica sulle nervature principali della pagina superiore del lembo
OIV 076	Foglia adulta: forma dei denti
OIV 079	Foglia adulta: grado di apertura / sovrapposizione del seno peziolare
OIV 081-2	Foglia adulta: base del seno peziolare delimitata dalle nervature
OIV 084	Foglia adulta: densità dei peli striscianti tra le nervature principali sulla pagina inferiore del lembo
OIV 087	Foglia adulta: densità dei peli eretti sulle nervature principali della pagina inferiore
OIV 223	Acino: forma
OIV 225	Acino: colore della buccia

Figura 3.1 - Lista dei 14 descrittori "prioritari"[17].

Codice OIV	Descrittore
OIV 003	Giovane germoglio: intensità della pigmentazione antocianica dei peli striscianti dell'apice
OIV 082	Foglia adulta: grado di apertura/sovrapposizione dei seni laterali superiori
OIV 083-1	Foglia adulta: forma della base dei seni laterali superiori
OIV 093	Foglia adulta: lunghezza del picciolo in rapporto alla lunghezza della nervatura mediana
OIV 209	Grappolo: numero di ali del grappolo principale
OIV 227	Acino: quantità di pruina
OIV 235	Acino: consistenza della polpa

Figura 3.2 - Lista dei descrittori "accessori"[17].

È importante sottolineare che nella caratterizzazione ampelografica non tutti gli organi della pianta presentano lo stesso peso e importanza, infatti il germoglio, le

foglie adulte, i grappoli e gli acini, poiché sono in grado di manifestare caratteristiche peculiari a seconda dei diversi genotipi, risultano essere particolarmente informativi e discriminanti[17].

Il ruolo dell'ampelografia però non si limita soltanto al riconoscimento delle varietà di vite già conosciute, ma anche alla descrizione di quelle nuove, che viene eseguita attraverso la compilazione della scheda ampelografica con una serie d'informazioni precedentemente raccolte dalle osservazioni relative ad un determinato fenotipo, ovvero[15]:

- materiale fotografico;
- informazioni storiche e geografiche;
- descrizione dei caratteri morfologici (germoglio, grappolo, acino, foglia; vinaccioli, ecc.);
- descrizione delle caratteristiche fenologiche (germogliamento, maturazione, ecc.);
- descrizione delle attitudini agronomiche (resistenze a stress biotici e abiotici);
- descrizione delle attitudini tecnologiche (grado zuccherino, pH, ecc.).

Nonostante la caratterizzazione ampelografica tradizionale sia ancora uno strumento di fondamentale importanza per l'identificazione e la descrizione delle varie cultivar e rappresenti una valida risorsa per la definizione della variabilità inter-varietale, utile nella discriminazione dei vari cloni, questa ha mostrato, nel corso del tempo, diversi aspetti limitanti. Tra le principali limitazioni dell'ampelografia classica si ricorda la forte influenza dell'ambiente e dello stato sanitario e nutrizionale sul fenotipo delle piante, l'estrema difficoltà nell'operare l'identificazione di un elevatissimo numero di vitigni con le sole caratteristiche morfologiche[19], e la necessità della figura dell'ampelografo, operatore estremamente preparato e specializzato sull'argomento, che oggi risulta essere sempre più difficile da reperire. Con lo scopo di evitare la scomparsa di questa figura professionale e della sua abilità nel riconoscere le diverse varietà attraverso l'utilizzo della vista, olfatto, tatto e gusto, l'OIV ha dato inizio, nel 2021, all'organizzazione di corsi

internazionali di ampelografia atti alla formazione e all'addestramento di esperti del settore vitivinicolo[15].



1 Grenache N. 3 Sangiovese N. 5 Barbera N. 7 Riesling B. 9 *V. amurensis*

Figura 3.3 – Differenze morfologiche relative alla forma della foglia adulta tra varietà e specie diverse[17].

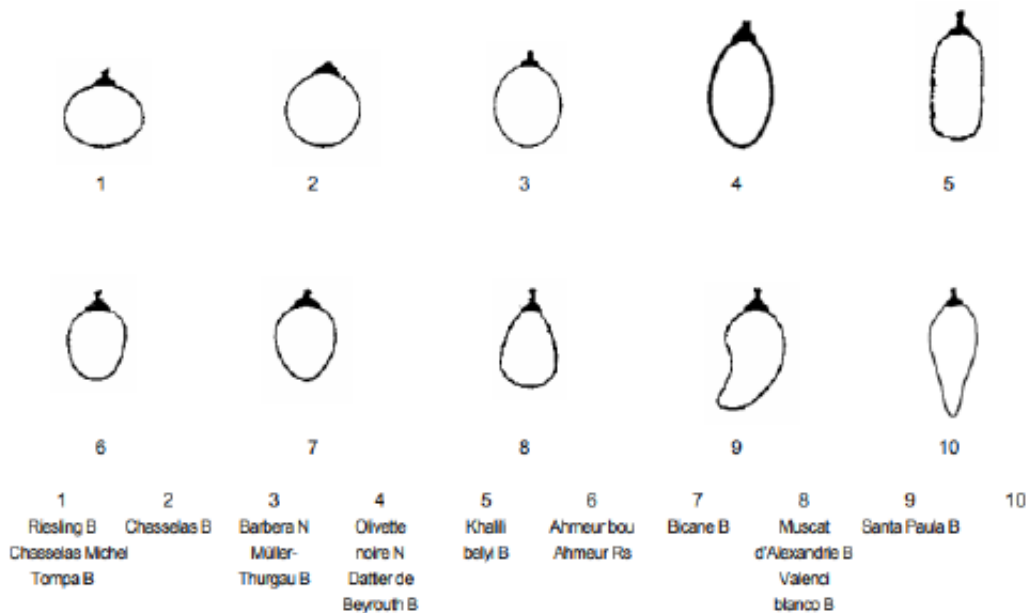


Figura 3.4 - Differenze morfologiche relative alla forma dell'acino tra diverse varietà di vite europea[18].

3.2 Caratterizzazione molecolare

A causa della forte influenza dello stato sanitario e nutrizionale, del portainnesto e ambiente sul fenotipo, oltre alla limitazione nell'esecuzione delle osservazioni morfologiche all'interno della finestra di tempo delimitata dal periodo vegetativo, la comunità scientifica ha ritenuto necessario sviluppare una metodologia basata strumenti diagnostici che andassero a rendere più rapida ed efficiente la caratterizzazione ampelografica. Tale traguardo è stato raggiunto attraverso il notevole sviluppo delle tecniche di biologia molecolare e, in particolar modo,

attraverso l'impiego dei marcatori molecolari [20] individuabili in qualsiasi tessuto vegetale delle piante e senza alcun limite temporale. Oltre ad una più efficiente e veloce identificazione varietale, l'introduzione di questi strumenti ha consentito negli ultimi tempi la ricostruzione del pedigree di numerosi vitigni e l'individuazione di altrettanti omonimi e sinonimi tra gli stessi. Malgrado la modernizzazione del processo di caratterizzazione ampelografica, l'analisi della variabilità intra-varietale risulta essere ancora oggi particolarmente difficoltosa[21].

Per marcatore molecolare si intende un locus genomico, rilevabile attraverso tecniche di biologia molecolare, che a causa della sua presenza, contraddistingue in modo univoco il tratto cromosomico con il quale si identifica e le regioni alle sue estremità[22]. A causa di mutazioni genetiche ereditabili che si sono accumulate nel corso dei secoli, queste sequenze di DNA presentano un livello di polimorfismo, ovvero numero di varianti alleliche tra gli individui, più o meno ampio. È proprio il polimorfismo che caratterizza alcune sequenze del genoma a fornire le informazioni richieste per la corretta distinzione di genotipi di vite differenti.

Idealmente un marcatore molecolare dovrebbe essere: co-dominante (in grado cioè di distinguere organismi omozigoti ed eterozigoti), stabile, altamente riproducibile, frequente e uniforme su tutto il genoma, non influenzabile dall'ambiente, facile da monitorare, altamente polimorfico, automatizzabile ed economico. Nonostante il marcatore molecolare ideale non esista, è comunque disponibile una rosa piuttosto ampia di marcatori molecolari diversi tra loro che possono essere suddivisi in[23]:

1. marcatori a singolo-locus (es: RFLP, SSR E SNP): sono marcatori co-dominanti che permettono di riconoscere i loci omozigoti da quelli eterozigoti. Prevedono l'impiego di sonde o primer specifici per determinati loci;
2. marcatori multi-locus (es: RAPD, I-SSR, AFLP): sono marcatori dominanti e non consentono di discriminare omozigoti ed eterozigoti. L'utilizzo di questi marcatori molecolari prevede l'analisi simultanea di numerosi loci genomici tramite l'amplificazione di tratti cromosomici casuali e l'impiego di primer a sequenza nota arbitraria.

È importante evidenziare che ciò che differenzia i diversi marcatori non sono solamente le caratteristiche intrinseche degli stessi, ma anche le tecniche di biologia molecolare che vengono applicate per il loro ottenimento. Le più diffuse sono:

- ibridazione molecolare (*Southern blot*);
- amplificazione del DNA (PCR);
- approcci misti (prevedono una digestione enzimatica ed una amplificazione del DNA);
- sequenziamento (Sanger o *next generation*).

Nonostante le numerose tecnologie genetiche disponibili, i microsatelliti, marcatori molecolari conosciuti anche col nome di “*simple sequence repeats*” (SSRs), risultano essere il principale strumento diagnostico impiegato per l’identificazione varietale della vite. Tuttavia, negli ultimi anni, benchè i microsatelliti restino di gran lunga i marcatori molecolari più utilizzati, la ricerca scientifica ha rivolto particolare attenzione allo studio dei polimorfismi a singolo nucleotide, chiamati anche “*single nucleotide polymorphisms*” (SNPs), che sembrano rappresentare un valido strumento diagnostico ancora non pienamente sfruttato.

3.2.1 Simple Sequence Repeats

I microsatelliti, o “*simple sequence repeats*” (SSRs), sono ripetizioni a tandem, di una sequenza costituita da un numero limitato di nucleotidi compreso tra 1 e 6. In genere il numero di ripetizioni è compreso tra 5 e 100, mentre le sequenze target relative allo sviluppo di marcatori molecolari risultano tendenzialmente composte da due, tre o quattro nucleotidi[24].

Introdotti nel 1993, nell’arco di tempo di poco più 10 anni di sperimentazione, i microsatelliti si sono affermati come i marcatori molecolari più popolari nell’identificazione varietale della vite a livello internazionale[25]. Questo successo è dovuto principalmente alla combinazione tra la loro natura co-dominante, l’elevato polimorfismo e una buona riproducibilità[26].

A causa della loro struttura i microsatelliti sono spesso soggetti a mutazioni, causate generalmente da errori della DNA polimerasi, che scaturiscono sottrazioni o

addizioni nel numero di ripetizioni della sequenza[27]. Questo fenomeno determina quindi l'elevato polimorfismo di questi marcatori molecolari sfruttabile per distinguere individui diversi all'interno di una popolazione più o meno ampia.

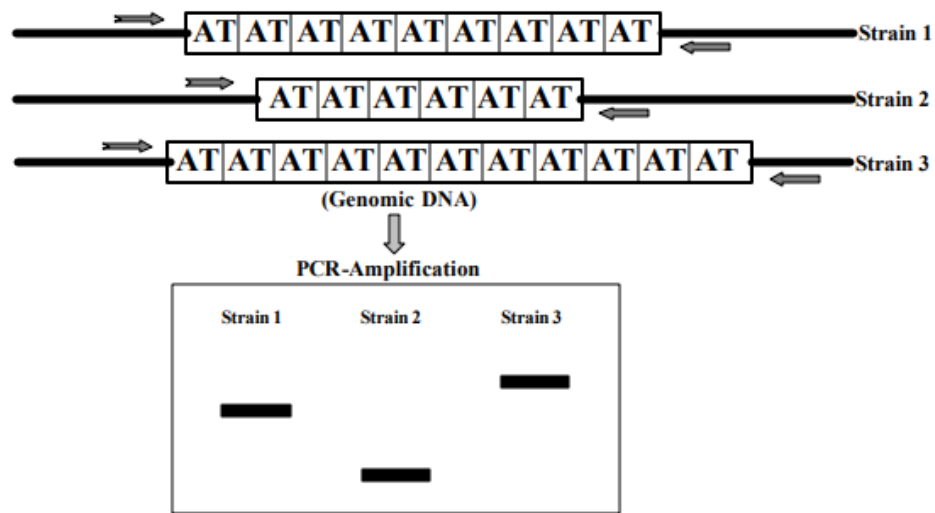
All'interno del genoma degli organismi eucarioti, distribuiti sia su regioni codificanti che non, si stima che siano compresi tra i 10^4 e 10^5 microsatelliti, i quali rappresentano una fonte quasi illimitata di siti polimorfici potenzialmente utilizzabili come marcatori molecolari[28]. Anni di ricerca hanno consentito alla comunità scientifica internazionale d'individuare un set di 9 microsatelliti altamente informativi impiegabili per un'efficiente distinzione varietale: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 and VrZAG79[29]. Attraverso l'impiego di questi strumenti diagnostici la probabilità che due vitigni differenti condividano per caso lo stesso profilo molecolare è prossima a zero[25].

La genotipizzazione, o *genotyping*, è il processo che permette d'identificare quali varianti genetiche un individuo possiede[30]. Per quanto riguarda i microsatelliti è richiesto determinare il numero di ripetizioni di un dato locus in una data cultivar[28]. Tale obiettivo viene raggiunto attraverso l'esecuzione di più fasi:

1. estrazione del DNA dalla pianta: qualora siano presenti, le foglie giovani rappresentano la fonte di DNA che consente la migliore resa quantitativa[31]. In alternativa il materiale genetico può essere estratto da altri organi della pianta come legno e grappoli, tuttavia queste soluzioni risultano essere più dispendiose in termini di tempo e risorse[31];
2. amplificazione del DNA tramite PCR (*Polymerase Chain Reaction*): tecnica di biologia molecolare molto diffusa che consente di moltiplicare selettivamente uno specifico locus genetico d'interesse tramite l'utilizzo di nucleotidi liberi, primer specifici e dell'enzima DNA polimerasi. Per disegnare una coppia di primer risulta essere necessario conoscere le sequenze fiancheggianti, iniziali e terminali, dei microsatelliti, che sono generalmente conservate all'interno di una specie[23]. Attraverso la PCR, partendo anche da una singola molecola di DNA stampo, è possibile ottenere un numero elevatissimo di frammenti di DNA uguali tra loro in un

intervallo limitato di tempo. Inoltre grazie a questa tecnica è possibile amplificare e analizzare piccole quantità di DNA derivate dai tessuti della pianta contenuti all'interno di mosti e vini[28];

3. elettroforesi: tecnica di biologia molecolare che sfrutta un campo elettrico per separare frammenti di DNA o RNA in base alla loro carica e dimensione. La distanza percorsa dai frammenti è inversamente proporzionale alla loro dimensione, per cui le sequenze più piccole migrano più velocemente rispetto a quelle più grandi. Inizialmente, per l'individuazione del polimorfismo, questa tecnica prevedeva l'utilizzo di un sottile strato di gel di poliacrilammide denaturato dove i frammenti venivano visualizzati per mezzo di nucleotidi radioattivi, primer marcati radioattivamente oppure, in laboratori sprovvisti di *hot rooms*, attraverso protocolli per la colorazione argentea[24]. Oggigiorno i sistemi basati su gel sono stati sostituiti da sistemi automatizzabili che prevedono la separazione dei frammenti tramite elettroforesi capillare[24]. Questo sistema, utilizzato sia per il dimensionamento allelico che per il sequenziamento Sanger, prevede il movimento del materiale genetico all'interno di sottilissimi capillari grazie alla creazione di un campo elettrico. Come avveniva per i gel, i frammenti di DNA più piccoli risultano avere una maggiore velocità rispetto a quelli di maggiori dimensioni. Nella parte terminale del capillare i frammenti in movimento vengono colpiti da una luce laser responsabile dell'eccitamento delle molecole di fluorocromi legati agli amplificati di DNA. Queste particolari molecole, dopo aver assorbito l'energia dal laser, sono in grado di riemetterla ad una lunghezza d'onda specifica per ogni fluorocromo, che viene rilevata da una cellula fotoelettrica. Infine, le informazioni raccolte durante il processo sono rielaborate da specifici software per la creazione dell'elettroferogramma, il quale viene analizzato per confrontare gli individui oggetto di studio.



(Gel analysis on high-resolution metaphor agarose gels/denaturing polyacrylamide gels)

Figura 3.5 – Rappresentazione grafica dei microsatelliti (SSR) e del loro processo di genotyping[32].

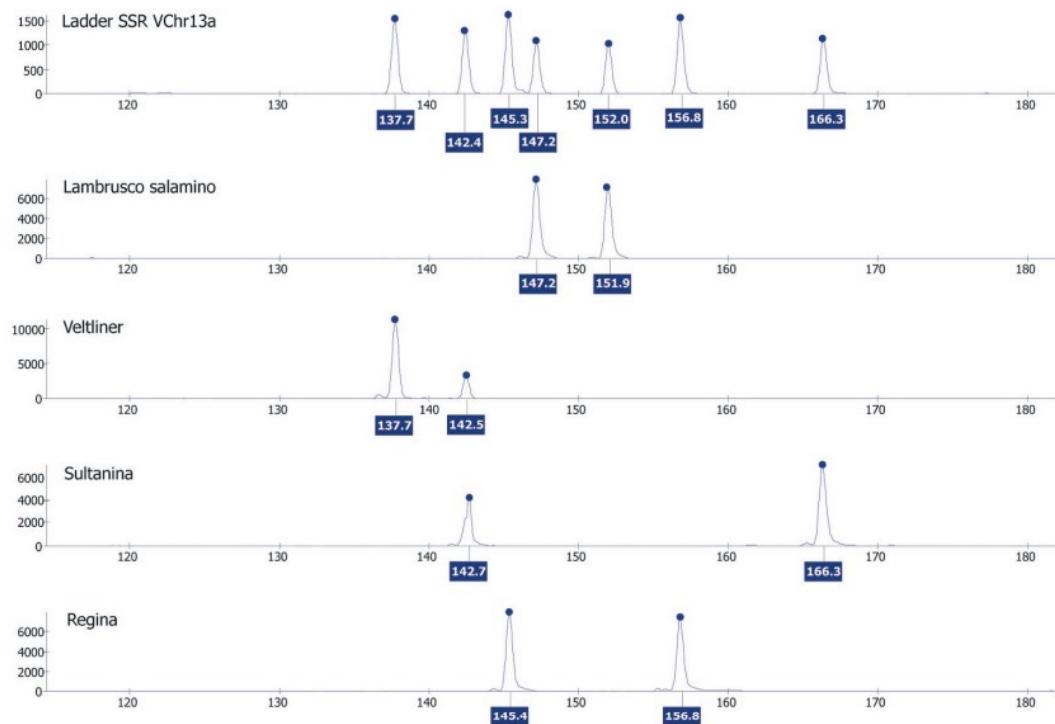


Figura 3.6 - Elettroferogrammi, relativi all'SSR "VChr13a", evidenzianti le differenze genetiche che intercorrono tra genotipi di vite differenti[33]. Sull'asse delle ascisse viene riportata la lunghezza degli alleli (espressa in pb), mentre sull'asse delle ordinate viene riportata l'intensità delle emissioni luminose.

3.2.2 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

I polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), sono il tipo di polimorfismi più comuni all'interno delle sequenze di DNA[34] e rappresentano la base molecolare responsabile della maggior parte delle differenze tra individui[22]. Essi corrispondono a una variazione originata dall'alterazione di un singolo nucleotide all'interno di una sequenza di DNA[35]. Tale alterazione deve essere presente in almeno l'1% della popolazione[35]. L'abbondanza che li caratterizza e la relativa facilità con la quale possono essere individuati rendono questi polimorfismi ottimi strumenti per la misurazione della variabilità genetica di diversi organismi. Inoltre gli SNPs che si trovano all'interno di regioni codificanti del genoma di un organismo possono portare ad alterazioni dei prodotti genici derivanti, rendendoli di fatto marcatori funzionali. Negli ultimi anni tali proprietà hanno portato la comunità scientifica ad impiegare numerose risorse per lo studio di questi marcatori molecolari. I dati ricavati dagli studi effettuati sul genoma di *Vitis vinifera* mostrano la presenza di un SNP ogni circa 47 paia di basi (pb)[36], e che quasi la totalità di questi sono biallelici[34].

Il minor polimorfismo, e quindi il minor contenuto informativo, rispetto ai marcatori SSR viene comunque bilanciato dal fatto che gli SNPs risultano essere significativamente più diffusi e frequenti all'interno del genoma[37]. È stato stimato che per raggiungere la stessa valenza informativa dei 9 canonici SSRs sia necessario un set di 40 SNPs ben distribuiti nei 19 cromosomi della vite e aventi un MAF (*Minor Allele Frequency*) vicino a 0.5[36].

Anche se al momento l'utilizzo di microsatelliti risulta essere il metodo più efficiente per l'identificazione varietale, diversi gruppi di ricerca sono stati in grado di genotipizzare con successo diverse centinaia di cultivar attraverso l'utilizzo di un set di 48 SNPs[36], il quale ha costituito la prima vera alternativa ai microsatelliti negli studi genetici della vite[38]. Inoltre, l'enorme mole di dati genetici raccolti durante il sequenziamento d'interi genomi tramite NGS (*New Generation Sequencing*), ha consentito, durante il progetto europeo GrapeReSeq[39], lo sviluppo di un array composto da 18775 SNPs (*Vitis18kSNP*), rappresentante una valida soluzione per un'efficiente genotipizzazione della vite[40].

AGTTGCACC
TCAACGTGG

Genotipo Comune (<99%)

AGTTACACC
TCAATGTGG

Genotipo Alternativo (>1%)

Figura 3.7 - Rappresentazione grafica di un "single nucleotide polymorphism" (SNP).

3.2.3 Confronto tra SSRs e SNPs

In seguito alla rapida diffusione nell'utilizzo di SNPs, agevolata da un forte sviluppo delle tecnologie biomolecolari, negli ultimi anni, numerosi gruppi di ricerca hanno confrontato tra loro SSRs e SNPs cercando di formulare previsioni riguardanti il loro futuro impiego.

Come anticipato precedentemente l'utilizzo dei microsatelliti rappresenta il principale strumento per la caratterizzazione della variabilità genetica e per le analisi di parentela della vite[37]. Ad ogni modo anche questi marcatori molecolari negli anni hanno mostrato i loro limiti, primo tra tutti la loro scarsa efficacia e supporto all'identificazione e selezione clonale[41]. Inoltre, con l'impiego dei microsatelliti, differenti strumenti analitici utilizzati dai diversi laboratori possono portare a differenze relative alle dimensioni degli alleli stessi[37]. Queste variazioni tecniche richiedono un'attenta e precisa calibrazione tra i laboratori [36] e standardizzazione dei dati rilevati[40]. Contrariamente gli SNPs, poiché distinti dalla presenza di un nucleotide in una determinata posizione di sequenza, risultano fornire dati ben più facili da trasferire e confrontare[36]. Inoltre l'enorme disponibilità di questi marcatori rispetto agli SSRs comportano un maggiore punteggio di LOD (*Logarithm Of the Odds*) risultante nella possibilità di distinguere *full-sibling* da relazioni di secondo grado[36]. Tuttavia, una serie di fattori ha limitato fortemente la diffusione di questi marcatori molecolari. Tra questi è necessario evidenziare il loro maggior costo, soprattutto quando si tratta di analizzare piccoli campioni (come spesso accade nell'identificazione varietale), e l'assenza di database (già disponibili per SSRs) che si rivelano indispensabili per il confronto tra i dati raccolti a livello internazionale[36].

In definitiva si può affermare che il successo degli SNPs come strumento sostitutivo dei microsatelliti nelle analisi genetiche della vite dipende in larga parte dalla capacità delle nuove tecnologie nell'abbattere i costi relativi alla genotipizzazione e la mobilitazione a livello mondiale necessaria al continuo sviluppo e ampliamento dei database[36].

Tabella 3.1 - Confronto tra i set di SNP [37] e SSR [29] raccomandati per un'identificazione varietale di routine[38]. Osservando i valori di PIC (polymorphic information content) è possibile affermare che un SSR è in media circa 2,5 volte più informativo di un SNP. Tuttavia i valori del P(ID) (probability of identity) cumulativo risulta migliore per il set di SNPs[38].

Marker Type	N loci	N	MD	A	N _a	H _o	H _e	PIC	cum P(ID) _{unrelated}	cum P(ID) _{sib}
SSR	9*	127	0	92	10.22	0.84	0.79	0.76	4.07×10^{-11}	1.44×10^{-04}
SNP	45	124	0.02%	90	2	0.416	0.39	0.31	4.57×10^{-16}	1.00×10^{-08}

* set of nine recommended SSR loci [7]. N = number of observed accessions, MD = missing data, A = total number of amplified alleles, N_a = average number of alleles per locus, H_o = observed heterozygosity, H_e = expected heterozygosity, PIC = polymorphic information content, P(ID) probability of identity = unrelated and sib.

4 IL MIGLIORAMENTO GENETICO DELLA VITE

La domesticazione di *Vitis vinifera*, risalente circa alle origini dell'agricoltura stessa, ha plasmato, nel corso dei millenni, l'enorme variabilità genetica della vite andando a differenziare un numero enorme di varietà differenti tra loro[42]. Ciò nonostante numerosi studiosi e appassionati hanno intrapreso il processo di miglioramento genetico, ossia quell'attività che prevede l'incrocio (*breeding*) tra genotipi differenti con l'intento di ottenerne uno "nuovo" migliore e diverso rispetto ai "vecchi"[42]. In realtà gli obiettivi del miglioramento genetico sono più complessi e possono essere articolati in[42]:

1. selezione clonale: attività che consente di fornire al mercato viticolo materiale omogeneo ed esente dalle principali malattie (causate da virus, batteri e fitoplasmi) capaci di compromettere la produzione sia sotto l'aspetto quantitativo che qualitativo[43];
2. ottenimento di nuovi vitigni: in base al materiale utilizzato per l'ottenimento di nuovi vitigni questa attività può essere distinta in:

- incrocio intraspecifico: l'unione tra individui appartenenti alla stessa specie, in genere *Vitis vinifera*. L'obiettivo di questi incroci è generalmente il miglioramento delle caratteristiche fenologiche dei nuovi genotipi. Negli anni numerosi incroci di vite europea sono stati creati e adattati a particolari "terroir" ed alcuni di essi risultano particolarmente diffusi e importanti come: Manzoni bianco, Muller-Thurgau e Kerner, per la produzione di vino, e Italia, Victoria, Matilde e Red Globe, per la produzione di uva da tavola;
 - incrocio interspecifico: l'unione tra individui appartenenti a specie diverse. In questo caso l'ottenimento di nuovi genotipi è in genere finalizzato all'incremento del livello di resistenza verso le avversità biotiche e/o abiotiche. In particolare, l'ibridazione tra *Vitis vinifera* con specie provenienti dall'estremo oriente permette di ottenere individui resistenti al freddo, mentre, le specie americane vengono impiegate per l'ottenimento di genotipi resistenti alle principali crittogame (come peronospora e oidio). Questo ultimo processo di breeding, introdotto in Europa alla fine del 1800, ha inizialmente fornito ibridi resistenti alle principali malattie fungine ma allo stesso tempo scadenti sotto il punto di vista qualitativo; aspetto che è stato migliorato gradualmente nel corso del tempo mediante continua attività d'incrocio;
3. ottenimento di nuovi portainnesti: oggi giorno quasi la totalità della viticoltura mondiale utilizza il portainnesto, il quale consente principalmente di contrastare la fillossera, regolare la vigoria della pianta e di adattarla ai diversi terreni. L'ottenimento di nuovi portainnesti passa tradizionalmente attraverso un processo d'incrocio tra specie di vite differenti. In questo caso, poiché la vite deve resistere la pressione della fillossera, le specie di vite più importanti impiegate negli incroci sono quelle americane (*Vitis berlandieri*, *Vitis rupestris* e *Vitis riparia*).

4.1 Il ruolo della genetica e la selezione assistita da marcatori molecolari (MAS)

Prima dell'avvento della genomica, la valutazione morfologica dei genotipi di vite derivanti dai processi di selezione tradizionale ha rappresentato l'unica via percorribile per la distinzione d'individui diversi tra loro. Tuttavia tale attività richiede un elevato quantitativo di risorse e tempo, che si traducono in elevati costi, spesso capaci limitare fortemente l'attività di analisi delle progenie[44]. Talvolta inoltre, questo approccio risulta fornire dati discordanti tra giovani piantine, coltivate in serra, e individui adulti coltivati invece in pieno campo[44]. Per questo motivo, poiché si rilevò necessario un metodo di valutazione più rapido, affidabile e non influenzabile da fattori ambientali, venne introdotto nei programmi di miglioramento genetico l'utilizzo di marcatori molecolari, atti ad assistere nella selezione dei nuovi individui (selezione assistita da marcatori molecolari o MAS)[44]. L'impiego di marcatori molecolari, associati a determinati geni d'interesse, permette di risalire all'introgessione degli stessi all'interno del genoma delle nuove piante già in fasi di sviluppo precoci[45]. Tali strumenti, quindi, risultano essere fondamentali per una riduzione del tempo e della superficie richiesta dal miglioramento genetico e per rendere le tecniche di selezione significativamente più accurate ed efficienti.

Ciononostante, l'utilizzo dei marcatori necessita innanzitutto lo studio dell'associazione tra marcatori molecolari e i caratteri d'interesse, che rappresenta l'autentico collo di bottiglia della selezione assistita[43]. Per ottenere un'elevata affidabilità, il singolo marcatore o la coppia di marcatori fiancheggiati, devono essere strettamente associati al gene d'interesse associato, cioè preferibilmente ad una distanza minore di 5 cM[46]. Tale distanza infatti, consente di ottenere una bassissima percentuale di ricombinazione, che si traduce un'elevata efficienza del marcatore molecolare nel segnalare individui caratterizzati dal gene ricercato. Per quanto riguarda l'identificazione di marcatori associati a determinati geni o QTLs (*quantitative trait loci*), si rende necessaria la costruzione e l'analisi di una mappa genetica, la quale viene realizzata attraverso lo studio della ricombinazione genetica (osservabile durante il processo di meiosi durante la formazione dei gameti) utilizzando due parentali e la loro progenie d'incrocio[46].

Attualmente i marcatori molecolari più diffusi e utilizzati nei programmi di miglioramento genetico, risultano essere i microsatelliti (SSRs) per via del loro elevato polimorfismo[47], ma ad ogni modo un'ampia gamma di marcatori sono impiegabili (ad esempio: SCAR, SNP, EST, RFLP).

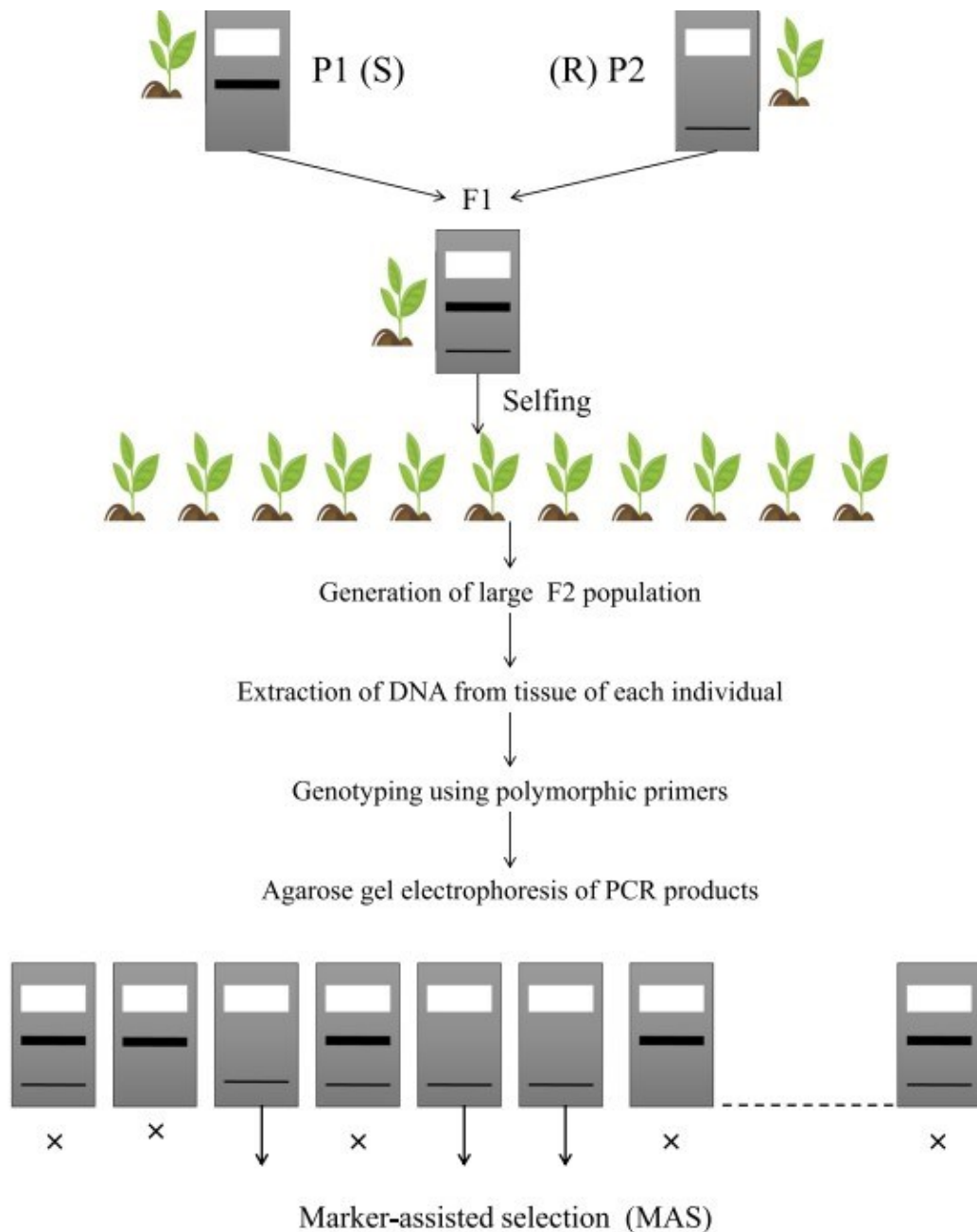


Figura 4.1 - Schema raffigurante il processo base della selezione assistita da marcatori molecolari[48].

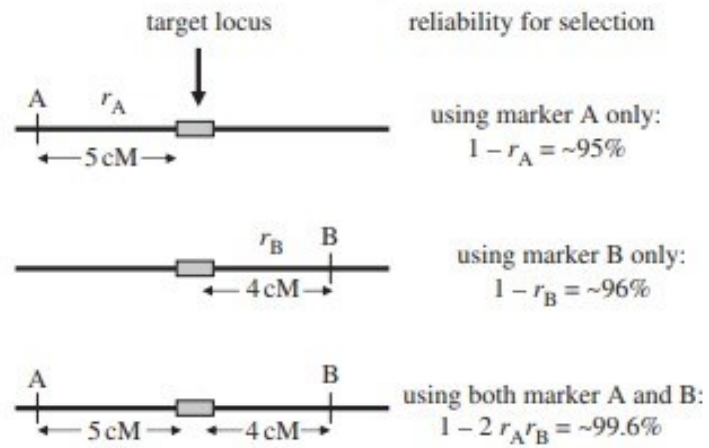


Figura 4.2 - Impatto del numero di marcatori e della loro relativa distanza dal gene bersaglio sull'affidabilità di selezione[46].

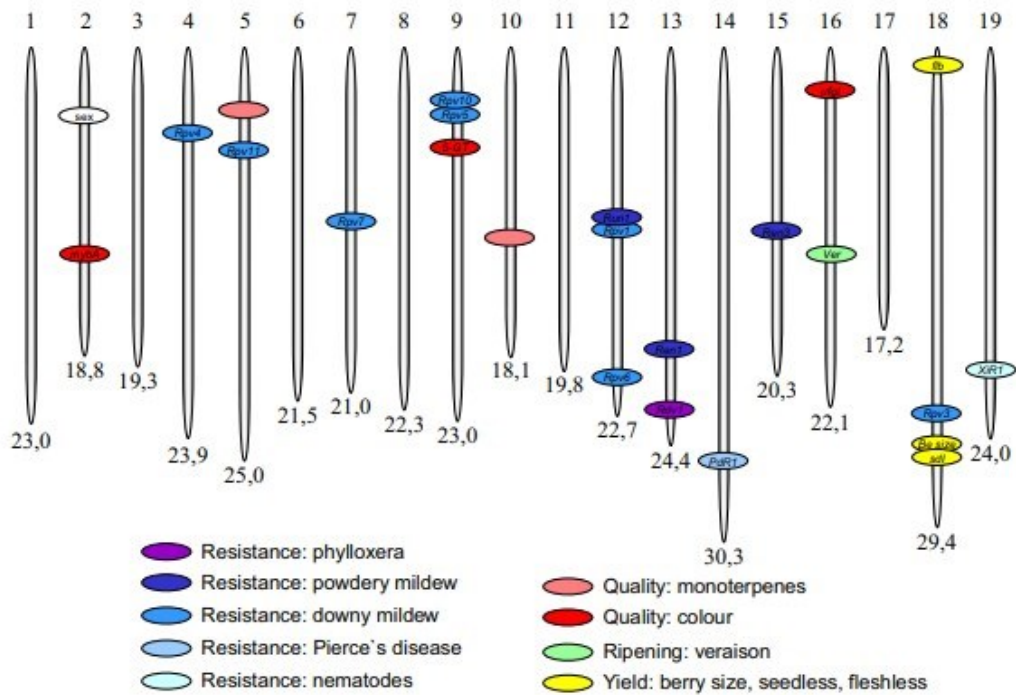


Figura 4.3 - Mappa cromosomica di Vitis raffigurante la posizione dei tratti cromosomici più rilevanti[49].

4.2 Le varietà resistenti

In viticoltura l'ottenimento di nuove varietà tramite incroci intra o interspecifici presenta due casi ben distinti[50]. Il primo riguarda l'uva da tavola dove gli intensi programmi di miglioramento genetico tradizionale hanno contribuito ad un forte ampliamento del panorama varietale; il secondo invece, relativo all'uva da vino, delinea una storia più sofferta dove pochi programmi hanno offerto al settore novità interessanti, e che per di più hanno avuto un ruolo del tutto marginale all'interno della filiera del vino[50]. La causa di questo scarso successo va cercata nel fortissimo legame tra le varietà tradizionali e il loro ambiente di coltivazione, aspetto estremamente difficile da scalfire per le nuove varietà. Tale legame però ha portato alla stagnazione dell'intera viticoltura da vino, rendendola di fatto, insostenibile dal punto di vista ambientale[50]. I primi progetti di miglioramento genetico atti all'ottenimento di nuove varietà da vino resistenti iniziarono in Europa a partire dalla seconda metà dell'XIX secolo, in seguito dell'introduzione dal Nuovo Mondo di peronospora, oidio e fillossera, con il relativo ottenimento degli ibridi di prima generazione (Clinton, Isabella, Noah ecc.)[50]. A queste varietà di prima generazione si susseguirono quelle di seconda, terza e quarta, nelle quali il genoma di vite americana è stato via via ridotto a favore di quello di vite europea[50].

Oggigiorno le aspettative dell'intera comunità mondiale sul tema della sostenibilità ambientale e la necessità, da parte dei produttori, nel ridurre i cospicui costi della difesa della vite, hanno spinto la comunità scientifica a indirizzare la maggior parte delle risorse impiegate nei programmi di miglioramento genetico verso l'ottenimento di varietà resistenti alle principali avversità che colpiscono l'odierna viticoltura. Per vitigni resistenti si intendono quindi individui ottenuti tramite incrocio interspecifico tra vite europea, responsabile dell'aspetto quanti-qualitativo della produzione, e viti americane o asiatiche, fonti invece dei geni di resistenza. Per mantenere però uno standard qualitativo elevato è essenziale che solo una minima percentuale del genoma di questi individui derivi da specie non europee, e che quel numero ristretto di geni siano effettivamente utili nel conferire all'individuo la resistenza verso i patogeni.

Dal punto di vista genetico è importante sottolineare che, nelle varietà resistenti di ultima generazione, la percentuale del genoma appartenente alla vite europea supera di norma il 95%. Ciò garantisce un livello qualitativo ottimale e considerato da molti alla pari a quello di *Vitis vinifera*.

Grazie al rapido sviluppo delle tecnologie genetiche e la possibilità d'impiegare marcatori molecolari atti ad assistere tali programmi di miglioramento, oggi è possibile ottenere genotipi contemporaneamente resistenti ad un gruppo eterogeneo di patogeni (funghi, batteri, virus, insetti)[51]. Inoltre, nel futuro prossimo, diventerà cruciale una combinazione tra resistenze a stress biotici e abiotici, promuovendo così una maggiore semplicità ed efficienza di coltivazione[51]. Tuttavia combinare un numero elevato di caratteristiche genetiche disgiunte è un processo piuttosto complesso e laborioso, e sarà necessario pertanto, che i futuri individui derivanti dal miglioramento genetico, raggiungano un compromesso accettabile tra diverse priorità[51]. Infatti, poiché una resistenza possa essere davvero efficace nella difesa della vite, questa deve essere durevole, ossia capace di rimanere effettiva durante un lungo e ampio utilizzo all'interno di ambienti favorevoli allo sviluppo del patogeno[52]. Sebbene le resistenze monogenetiche, ovvero attribuibili ad un solo gene, siano utili e di più semplice gestione rispetto alla presenza contemporanea di più geni di resistenza a patogeni diversi, queste vengono spesso scavalcate dal patogeno per mezzo di mutazioni genetiche[43]. Per evitare quindi il superamento degli ostacoli biologici della pianta si rileva necessario il “*gene pyramiding*” che si esplica nella concentrazione, all'interno di un singolo genoma “élite”, di più geni di resistenza derivanti da diverse fonti[43].

Nel 1998 i ricercatori dell'Università di Udine diedero inizio al primo progetto italiano di selezione di nuove varietà resistenti che dopo aver visto la collaborazione con l'Istituto di Genomica Applicata (IGA) e con i Vivai Cooperativi Rauscedo (VCR), si è concluso il 3 aprile 2015 con l'inserimento di un gruppo di 10 vitigni resistenti all'interno del Registro nazionale delle varietà di vite[53]. Tale gruppo è composto da[53]:

- 5 varietà a bacca bianca: (Fleurta, Soreli, Sauvignon Kretos, Sauvignon Nepis, Sauvignon Rytos);

- 5 varietà a bacca nera: (Cabernet Eidos, Cabernet Volos, Merlot Khorus, Merlot Manthus, Julius).

Negli ultimi anni i vitigni resistenti in Italia, come nel resto d'Europa, si stanno diffondendo sia in termini di superficie che di ricognizione mediatica. Tuttavia i circa 1050 ettari di superficie occupata da queste varietà rappresentano ancora una porzione irrisoria rispetto ai 650.000 ettari vitati nazionali. Inoltre la distribuzione di questa superficie risulta essere particolarmente sbilanciata verso il Nord Italia con una contribuzione minima da parte delle regioni del Centro-Sud.

La modifica del Regolamento (Ue) 2021/2117 pubblicata nella Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea (GUCE) il 6 Dicembre 2021 rappresenta il via libera da parte dell'Unione Europea verso l'utilizzo delle varietà di vite resistenti all'interno delle denominazioni[54]. Ciò rappresenta una svolta fondamentale che traccia la via verso una maggiore sostenibilità dell'intera filiera vitivinicola. Tuttavia i tempi necessari alla diffusione dei vitigni resistenti sembrano essere tutt'altro che brevi in quanto è richiesta innanzitutto l'autorizzazione da parte delle singole regioni e la successiva approvazione da parte consorzi di tutela delle varie denominazioni, con conseguente modifica dei disciplinari di produzione[54]. Mentre per diversi paesi europei i vitigni resistenti vengono già impiegati per la produzione di vini all'interno d'importanti denominazioni, come ad esempio quelle dello Champagne e del Bordeaux in Francia, in Italia il percorso di adozione di tali varietà si presenta più lungo e ripido[54]. Oltre ai vincoli culturali e antropologici, un grosso ostacolo per tale diffusione in Italia è rappresentato dalla mancanza di varietà resistenti autoctone (come Sangiovese, Nebbiolo, Glera, Nero d'Avola ecc.) capaci di mantenere saldo il forte legame tra territorio, vitigno e tradizione enologica che caratterizza la viticoltura italiana[54]. Sempre nell'ottica di velocizzare la diffusione di queste varietà, si rende necessario un progetto nazionale atto a sperimentare le performance di tali cultivar all'interno di numerosi e diversi ambienti pedoclimatici, con lo scopo di ottenere così una panoramica generale delle migliori combinazioni tra varietà e zona di coltivazione[54].

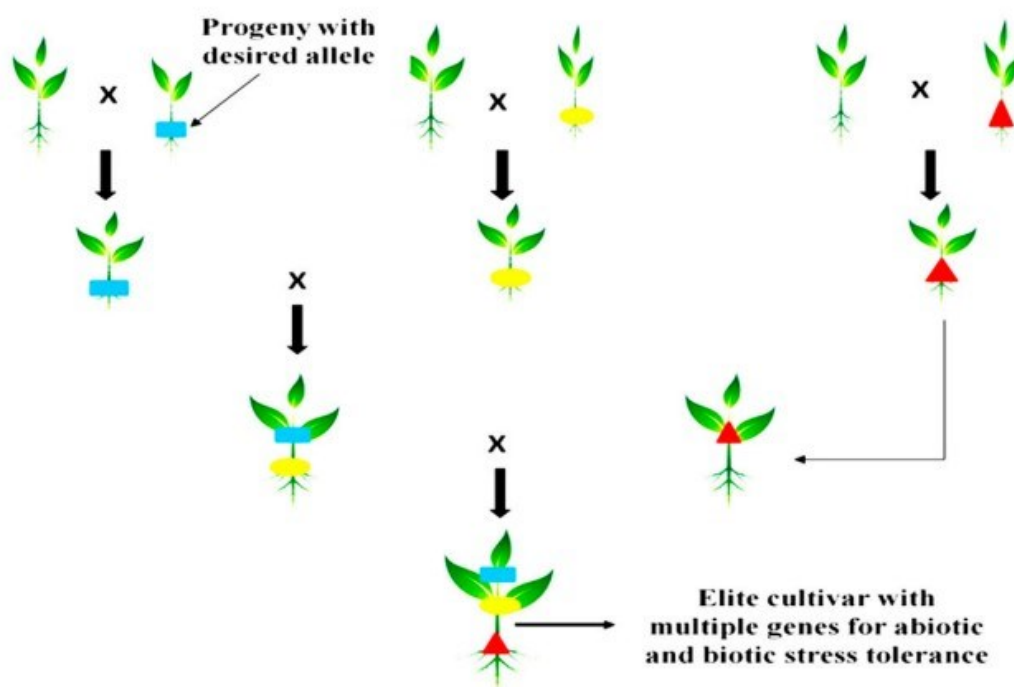


Figura 4.4 – Rappresentazione grafica del “gene pyramiding” atto all’ottenimento di resistenze durevoli[55].

Tabella 4.1 – Geni di resistenza a peronospora e oidio identificati all’interno del genere *Vitis*[50].

Patogeno	Gene	Cromosoma	Fonte	Riferimento
Peronospora	Rpv1	12	<i>M. rotundifolia</i>	Blanc <i>et al</i> 2012
	Rpv2	18	<i>M. rotundifolia</i>	Blanc <i>et al</i> 2012
	Rpv3	18	<i>V. rupestris</i> (a)	Di Gaspero <i>et al</i> 2011
	Rpv8	14	<i>V. amurensis</i>	Blasi <i>et al</i> 2011
	Rpv10	9	<i>V. amurensis</i>	Schwander <i>et al</i> 2011
	Rpv12	14	<i>V. amurensis</i>	Venuti <i>et al</i> 2013
Oidio	Run1	12	<i>M. rotundifolia</i>	Pauquet <i>et al</i> 2001
	Run2	18	<i>M. rotundifolia</i>	Riaz <i>et al</i> 2011
	Ren1	13	<i>V. vinifera</i>	Coleman <i>et al</i> 2011
	Ren4	18	<i>V. rotundifolia</i>	Mahanil <i>et al</i> 2011
	Ren5	14	<i>M. rotundifolia</i>	Blanc <i>et al</i> 2012

Rpv3 è una regione del cromosoma 18 non ancora risolta. Contiene probabilmente un “cluster” di geni di resistenza che possono avere avuto origine anche da specie diverse da *V. rupestris*, come *V. riparia*, *V. lincecumii* e *V. labrusca*.

4.3 Genome editing

In passato il miglioramento genetico non poteva che sfruttare la variabilità genetica generata dagli stessi strumenti che intervengono nell'evoluzione di ogni organismo, ossia le mutazioni casuali e gli incroci tra individui differenti[56]. È possibile considerare infatti le varietà di vite attualmente coltivate come il prodotto dell'accelerazione di tale processo tramite la realizzazione d'incroci controllati[56].

Oggi la tecnologia di *genome editing* (per l'agricoltura noto anche con il termine *New Breeding Technologies*, NBT) costituisce la nuova frontiera del miglioramento genetico. Tale tecnica, infatti, consente d'introdurre mutazioni sito-specifiche all'interno del genoma di tutti gli organismi viventi[56]. L'estrema precisione di questa tecnologia genetica deriva dall'azione combinata di un pool di molecole in grado di riconoscere una determinata sequenza nel genoma e di tagliarla causando, in seguito, l'attivazione di meccanismi di riparazione del DNA che portano a modifiche di pochi nucleotidi nel sito specifico[57]. Con l'obiettivo di cancellare, sostituire o inserire materiale genetico all'interno del genoma di una cellula, risulta essenziale la rottura di entrambi i filamenti del DNA nel locus d'interesse, i quali saranno poi riparati mediante processi di riparazione che avvengono naturalmente nelle cellule[56]:

- giunzione di estremità non omologhe (*non-homologous end-joining*, NHEJ): è il meccanismo più diffuso negli organismi eucarioti pluricellulari, comprese le piante, molto rapido ed efficiente, ma allo stesso tempo impreciso, in quanto nucleotidi possono essere inseriti o eliminati per favorire la giunzione, determinando quindi possibili mutazioni del gene;
- riparazione mediante ricombinazione omologa (*homology-directed repair*, HDR): meccanismo più preciso che utilizza il cromosoma fratello come stampo per la riparazione del DNA lesa. Tale riparazione viene però utilizzata più raramente dalla cellula.

Durante l'editing genomico la rottura sito-specifica del DNA può essere portata avanti da enzimi diversi. La vera rivoluzione in questo campo però è arrivata nel 2012 con la scoperta del sistema CRISPR/Cas9 il quale ha messo in secondo piano altri sistemi di editing i quali utilizzano nucleasi a dita zinco (*zinc-finger nucleases*),

meganucleasi e TALEN[58]. Scoperto originariamente nei batteri, dove svolge un'importante azione di difesa contro i virus, il sistema CRISPR/Cas9, a differenza degli altri sistemi d'editing, riconosce le sequenze di DNA da modificare non attraverso proteine bensì tramite molecole di RNA guida composte da circa 20 nucleotidi[56]. In seguito all'individuazione della sequenza bersaglio da parte dell'RNA (sgRNA), il genoma viene letteralmente tagliato dall'attività di Cas9, ovvero una nucleasi codificata a partire dai geni associati a CRISPR all'interno del genoma di *Streptococcus pyogenes*[57].

In generale, successivamente al taglio del materiale genetico, la cellula adotta il meccanismo di riparazione NHEJ, il quale essendo poco preciso può inserire, eliminare o sostituire i nucleotidi determinando di fatto mutazioni sito-specifiche casuali; invece, qualora durante il genome editing, oltre al complesso nucleasi/RNA, vengano fornite alle cellule molecole di DNA stampo in grado di guidare un meccanismo di riparazione HDR, la modifica del materiale genetico risulterà precisa e voluta[56].

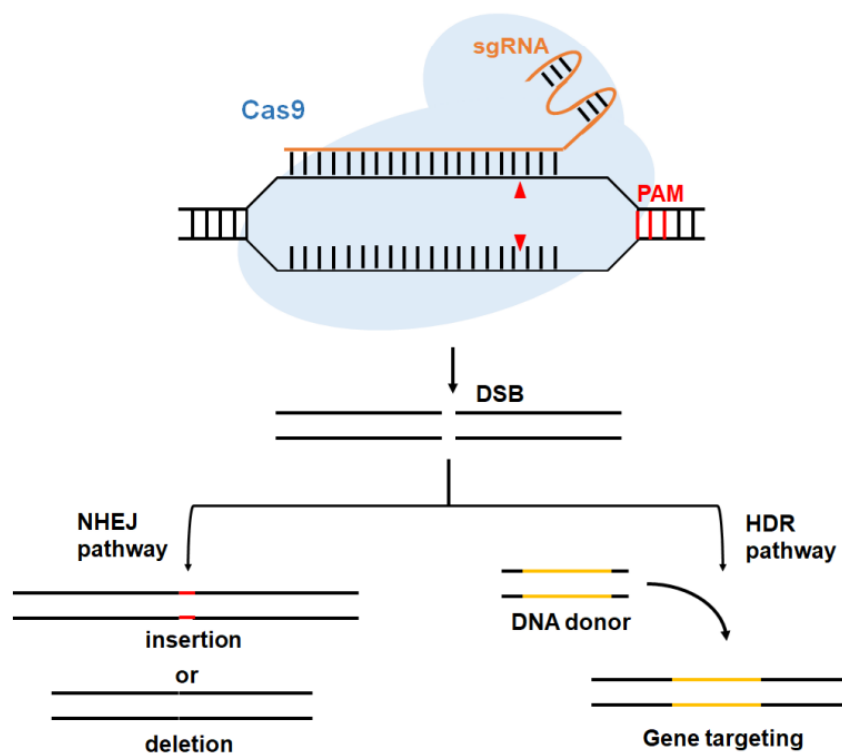


Figura 4.5 – Diagramma schematico raffigurante l'editing genomico indotto dal sistema CRISPR/Cas9[59].

Grazie alla possibilità di modificare geneticamente tutte le cellule in modo veloce, semplice ed economico, l'editing genetico, tramite l'utilizzo del sistema CRISPR/Cas9, risulta essere uno strumento fondamentale per il futuro di numerosi settori. In agricoltura tale tecnologia può essere impiegata per migliorare geneticamente, in modo estremamente efficiente, tutte le specie vegetali.

Dal punto di vista tecnico, durante l'editing genomico della vite, i calli o cellule embriogenetiche (originate a partire dai filamenti e antere del fiore) vengono utilizzati con successo per una stabile trasformazione mediata dall'impiego di cellule di *Agrobacterium tumefaciens*, contenenti al loro interno i costrutti CRISPR/Cas9[59]. In alternativa, una seconda metodologia prevede il contatto diretto tra protoplasto, proteina Cas9 purificata e sgRNA[60].

Per quanto riguarda la vite, il punto di maggiore interesse sono sicuramente le resistenze, sia biotiche che abiotiche, le quali possono essere introdotte con estrema precisione nel genoma della vite europea, mantenendo così la rimanente inalterata. Poiché, a differenza del miglioramento genetico tradizionale, questo approccio non comporta la creazione di nuove varietà, ma di veri e propri cloni di vite europea resistenti, oltre ad una forte riduzione nel consumo di crittogamici, tali individui consentirebbero di mantenere saldo il profondo legame tra varietà e territorio di coltivazione, conferendo al mercato il medesimo prodotto, ben noto e apprezzato dal consumatore.

L'editing genomico consente inoltre di modificare interi percorsi metabolici che possono portare alla creazione di varietà caratterizzate dalla produzione di valori ideali di diverse biomolecole considerate utili. Un'altra importante funzione di questa tecnologia è quella di determinare una maggiore comprensione della funzione dei geni nelle piante[56], ampliando così il sapere dei genetisti e le possibilità di miglioramento genetico nel loro complesso.

Nonostante l'enorme potenziale di questa tecnologia, con la sentenza della Corte di Giustizia europea del 2018, i prodotti derivanti dal genome editing sono stati equiparati ad organismi geneticamente modificati (OGM), e per questo motivo la loro coltivazione in Europa è vietata. Benché l'ostacolo normativo posto dall'Europa sembra pian piano indebolirsi sotto la spinta delle argomentazioni

proposte dalla comunità scientifica internazionale[61], il genome editing presenta attualmente alcune limitazioni di tipo tecnico. Tra di esse, le più rilevanti sono[60]:

1. l'incidenza del fenomeno di "off-target editing", che consiste nella modifica indesiderata di sequenze di DNA non bersaglio;
2. la necessità d'individuare un sito PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) adiacente al target bersaglio, che si traduce in una limitazione nel numero di target potenziali;
3. le grandi dimensioni della nucleasi (circa 160 KDa), le quali possono ostacolare la consegna dei costrutti responsabili dell'editing genomico.

Per ovviare a queste problematiche, tre obiettivi fondamentali sono stati fissati nel miglioramento tecnologico di SpCas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9), ovvero: l'incremento dell'accuratezza e precisione nell'identificazione del target, l'espansione e aumento del set di siti PAM riconosciuti dalla nucleasi e la riduzione della dimensione molecolare della stessa[60].

5 CONCLUSIONE

Il presente lavoro ha cercato d'illustrare in modo completo la biodiversità che caratterizza il settore vitivinicolo, sottolineando, in particolar modo, la sua estrema fragilità e importanza.

Oggi più che mai la biodiversità acquisisce un ruolo centrale all'interno del mondo viticolo. Ciò è dovuto principalmente all'enorme crescita delle tecniche e conoscenze genetiche, le quali consentono un miglioramento genetico della vite sempre più rapido ed efficiente, e alla necessità di ridurre l'enorme impatto ambientale di una viticoltura che annualmente richiede, da parte dell'uomo, invasivi e massicci interventi di difesa. Tuttavia, l'erosione genetica imposta, a partire dalla seconda metà dell'800 dall'arrivo in Europa di fillossera, peronospora e oidio, continua inesorabile anche nei nostri giorni, riducendo lentamente la biodiversità genetica della vite. Poiché tale risorsa d'inestimabile valore non può essere replicata in laboratorio, ma è frutto di un processo di selezione naturale e antropica lungo decine di migliaia di anni, risulta essenziale il finanziamento, sia livello nazionale

che internazionale, di efficienti programmi di conservazione, adeguatamente distribuiti su tutto il territorio mondiale. Inoltre, nel prossimo futuro, con l'obiettivo di migliorare i processi d'ottenimento delle nuove varietà e velocizzare quelli invece relativi all'individuazione di omonimi, sinonimi e parietali tra le collezioni di germoplasma, si rileverà fondamentale il sostegno e proseguimento degli studi genetici atti ad approfondire le conoscenze relative al genoma di vite e individuare il meccanismo di funzionamento dei geni e delle proteine sintetizzate a partire dalla loro trascrizione.

Oggigiorno, nonostante i numerosi ostacoli e scetticismi da parte di una grossa fetta degli attori del settore vitivinicolo, nuove varietà resistenti, come quelle proposte dall'Università di Udine, sono state introdotte per la prima volta in numerosi disciplinari di produzione sparsi in tutto il mondo, segnando così una fondamentale e storica svolta dell'intero settore vitivinicolo verso una maggiore sostenibilità ambientale, richiesta a gran voce dai consumatori. Ciò nonostante, la diffusione di queste nuove varietà rimane estremamente limitata e contenuta, soprattutto in Italia, dove i numerosi e antichi legami tra territori e vitigni autoctoni sembrano non voler lasciar spazio alla loro espansione all'interno del territorio nazionale. Affinché la diffusione dei vitigni resistenti possa continuare, innanzitutto si rende necessaria una efficace comunicazione, sia verso i produttori che verso i consumatori, finalizzata a segnalare le caratteristiche e la presenza nel mercato di tali varietà. Inoltre, per poter agevolare le scelte dei viticoltori, e quindi velocizzare il processo di diffusione delle varietà resistenti, particolarmente importanti risultano essere gli studi nazionali di zonazione atti a individuare le migliori combinazioni tra territorio di coltivazione e vitigno. Attualmente l'incrocio tra individui diversi non è l'unica via per ottenere vitigni resistenti. Infatti, attraverso il genome editing, tecnologia genetica relativamente recente, è possibile inserire all'interno del genoma di *Vitis vinifera* geni di resistenza derivanti da viti americane e/o asiatiche, ottenendo così individui caratterizzati dal completo genoma di vite europea ma allo stesso tempo resistenti. Tuttavia, benché questo strumento risulti estremamente utile, non solo in viticoltura, l'UE ha marcato come OGM tutti gli organismi ottenuti tramite tale tecnologia, anche se, grazie alla pressione da parte della comunità scientifica, tale legislazione sembra essere destinata a un'importante revisione.

Mentre le tecnologie genetiche si evolvono nel tempo, la vite, a causa della sua tradizionale riproduzione per via vegetativa e alla necessità di garantire prodotti enologici di successo dalle uve, si trova attualmente in una vera e propria stagnazione evolutiva, dove modifiche all'interno del genoma degli individui possono essere introdotte solamente attraverso mutazioni casuali o programmi di miglioramento genetico. I patogeni della vite, al contrario, vengono sottoposti ogni anno a una forte selezione, sia da parte dei fattori naturali, ma soprattutto da quelli antropici, i quali tendono a favorire la comparsa d'individui resistenti ai prodotti impiegati dall'uomo per la difesa della pianta. È chiaro allora che l'enorme patrimonio genetico della vite, forgiato durante milioni di anni, rappresenta nei nostri giorni una risorsa fondamentale e indispensabile non solo per l'ottenimento di varietà resistenti, ma anche per l'ottenimento d'individui capaci di soddisfare le mutevoli esigenze e preferenze del mercato vitivinicolo internazionale, e quindi, del consumatore.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] C. D’Onofrio *et al.*, «Parentage Atlas of Italian Grapevine Varieties as Inferred From SNP Genotyping», *Front Plant Sci*, vol. 11, gen. 2021, doi: 10.3389/fpls.2020.605934.
- [2] Organisation internationale de la vigne et du vin, «Distribution of the world’s grapevine varieties», 2017. Consultato: feb. 28, 2022. [Online]. Available: <https://www.oiv.int/public/medias/5888/en-distribution-of-the-worlds-grapevine-varieties.pdf>
- [3] A. Scienza e O. Failla, «La circolazione varietale della vite nel Mediterraneo: lo stato della ricerca», *GM Di Nocera, A. Guidi, A. Zifferero (a cura di), ArcheoTipico: l’archeologia come strumento per la ricostruzione del paesaggio e dell’alimentazione antica, Firenze*, pagg. 13–30, 2016.
- [4] P. This, T. Lacombe, e M. R. Thomas, «Historical origins and genetic diversity of wine grapes», *Trends in Genetics*, vol. 22, n. 9. pagg. 511–519, set. 2006. doi: 10.1016/j.tig.2006.07.008.
- [5] C. Villano *et al.*, «DNA-Based Technologies for Grapevine Biodiversity Exploitation: State of the Art and Future Perspectives», 2022, doi: 10.3390/agronomy.
- [6] J.-F. Terral *et al.*, «Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars», *Ann Bot*, vol. 105, n. 3, pagg. 443–455, 2010.
- [7] F. Emanuelli *et al.*, «Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape», *BMC Plant Biol*, vol. 13, n. 1, pag. 39, dic. 2013, doi: 10.1186/1471-2229-13-39.
- [8] F. Grassi e G. de Lorenzis, «Back to the origins: background and perspectives of grapevine domestication», *Int J Mol Sci*, vol. 22, n. 9, pag. 4518, 2021.
- [9] Royal Botanic Gardens Kew, «Plants of the World Online». <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:325876-2#bibliography> (consultato mar. 02, 2022).

- [10] A. Antonaros, *La grande storia del vino. Tra mito e realtà, l'evoluzione della bevanda più antica del mondo*. Edizioni Pendragon, 2006.
- [11] Alessio Garofalo, «De Rerum Vinorum Historia», 2019.
- [12] C. Stato Regioni ed, «LINEE GUIDA per la conservazione e la caratterizzazione della biodiversità vegetale, animale e microbica di interesse per l'agricoltura piano nazionale sulla biodiversità di interesse agricolo». Consultato: lug. 23, 2022. [Online]. Available: <https://www.reterurale.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/9580>
- [13] «Germoplasma-vitico-in-vitro», Consultato: lug. 23, 2022. [Online]. Available: <https://vigneviniequalita.edagricole.it/wp-content/uploads/sites/23/2014/06/Germoplasma-vitico-in-vitro.pdf>
- [14] M. Gardiman e L. Bavaresco, «The Vitis germplasm repository at the CRA-VIT, Conegliano (Italy): Conservation, characterization and valorisation of grapevine genetic resources», *Acta Hortic*, vol. 1082, pagg. 239–244, apr. 2015, doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1082.33.
- [15] Luigi Bavaresco, «Ampelografia, competenze da non perdere», nov. 09, 2021. <https://vigneviniequalita.edagricole.it/vigneto/varietà/ampelografia-competenze-da-non-perdere/> (consultato lug. 25, 2022).
- [16] «Descrittori». <https://vitisdb.it/descriptors/index> (consultato lug. 26, 2022).
- [17] M. Marino, Antonella. Trisorio, e alimentari e forestali. Italia. Ministero delle politiche agricole, *Linee guida per la conservazione e la caratterizzazione della biodiversità vegetale di interesse per l'agricoltura: piano nazionale sulla biodiversità di interesse agricolo*. [INEA], 2013.
- [18] Organisation internationale de la vigne et du vin, «2^a edizione del codice di caratteri descrittivi OIV per le varietà di vite e specie di Vitis». Consultato: lug. 29, 2022. [Online]. Available: <https://www.oiv.int/public/medias/2274/code-2e-edition-finale.pdf>
- [19] Enrico Ruzzene, «Ampelografia». <https://www.agraria.org/viticultura-enologia/ampelografia.htm> (consultato lug. 29, 2022).
- [20] M. Crespan, L. Bavaresco, e D. Migliaro, «I microsatelliti per identificare le varietà di vite», gen. 2014.

- [21] C. Villano *et al.*, «DNA-Based Technologies for Grapevine Biodiversity Exploitation: State of the Art and Future Perspectives», 2022, doi: 10.3390/agronomy.
- [22] Termolino Pasquale, «CORSO GENOPOM PRO», 2013. Consultato: ago. 16, 2022. [Online]. Available: <http://www.genopomii.unina.it/genopom/files/Marcatori%20molecolari.pdf>
- [23] «I marcatori molecolari». Consultato: ago. 16, 2022. [Online]. Available: <https://www.dbt.univr.it/documenti/OccorrenzaIns/matdid/matdid983763.pdf>
- [24] J. Jakse, N. Stajner, L. Tomic, e B. Javornik, «Application of Microsatellite Markers in Grapevine and Olives», in *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*, InTech, 2013. doi: 10.5772/53411.
- [25] Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), «Attività di analisi per la caratterizzazione varietale della vite». <https://www.crea.gov.it/web/viticultura-e-enologia/-/attivita%20di-analisi-per-la-caratterizzazione-varietale-della-vite> (consultato ago. 06, 2022).
- [26] L. Costantini, «Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars Related papers», doi: 10.1007/s00122-004.
- [27] A. S. Mason, «SSR Genotyping», in *Plant Genotyping: Methods and Protocols*, J. Batley, A c. di New York, NY: Springer New York, 2015, pagg. 77–89. doi: 10.1007/978-1-4939-1966-6_6.
- [28] K. M. Sefc, F. Lefort, M. S. Grando, K. D. Scott, H. Steinkellner, e M. R. Thomas, «Microsatellite Markers for Grapevine: A State of the Art», in *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*, Springer Netherlands, 2001, pagg. 433–463. doi: 10.1007/978-94-017-2308-4_17.
- [29] E. Maul e R. Töpfer, « Vitis International Variety Catalogue (V IVC): A cultivar database referenced by genetic profiles and morphology », *BIO Web Conf*, vol. 5, pag. 01009, 2015, doi: 10.1051/bioconf/20150501009.
- [30] S. B. Karch, «Autopsy: Molecular», in *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine (Second Edition)*, J. Payne-James e R. W. Byard, A c. di Oxford: Elsevier, 2016, pagg. 290–296. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800034-2.00041-0>.

- [31] «I microsatelliti per identificare le varietà». [Online]. Available: <http://plantares.entecra.it>.
- [32] M. C. Yadav, «DNA Markers in Crop Improvement View project Genetic Improvement of Temperate and Tropical Mushrooms Sub-Project NCM-14A: Genetics and Breeding of white Button Mushrooms (*Agaricus bisporus* and *A. bitorquis*) View project», 2008. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/328686190>
- [33] G. Cipriani, M. T. Marrazzo, G. di Gaspero, A. Pfeiffer, M. Morgante, e R. Testolin, «A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping», *BMC Plant Biol*, vol. 8, 2008, doi: 10.1186/1471-2229-8-127.
- [34] D. Lijavetzky, J. Cabezas, A. Ibáñez, V. Rodríguez, e J. M. Martínez-Zapater, «High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology», *BMC Genomics*, vol. 8, nov. 2007, doi: 10.1186/1471-2164-8-424.
- [35] «single nucleotide polymorphism». <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/single-nucleotide-polymorphism> (consultato ago. 10, 2022).
- [36] V. Laucou *et al.*, «Extended diversity analysis of cultivated grapevine *Vitis vinifera* with 10K genome-wide SNPs», *PLoS One*, vol. 13, n. 2, feb. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0192540.
- [37] J. A. Cabezas *et al.*, «A 48 SNP set for grapevine cultivar identification», 2011. [Online]. Available: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/11/153>
- [38] M. Ž. Mihaljević *et al.*, «Genetic diversity, population structure, and parentage analysis of croatian grapevine germplasm», *Genes (Basel)*, vol. 11, n. 7, pagg. 1–35, lug. 2020, doi: 10.3390/genes11070737.
- [39] «GrapeReSeq». <https://urgi.versailles.inra.fr/Projects/Achieved-projects/GrapeReSeq> (consultato ago. 11, 2022).
- [40] G. de Lorenzis, R. Chipashvili, O. Failla, e D. Maghradze, «Study of genetic variability in *Vitis vinifera* L. germplasm by high-throughput Vitis18kSNP array: The case of Georgian genetic resources», *BMC Plant Biol*, vol. 15, n. 1, giu. 2015, doi: 10.1186/s12870-015-0510-9.

- [41] F. Mercati *et al.*, «High-throughput 18K SNP array to assess genetic variability of the main grapevine cultivars from Sicily», *Tree Genet Genomes*, vol. 12, n. 3, giu. 2016, doi: 10.1007/s11295-016-1021-z.
- [42] L. Bavaresco, «IL MIGLIORAMENTO GENETICO DELLA VITE: SITUAZIONE E PROSPETTIVE».
- [43] «2014 VQ Stefanini Velasco».
- [44] M. Dalbó, G. Ye, N. Weeden, W. Wilcox, e B. Reisch, «Marker-assisted Selection for Powdery Mildew Resistance in Grapes», 2001.
- [45] T. Hvarleva *et al.*, «Toward marker assisted selection for fungal disease resistance in grapevine», *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 23, n. 4. pagg. 1431–1435, nov. 2009. doi: 10.2478/V10133-009-0008-4.
- [46] B. C. Y. Collard e D. J. Mackill, «Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century», *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 363, n. 1491. Royal Society, pagg. 557–572, feb. 12, 2008. doi: 10.1098/rstb.2007.2170.
- [47] Margot Raffener, Elena Zini, e Thomas Letschka, «Analisi di accessioni di vite con marcatori molecolari associati a geni di resistenza a fillossera, antracnosi e tumore batterico», *Laimburg Journal*, vol. 1, gen. 2019, doi: 10.23796/lj/2019.002.
- [48] N. Hasan, S. Choudhary, N. Naaz, N. Sharma, e R. A. Laskar, «Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes», *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 19, n. 1. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, dic. 01, 2021. doi: 10.1186/s43141-021-00231-1.
- [49] R. Töpfer, L. Hausmann, M. Harst, E. Maul, E. Zyprian, e R. Eibach, «Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology New Horizons for Grapevine Breeding». [Online]. Available: www.vivc.de
- [50] G. di Gaspero, M. Morgante, -Enrico Peterlunger 1 -Simone, D. Castellarin, e G. Cipriani 1 -Raffaele Testolin, «SPECIALE MIGLIORAMENTO GENETICO».
- [51] O. Yobrégat, «Introduction to resistant vine types: A brief history and overview of the situation», *Oeno One*, vol. 52, n. 3, pagg. 241–246, 2018, doi: 10.20870/oeno-one.2018.52.3.2220.

- [52] E. Peressotti *et al.*, «Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety», 2010. [Online]. Available: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/147>
- [53] «News on resistance». <http://www.farmwithscience.org/en/program-2014-2017/varietal-innovation/news-on-resistance/first-vine-varieties-resistant-to-diseases-produced-in-italy> (consultato nov. 03, 2022).
- [54] «Ue, via libera ai “vitigni resistenti” nei vini a Denominazione. Una svolta epocale per il settore». Consultato: nov. 03, 2022. [Online]. Available: https://winenews.it/it/ue-via-libera-ai-vitigni-resistenti-nei-vini-a-denominazione-una-svolta-epocale-per-il-settore_458126/#:~:text=Oggi%20ne%20abbiamo%20solo%20tre,lavoro%20dell'Universit%C3%A0%20di%20Udine.
- [55] R. Dormatey, C. Sun, K. Ali, J. A. Coulter, Z. Bi, e J. Bai, «Gene pyramiding for sustainable crop improvement against biotic and abiotic stresses», *Agronomy*, vol. 10, n. 9. MDPI AG, set. 01, 2020. doi: 10.3390/agronomy10091255.
- [56] A. Cavallini, T. Giordani, e L. Natali, «Genome editing: the (near) future of plant breeding Genome editing: il futuro (prossimo) del miglioramento genetico delle piante», 2016.
- [57] A. M. Khalil, «The genome editing revolution: review», *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 18, n. 1. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, dic. 01, 2020. doi: 10.1186/s43141-020-00078-y.
- [58] «Editing genomico». <https://www.osservatorioterapieavanzate.it/terapie-avanzate/editing-genomico> (consultato nov. 17, 2022).
- [59] C. Ren, Y. Lin, e Z. Liang, «CRISPR/Cas genome editing in grapevine: recent advances, challenges and future prospects», *Fruit Research*, vol. 2, n. 1, pagg. 1–9, 2022, doi: 10.48130/FruRes-2022-0007.
- [60] L. Dalla Costa *et al.*, «The state-of-the-art of grapevine biotechnology and new breeding technologies (NBTS) The state-of-the-art of grapevine biotechnology and new breeding technologies (NBTS) V I N E A N D W I N E OPEN ACCESS JOURNAL INTRODUCTION WHAT DOES GRAPEVINE BIOTECHNOLOGY MEAN?», *One*, vol. 53, n. 2, pagg. 205–228, 2019, doi: 10.20870/oeno-one.2019.53.2.2405i.

- [61] Giulia Bartalozzi, «Soltanto con il “genome editing” si potrà ridurre in futuro l’impatto ambientale della viticoltura». <https://www.georgofili.info/contenuti/soltanto-con-il-genome-editing-si-potr-ridurre-in-futuro-limpatto-ambientale-della-viticultura/18049> (consultato nov. 17, 2022).
- [62] Basile-Caramia, «CORSO DI FORMAZIONE I CAMPI PER LA CONSERVAZIONE EX SITU DELLE RISORSE GENETICHE AUTOCTONE IN PUGLIA».

RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto intendo ringraziare la Professoressa Serena Varotto e il Dottore Massimo Gardiman, che con grande cordialità e disponibilità, mi hanno seguito lungo tutto il percorso di questo progetto di studio.

Ringrazio infinitamente i miei genitori, mamma Manuela e papà Sergio, che mi hanno permesso di seguire questo corso di studi e che più di tutti mi hanno appoggiato e sostenuto durante tutto il cammino.

Ringrazio i miei due fratelli, Andrea e Davide, che ogni giorno mi hanno sostenuto e aiutato nel raggiungimento di questo traguardo.

Un ringraziamento speciale va ai miei nonni materni, Franca e Giorgio, e a mia zia Maria, che tramite il loro profondo affetto, mi hanno aiutato ad affrontare questo percorso universitario con serenità e coraggio.

Nicolò