

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia animali alimenti risorse naturali e
ambiente

Corso di laurea triennale in Scienze e tecnologie viticole ed
enologiche

**RISPOSTE DI DIFESA ALLA FLAVESCENZA
DORATA IN CULTIVAR DI VITE
DIVERSAMENTE SUSCETTIBILI**

RELATORE:

Prof.ssa Serena Varotto

LAUREANDA:

Chiara De Gregorio

Matricola n.1169764

Anno accademico: 2021-2022

INDICE

INTRODUZIONE.....	3
CAPITOLO 1: LA FISIOLOGIA DELLA VITE.....	5
1.1 Gli ormoni della vite	6
CAPITOLO 2: IL FITOPLASMA.....	7
2.1 Candidatus phytoplasma vitis.....	7
2.1.1 Moderne tecniche diagnostiche.....	7
2.2 Sintomatologia.....	8
2.2.1 Danno economico.....	11
2.3 Trasmissione e lotta.....	11
2.4 Recrudescenza.....	12
CAPITOLO 3: LA GENETICA A FAVORE DELLA VITICOLTURA.....	13
3.1 Differenze di suscettibilità in Tocai friulano e Chardonnay	13
3.2 Analisi molecolare.....	14
CAPITOLO 4: RISPOSTE DI DIFESA.....	15
4.1 Regolazione genica.....	16
4.2 Fenomeno del recovery.....	18
CAPITOLO 5: MIGLIORAMENTO GENETICO.....	20
5.1 Individuazione dei geni di resistenza	21
5.1.1 Marcatori molecolari.....	22

5.1.2	Regioni trasposoniche.....	24
5.2	Ibridi resistenti.....	25
5.3	La tecnica dell'incrocio.....	26
	CONCLUSIONI.....	28
	BIBLIOGRAFIA.....	31

INTRODUZIONE

La Flavescenza dorata (FD) è una malattia della vite che fa parte dei cosiddetti “giallumi” (GY= *grapevine yellows*), ossia del gruppo delle ampelopatie causate da fitoplasmi.

È stata osservata per la prima volta nel sud-est della Francia negli anni '50; successivamente, simili sintomatologie sono state osservate in molte altre regioni d'Europa.

La sua diffusione è ad oggi preoccupante, soprattutto nell'Italia settentrionale e in Francia, dove si registrano costantemente epidemie, nonostante il fitoplasma FD sia un organismo da quarantena per la Comunità Europea.

E' importante sottolineare che l'areale di presenza della malattia è inferiore a quello del suo vettore, per questo la lotta preventiva nel caso della FD ricopre un ruolo fondamentale.

Questa ampelopatia è causata da *Candidatus phytoplasma vitis*, un fitoplasma appartenente al gruppo genetico del giallume dell'olmo.

I fitoplasmi sono organismi procarioti parassiti obbligati, sprovvisti di parete cellulare, che si trovano localizzati nel floema delle piante nel quale possono spostarsi facilmente da una cellula all'altra attraverso i pori delle placche cribrose.

In tali cellule i fitoplasmi inducono modificazioni anatomiche dovute a depositi di callosio, che portano ad un collasso degli elementi del floema e un consumo eccessivo di metaboliti, che causano vari scompensi alla pianta, fino ad ostruirne completamente i vasi linfatici causandone la morte.

È stato inoltre dimostrato che le piante infette da fitoplasmi subiscono una marcata variazione nel contenuto endogeno di sostanze regolatrici della crescita, soprattutto auxine e citochinine, e di metaboliti secondari come polifenoli e alcaloidi.

Queste modificazioni inducono il manifestarsi dei sintomi tipici della FD, che si presentano molto simili ai sintomi dati da virusi (accartocciamento fogliare, internodi a zig-zag..).

Recenti studi hanno sottolineato come le risposte endogene delle diverse varietà di vite siano preponderanti e determinanti per la manifestazione dei sintomi da FD, e di conseguenza ne determinino il facile deperimento o una maggiore resistenza al patogeno.

Comparando quindi varietà suscettibili con altre parzialmente resistenti, si è iniziato a capire come varia la trascrizione genica in risposta alla presenza del fitoplasma nella pianta.

Con queste informazioni, è possibile iniziare a lavorare per selezionare i geni e la loro regolazione per indurre tolleranza/resistenza nelle varietà coltivate, in modo da non dover ricorrere a insetticidi dannosi per l'ambiente o poco efficaci.

Questa tesi si concentrerà sui possibili metodi biotecnologici per intervenire a livello genomico per ottenere piante resistenti/tolleranti o poco suscettibili al fitoplasma.

Nel dettaglio, sono state valutate due varietà di vite caratterizzate da diversa suscettibilità ai giallumi: Tocai friulano clone ISV6 e Chardonnay clone R8.

CAPITOLO 1: FISILOGIA DELLA VITE

Il ciclo vitale della vite può essere diviso in quattro fasi fenologiche fortemente influenzate dal rapporto carbonio/azoto e dagli ormoni.

Le varie fasi hanno durata indicativa che serve a darne un inquadramento nel tempo, poiché possono influire diversi fenomeni di origine pedo-climatica che ne determinano una durata maggiore o minore: ad esempio, se la vite si trova in un terreno povero di nutrienti, sarà più portata ad avere una fase improduttiva più lunga rispetto ad una vite cresciuta in un terreno ricco di sostanza organica.

La prima fase ha una durata di circa 3 anni, ed è una fase in cui la piantina non produce e concentra tutte le sue energie per accrescersi. Segue una seconda fase, al quarto anno, in cui inizia la vera e propria produzione, anche se ridotta, ma che gradualmente tende ad aumentare.

Una volta raggiunta la maturità, la produttività è massima e costante nel tempo con un rapporto C/N in equilibrio, fino all'ultima fase che viene raggiunta dopo una media di 25 dopo i quali la vite inizia a produrre di meno fino alla sua morte.

Nelle prime fasi di vita della pianta, il rapporto tra elementi assorbiti nel terreno (N) e sostanze sintetizzate dalla chioma (C) è spostato a favore dell'apparato radicale perché la pianta ha bisogno di nutrirsi per crescere. Inoltre, gli ormoni implicati nella differenziazione delle gemme non sono presenti poiché gli ormoni florigeni (che sono fitoregolatori), dipendono da un pigmento recettore che è *fitocromo*, la cui presenza viene stimolata dal maggior afflusso di metaboliti, fra i quali il carbonio prodotto dalla chioma.

Superata la fase produttiva, il rapporto C/N sarà comunque destinato allo squilibrio, questa volta però a favore del C.

La vite ha anche un ciclo annuale che è diviso in due fasi: fase vegetativa e fase riproduttiva.

La fase vegetativa prevede il germogliamento, la lignificazione e infine il riposo vegetativo il cui termine solitamente viene considerato quando si verifica il fenomeno del "pianto", ovvero, la fuoriuscita di linfa ricca di ormoni, visibile in corrispondenza dei tagli di potatura. Tale "pianto" si verifica perché la pianta applica un minimo di strategia di riparazione delle ferite.

La fase riproduttiva inizia con la differenziazione delle gemme che ha la durata di un anno, nel caso delle gemme miste che contengono già i grappolini, mentre le

gemme pronte hanno un ciclo di circa 30 giorni e portano alla produzione di femminelle. La differenziazione avviene dopo che si verificano macro e micro sporogenesi, ovvero la formazione degli ovuli e del polline che dipendono da diversi fattori come la concimazione, la potatura, l'allegagione..

Le gemme entrano anche in dormienza che può essere data dal fenomeno della dominanza apicale di tipo essenzialmente nutritivo ed ormonale poiché l'apice del germoglio sottrae alle gemme sostanze nutritive e contemporaneamente stimola la produzione di auxine (ormone dell'accrescimento) che le mantiene in quiescenza.

Il secondo tipo di dominanza è un tipo di dominanza correlata, ovvero dovuta alla contemporanea presenza di gemme pronte o femminelle, quindi anche auxine che vanno ad inibire le gemme miste produttive.

L'inibizione invece ormonale è data dall'aumento di ormoni inibitori (acido abscissico) e una volta terminato questo tipo di dominanza, scatta la dominanza esogena data dalle basse temperature invernali che inibiscono la fioritura. (G. Sicheri, 2012)

1.1 GLI ORMONI DELLA VITE

I fitormoni sono sostanze organiche di origine vegetale che guidano i processi di crescita e che non hanno un sito di sintesi specifico e funzioni indirizzate ad un organo specifico, ma hanno funzione molto più generalizzata.

I principali ormoni vegetali sono: auxine, citochinine, gibberelline acido abscissico ed etilene.

Auxine e citochinine hanno una funzione di accrescimento, distensione e divisione, ma sono localizzate in tessuti diversi. Rispettivamente, le prime vengono prodotte dai meristemi apicali, e le seconde da quelli radicali.

Le gibberelline, invece, sono implicate nella regolazione della fioritura e la loro presenza è proporzionale alla quantità di vinaccioli.

L'acido abscissico (ABA), viene anche detto ormone della senescenza poiché ha funzione inibitrice e regola il passaggio da fase quiescente a fase vegetativa oltre che il bilancio idrico interno alla pianta.

Infine, l'etilene stimola la sintesi di diversi enzimi, e promuove la maturazione dei frutti e la loro abscissione. (G. Sicheri, 2012)

CAPITOLO 2: IL FITOPLASMA

I fitoplasmi sono parassiti delle piante, procarioti, facenti parte della classe dei Mollicutes, quindi sprovvisti di parete cellulare e detti per questo “pleomorfi”.

Non hanno un nucleo, ma contengono DNA o RNA a doppio filamento.

Colonizzano esclusivamente i tubi floematici, al di fuori dei quali muoiono per la variazione di pressione osmotica, e vengono definiti per questo parassiti obbligati.

Le infezioni da fitoplasma si trasmettono attraverso insetti vettori o tramite le tecniche di innesto e di propagazione vegetativa. (Enciclopedia treccani)

2.1 *Candidatus phytoplasma vitis*

Candidatus phytoplasma vitis è lo specifico fitoplasma responsabile della malattia chiamata Flavescenza dorata, detta FD, riconducibile ai giallumi dell’olmo, quindi non tipica della vite, ma trasmessa dal suo vettore specifico che è *Scaphoideus titanus*, monofago su vite.

Di norma i fitoplasmi non possono essere coltivati in laboratorio: in genere vengono osservati al microscopio elettronico su tessuti di piante o insetti oppure tramite saggi molecolari (PCR) che sfruttano la presenza degli acidi nucleici. (N.Cane, D.Bosco; 2011)

2.1.1 MODERNE TECNICHE DIAGNOSTICHE

Spesso l’osservazione dei fitoplasmi a microscopio elettronico risulta difficile perché la concentrazione delle cellule all’interno del floema è bassa e non omogenea. Perciò per diagnosticare la presenza di fitoplasmi viene utilizzata la PCR (figura 1), che permette una diagnosi più accurata. E’ un metodo diagnostico di tipo molecolare in grado di sfruttare la presenza di proteine di membrana, acidi nucleici, ecc. estratti direttamente dal tessuto floematico di foglie e piccioli, in questo modo viene sfruttata l’amplificazione del DNA estratto da campioni di tessuti.

La PCR è in grado di rilevare la presenza di quantità di acido nucleico del fitoplasma pari a pochi femtogrammi (10–12 mg): si tratta quindi di una tecnologia molto affidabile, decisamente costosa e che richiede tuttavia ottimi livelli di accuratezza (G. Belli, P. A. Bianco et. al.; 2002)

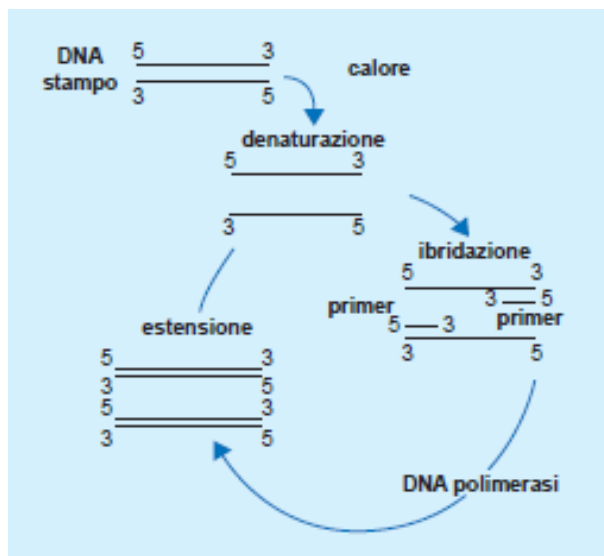


Figura 1. Schema esplicativo PCR (EsaDia; 2003)

Il riconoscimento della FD si basa sulle differenze rilevate nella porzione di DNA che codifica per la frazione 16S dell' RNA ribosomale (rRNA) che ha consentito di classificare i fitoplasmi in 4 gruppi spesso indicati con il nome del giallume causato dal fitoplasma-tipo che lo caratterizza, che nel caso di *Candidatus phytoplasma vitis* è rappresentato dal “giallume dell’olmo”, un gruppo che contiene i fitoplasmi responsabili della FD, che è infatti causata da diversi ceppi di sottogruppi filogenetici 16SrV-C e -D. (Zaho et.al; 2009).

La regione 16Sr è una regione del DNA ribosomale che contiene regioni iper-variabili che possono fornire sequenze “firma”, quindi specifiche, utili all’identificazione di specie batteriche e specie non coltivabili come i fitoplasmi e costituisce un’alternativa rapida al riconoscimento fenotipico. (Lee et al. 2000, Wei et al. 2008)

2.2 SINTOMATOLOGIA

I sintomi da infezione da FD appaiono sin dall’inizio del germogliamento e tendono gradualmente ad accentuarsi: in varietà più sensibili, possono essere visibili già all’inizio della ripresa vegetativa, con un ritardo del germogliamento stesso e vegetazione stentata, ma i sintomi veri e propri sono visibili verso il mese di luglio, oppure, già dal mese di giugno in annate particolarmente calde e siccitose, quindi quando la pianta fatica maggiormente a difendersi, come nel 2022.

Comunemente sono visibili: l'accartocciamento verso il basso (arrotolamento dei margini) della lamina fogliare fa assumere alla foglia una forma "a triangolo" (Figura 2), il mutamento della consistenza delle foglie che assumono la consistenza della carta con la tendenza a sbriciolarsi se strette tra le mani, il cambio di pigmentazione delle foglie che da verdi, ingialliscono (nelle varietà a bacca bianca), oppure che possono presentare arrossamenti (varietà a bacca rossa), e a differenza delle malattie virali la colorazione può estendersi su tutta la lamina, comprese le nervature.



Figura 2. Foglie di vite che presentano il sintomo. (Uvadatavola.com)

I tralci non lignificano, assumono un aspetto cadente ed una consistenza "gommosa"; possono presentare delle pustole nerastre dall'aspetto oleoso, localizzate soprattutto alla base (figura 3).



Figura 3. Pustole nere di consistenza oleosa su tralcio.(Ersa.fvg.it)

Il germogliamento è irregolare con germogli deboli e andamento a zig-zag e ci può essere disseccamento degli apici, i tralci non lignificati tendono a imbrunire e morire durante l'inverno.



Figura 4. Sintomo su germoglio. (Ersa.fvg.it)

I grappoli possono presentare sintomi diversi a seconda della varietà e del periodo di sviluppo dell'infezione: si può notare verso la metà di giugno il disseccamento delle infiorescenze e se il sintomo si manifesta dopo, ad allegazione avvenuta, i grappolini disseccano ma non cadono, se l'infezione si verifica verso metà agosto, i sintomi apprezzabili, vanno dal disseccamento all'appassimento degli acini.

La comparsa di tali sintomi può essere molto rapida, tanto che nel corso di una settimana o poco più, si può passare da un vigneto apparentemente sano ad un vigneto fortemente sintomatico.

Le cellule in cui è presente il fitoplasma subiscono modificazioni anatomiche, dovute a depositi di callosio. La conseguenza è il collasso degli elementi del floema e un consumo eccessivo di metaboliti che causano vari scompensi alla pianta, fino ad ostruire completamente i vasi linfatici causandone la morte. (G. Belli et al., 2022)

2.2.1 DANNO ECONOMICO

I sintomi determinati da questa fitoplasmosi causano ingenti danni economici, soprattutto se la varietà è particolarmente suscettibile poiché la diffusione è molto rapida e porta alla perdita parziale o totale della produzione. Inoltre, le piante restano debilitate e in 2-3 anni muoiono. (C.Saracco, 2001)

E' stato inoltre dimostrato che la rimozione della parte della pianta che presenta i sintomi non è sufficiente a risolvere il problema, come nemmeno l'applicazione della capitozzatura, in quanto, i germogli rimanenti (o gli eventuali ricacci dati dai nuovi succhioni della pianta capitozzata), possono essere infetti anche se momentaneamente asintomatici.

Per questo è necessaria l'eliminazione dell'intera pianta (legno/radici compresi) e la sostituzione con una nuova barbatella certificata; in questo modo i tempi si allungano da 1 anno per poter rientrare in produzione se si applica la capitozzatura, a 3-4 anni perché la nuova barbatella possa entrare in produzione. (G. Zecchin, 2020)

2.3 TRASMISSIONE E LOTTA

Il fitoplasma viene trasmesso alla vite a causa di un insetto vettore: lo *Scaphoideus titanus*, un cicadellide di origine americana monofago su vite, che si nutre di linfa e lo acquisisce pungendo una vite malata, e andando poi a nutrirsi su un'altra vite inizialmente sana, riesce ad infettarla.

Le femmine depongono le uova da agosto ad ottobre nel ritidoma dei tralci: per questo è importante l'eliminazione del legno oltre che della parte vegetativa, infatti eliminando solo la seconda, il problema si ripresenterebbe l'anno successivo, poiché, verso metà maggio, inizia la schiusura delle uova, che si protrae per diverse settimane.

Oltre agli insetticidi, il monitoraggio attraverso l'utilizzo di trappole cromotropiche di colore giallo, riveste un ruolo fondamentale soprattutto se si tratta del monitoraggio degli "adulti" che a differenza delle forme giovanili possono volare e quindi spostarsi più rapidamente da piante malate a piante sane. (A. Lucchi, A. Alma, 2022)

2.4 RECRUDESCENZA

Negli ultimi anni, la malattia ha subito una notevole recrudescenza, probabilmente a causa dell'aumento delle temperature, infatti si sono registrate catture di insetti vettori adulti fino a metà ottobre. Anche la presenza sempre più massiccia della superficie vitata ha creato un ambiente sempre più favorevole alla proliferazione di *S.titanus*, che trova molto di cui cibarsi e temperature più miti.

L'insieme di questi fattori hanno contribuito alla diffusione dell'insetto, che si riproduce in modo decisamente più massiccio di un tempo: 60 uova all'anno (oggi) contro le 15 registrate negli anni '80. (Alma et al., 1988; Chucho e Thiery, 2014; Bocca et al., in press).

Inoltre, negli ultimi anni sono state ritirate dal commercio diverse molecole usate negli insetticidi a favore di altri prodotti "meno dannosi", ma anche meno efficaci. Per chi pratica la "lotta biologica" questo era già un problema perché potendo utilizzare solo il *piretro* (a base naturale e non selettivo) e a fronte di un numero maggiore di trattamenti obbligatori, non sono stati in grado di arginare il problema. Non solo: molti si sono visti costretti a passare a regime di "lotta integrata" o "convenzionale". (G.U.Belli, 2015)

CAPITOLO 3: LA GENETICA A FAVORE DELLA VITICOLTURA

Purtroppo non esistono metodi per eliminare il fitoplasma dalle viti infette, ma si può solo intervenire a livello di produzione di materiale sano e sull'insetto vettore.

“FD in Italia è una malattia ancora sottoposta a quarantena, con obbligo di lotta secondo il decreto ministeriale n° 32442 del 31 maggio 2000 (Direttiva 2000/29/CE del Consiglio, e successive modifiche)” (E. Angelini, V.Forte, Et.al.).

La termoterapia a cui viene sottoposto il materiale vivaistico non si è comunque dimostrata sufficiente per l'eliminazione del fitoplasma che permane comunque per un buon 25-35% contro il 65-67% del non trattato inoltre le talee hanno tendenza a non attecchire.

Le molecole utilizzate negli insetticidi risultano ad oggi poco efficaci dopo il ritiro dal commercio di diverse di esse perché considerate dannose, perciò, la ricerca si sta orientando verso la selezione di piante di vite resistenti o poco suscettibili al fitoplasma o verso lo studio di prodotti “attivatori di difesa”.

E' importante “Studiare le basi genetiche della resistenza/tolleranza alla FD nelle varietà di vite resistenti per mettere a punto nel medio e lungo termine strategie di lotta in vigneto più sostenibili” (E. Angelini, V.Forte, et.al.).

Poiché la spinta sull'utilizzo degli insetticidi, ad oggi, in un mondo che cerca di essere sempre più sostenibile, è assolutamente anacronistica.

3.1 DIFFERENZE DI SUSCETTIBILITA' IN T. FRIULANO E CHARDONNAY

Parte degli studi sulla FD si sono concentrati sulla diversa suscettibilità che caratterizza i vitigni.

Chardonnay e Pinot grigio, mostrano danni molto gravi da fitoplasmosi, mentre altre varietà, come Tocai friulano o Moscato bianco, manifestano i sintomi in un numero ridotto di piante e limitatamente a pochi tralci, pur essendo sottoposte alla stessa pressione di malattia” (N.Bertazzon, L.Filippin, et.al.; 2021).

Sulla base di queste osservazioni si sono iniziati a studiare i profili trascrittomici nelle varietà che presentano una maggior tolleranza per individuarne i fattori genetici responsabili.

Sono state messe a confronto due varietà che davano risposte diametralmente opposte alla presenza del patogeno: Tocai Friulano (clone ISV6) e Chardonnay (clone R8); ciascuna varietà è stata sottoposta a tre situazioni diverse:

1. Vettore infettivo
2. Vettore sano
3. Assenza del vettore

Come fonte d'inoculo sono stati usati insetti prelevati da vigneti infetti per inoculare la prova sottoposta al vettore infettivo, mentre per le piante sottoposte a vettore sano sono stati usati esemplari di *S.titanus* allevati in condizioni controllate, quindi non infetti.

Ogni tesi è stata riprodotta in tre repliche, ciascuna con una coppia di piantine in modo da poter prelevare i campioni da sottoporre ad analisi in tempi diversi: a 3 giorni e a 6 giorni dall'inserimento del vettore. (N.Bertazzon et.al.; 2020)

3.2 ANALISI MOLECOLARE

E' stato estratto l'RNA totale delle piantine ed è stato sequenziato (RNA-seq) tramite piattaforma "Illumina" ottenendo una serie di sequenze, di lunghezza media di 300 paia di basi, allineate poi sul genoma di riferimento di *Vitis vinifera*.

In questo modo sono stati costruiti i profili di espressione dei geni delle due varietà da comparare per capire in cosa differisce la loro espressione genica (in modo statisticamente significativo), nelle diverse condizioni: vettore sano, vettore infetto, assenza di vettore.

Dall'analisi genetica, che ha comparato il trascrittoma delle due varietà messe a confronto, non infette, a condizioni controllate, ne è emerso un background di espressione genica molto differente. (N.Bertazzon et.al; 2020)

CAPITOLO 4: RISPOSTE DI DIFESA

In generale, le piante possiedono due tipi di strategia di difesa; possono essere meccanismi passivi e preesistenti, ovvero quelli che vanno ad intervenire sulle parti costitutive delle piante e che si riferiscono all'ispessimento della parete o a riserve di composti anti-microbici, deposizione di callosio e/o suberina. Il secondo tipo di difese è costituito da difese attive, ovvero difese che vengono messe in atto in seguito all'ingresso, quindi al superamento delle barriere strutturali, da parte del patogeno e si possono tradurre, ad esempio, in impregnazione con composti fenolici che hanno tossicità diretta sul patogeno.

Le due varietà hanno risposto in maniera molto diversa per la tempistica e nella tipologia di risposta: Tocai friulano dopo tre giorni aveva già messo in campo le proprie modalità di risposta al patogeno, mentre Chardonnay ha impiegato 6 giorni. Tocai friulano ha mostrato un livello di espressione costitutivamente più alto sia di geni codificanti per proteine legate al riconoscimento dei patogeni che per proteine di difesa (*PR-protein*), ha quindi molta più tolleranza in quanto in grado di riconoscere in maniera più tempestiva la presenza del fitoplasma e conseguentemente di attivare le sue difese.

Infatti, nelle primissime fasi dell'infezione si è potuta osservare una modulazione genica in Tocai friulano che riguarda la trascrizione di molti geni coinvolti nell'attivazione di difese costitutive; in particolare era coinvolta la trascrizione di molti geni codificanti per enzimi di elementi di parete come la *cellulosa sintasi* (enzima di sintesi) o la *xiloglucano endotransglicosilasi* (XYH) e la *pectina liasi* (coinvolti nei meccanismi di degradazione/modificazione di parete).

Anche numerosi geni del metabolismo secondario, in particolare quelli coinvolti nel metabolismo fenolico, riferiti alla produzione di *monolignoli* e *stilbeni*, erano maggiormente espressi in Tocai friulano, comprendenti anche le *laccasi* che sono gli enzimi coinvolti nel processo di polimerizzazione della lignina.

La risposta di Chardonnay, avvenuta solo dopo 6 giorni, ha previsto invece la sovraespressione di geni della via dei fenilpropanoidi come la *fenilalanina ammonia liasi* e la *cinnamato 4-idrossilasi*, oltre a diverse *stilbene sintasi* e *laccasi*, in generale, sono state attivate principalmente le fitoalessine che vengono tipicamente utilizzate da varietà suscettibili solo in seguito ad un'infezione.

Le differenze maggiormente significative tra le due varietà prese in esame, riguardano i trascritti coinvolti nel metabolismo dei terpenoidi e sono emerse tra le due tesi di controllo delle differenze trascrizionali riguardanti la biosintesi degli ormoni, nella loro mobilitazione e trasduzione di segnali.

In particolare i DEGs (geni differenzialmente espressi), hanno riguardato geni coinvolti nella sintesi di *jasmonato*, l'ormone responsabile dell'attivazione delle risposte di difesa in seguito all'attacco da parte di un patogeno. Tali geni erano più espressi in Tocai friulano: 8 geni codificanti lipossigenasi (LOX) che portano alla produzione di Jasmonati e 2 geni per l'acido osso-fitodienoico reduttasi (OPR) che è l'enzima specifico per la sintesi di JA.

Inoltre, in Chardonnay, a tre giorni dall'infezione, sono avvenuti ampi cambiamenti dei trascritti in risposta all'insetto sano, mentre la risposta di difesa a *S. titanus* infetto è apparsa molto limitata. Ciò significa che, nelle varietà suscettibili, la presenza del fitoplasma FD, induce un'inibizione delle risposte di difesa mediate dall'acido jasmonico, quindi, mancando il segnale che fa attivare le risposte di difesa indotte, viene garantito il successo dell'infezione.

Tutto ciò si è potuto verificare attraverso la comparazione dei profili dei trascritti delle piante infestate con insetti sani e i trascritti delle piante utilizzate per la tesi di controllo, per verificare solo l'interazione pianta-insetto.

Parallelamente si sono messe a confronto tesi di controllo e tesi riguardante le piante con insetti infetti per avere un riscontro dell'interazione pianta-insetto-patogeno. (V.Forte et.al., 2020)

4.1 REGOLAZIONE GENICA

E' evidente come i profili dei trascritti in risposta al vettore sano e infetto siano diversi tra le due varietà. (tabella 1).

In particolare, Chardonnay sottoposto a vettore sano, ha dato una risposta molto più elevata a 3 dpi che poi ha subito una diminuzione drastica a 6dpi, mentre sono aumentati nel tempo i DEGs (geni differenzialmente espressi) facenti parte di categorie funzionali (GO arricchiti).

Al contrario, nella prova con il vettore infetto, da 3dpi a 6dpi c'è stato un aumento di DEGs e anche un aumento di GO arricchiti, e in entrambi i casi, il numero di

DEGs condivisi tra 3 dpi e 6dpi è stato molto basso: 60 nella prova con vettore sano e 80 nella prova con vettore infetto.

In Tocai friulano invece, il numero di DEGs tra 3 dpi e 6dpi sia nella prova con vettore sano che in quella con vettore infetto, è risultato pressoché costante, ma la sostanziale differenza è rappresentata dal numero di GO comuni tra 3 e 6 dpi nelle due differenti prove: con vettore sano sono stati trovati 2 termini comuni GO, mentre nella prova con vettore infetto sono stati trovati 39 GO comuni.

	HSt				FDSSt			
	Chardonnay		T. friulano		Chardonnay		T. friulano	
	3 dpi	6 dpi	3 dpi	6 dpi	3 dpi	6dpi	3 dpi	6 dpi
n. DEGs	1656	526	815	949	460	1471	1735	1713
n.DEGs regolati	977	160	446	467	242	795	799	853
n.DEGs sotto- regolati	679	366	369	482	218	676	936	860
n. GO arricchiti	57	119	8	11	17	121	118	68

Tabella 1. Numero di geni modulati (DEGs), sovra regolati e sotto regolati, e di processi biologici arricchiti (GO), nella risposta di Chardonnay e Tocai friulano dopo 3 e 6 giorni dall'attacco di *S.titanus* sani o infettivi. (E.Angelini, et.al)

E' evidente una differenza importante nella quantità e tipologia dei cambiamenti trascrizionali indotti dall'infezione: nella varietà suscettibile (Chardonnay) si è vista un'azione ritardata delle risposte di difesa e in seguito all'infezione da fitoplasma FD, quindi nell'interazione pianta-insetto-patogeno si è verificata un'inibizione delle risposte di difesa, in particolare viene inibita la produzione di Jasmonato e del Ca²⁺ che ha soprattutto importanza strutturale e funzione di "messaggero" chimico tra organi e tessuti della pianta.

Contrariamente, la varietà parzialmente resistente (Tocai friulano) ha attuato in maniera tempestiva i cambiamenti trascrizionali che lo hanno portato ad una risposta rapida e molto più efficace e costante nel tempo. (E.Angelini et. al., 2020)

4.2 FENOMENO DEL “RECOVERY”

Il fenomeno del “*recovery*” o “recupero” ha basi fisiologiche non ancora del tutto note, ma è stato definito come la remissione spontanea dei sintomi della malattia, che erano stati precedentemente manifestati, e la guarigione permanente/stabile è considerata tale dopo un periodo minimo asintomatico di 2-3 anni dopo l’espressione della malattia.

Il *recovery* è rilevabile tramite test PCR. Nei vitigni recuperati è stata verificata l’assenza del fitoplasma nella chioma, che quindi non costituiscono più una fonte d’inoculo.

Non solo, si è potuto verificare che in natura, le piante possono essere reinfezate, ma tuttavia in misura minore, indicando un qualche tipo di meccanismo di resistenza acquisito.

Quello che ad oggi si sa per certo è che questo fenomeno è accompagnato da cambiamenti biochimici del floema, come l’accumulo di perossido di idrogeno che costituisce una specie reattiva dell’ossigeno spesso coinvolta nei meccanismi di segnalazione ed ha ruolo anti-microbico, oltre ad accumulo anomalo di callosio e proteine, mentre i meccanismi di difesa dipendono dall’attività segnale di Ca^{2+} e attraverso l’up-regolazione del gene JA (che fa da segnale), che nella varietà suscettibile di riferimento (Chardonnay clone R8) era inibito dalla presenza del fitoplasma. (R. Musetti et. al. 2015)

Di recente è emersa l’ipotesi che la remissione spontanea dei sintomi possa essere spiegata attraverso il coinvolgimento della S.A.R. (system acquired resistance) a carico di funghi endofiti della vite che hanno la funzione di induttori di guarigione, in seguito al potenziamento delle risposte di difesa dell’ospite, denotandone un effetto antagonista contro funghi, batteri, fitoplasmi e altre avveristà che colpiscono la vite. (M. Martini et. al.)

Osservando questo fenomeno si è iniziato ad affrontare il problema da un altro punto di vista, ovvero, partendo dalla capacità intrinseca della pianta di lottare contro il fitoplasma.

In media il 30% delle viti, dopo la guarigione, sviluppano una resistenza al fitoplasma quattro volte superiore a quella della pianta sana.

Purtroppo ad oggi non si riesce a riprodurre artificialmente il *recovery*, ma esperimenti condotti sugli albicocchi hanno evidenziato come, il materiale

prelevato da piante in *recovery* e trapiantato su altre piante abbia trasmesso la resistenza alla malattia. (R.Musetti et. al., 2015).

Sulla base di questo tipo di conoscenze genetico/fisiologiche si possono provare a creare dei prodotti con funzione effettrice, quindi contenenti molecole in grado di “svegliare” le risposte endogene della pianta.

La resistenza può essere indotta da microrganismi non patogeni, sostanze chimiche di sintesi o naturali, come, estratti piante, alghe o derivati microbici.

Una volta avvenuto il riconoscimento dell’elicatore da parte della pianta, viene attivato un sistema di trasduzione del segnale che innesca la risposta di difesa della pianta a livello locale e/o sistemico.

Si può trattare di prodotti di sintesi oppure naturali (chitosano, idrolizzati proteici...) e sono presenti anche in natura, basti pensare ai rizobatteri e funghi presenti nel terreno che fungono da promotori di crescita. (M. De Miccolis et. al.)

5. MIGLIORAMENTO GENETICO

Per miglioramento genetico si intende il processo di modifica del patrimonio genetico di una pianta, al fine di migliorarne le caratteristiche utili all'uomo nelle specie coltivate o allevate.

Gli obiettivi principali riguardanti le piante che attualmente si pone il miglioramento genetico sono: la resistenza a stress biotici e abiotici per la riduzione di interventi chimici ad elevato impatto ambientale, e, nel caso della vite, la selezione dei cloni e l'ottenimento di nuovi vitigni.

Attualmente, grazie alle moderne tecniche biotecnologiche, tale processo risulta essere una combinazione delle osservazioni fenotipiche con le conoscenze genotipiche rese disponibili dallo studio dei genomi.

L'uomo ha iniziato a modificare piante e animali fin dall'origine dell'agricoltura, circa 12000-14000 anni fa, al fine di aumentare la produzione delle derrate alimentari, creare specie maggiormente resistenti a patologie o avversità o ancora addomesticare gli animali, tutto questo andando a modificare la struttura genetica e fenotipica di varie specie di piante o animali rispetto alle loro equivalenti selvatiche. (G.U. Belli, 2015)

In particolare, il miglioramento genetico della vite può essere attuato attraverso 3 tipi di incroci: per combinazione, per ricombinazione o per convergenza.

L'incrocio per combinazione prevede l'unione di due varietà diverse per ottenere un nuovo individuo nella generazione F1 che verrà propagato e coltivato.

L'incrocio per ricombinazione, invece, prevede l'unione di due individui diversi come nel caso del precedente, ma si distingue dal primo perché poi la generazione F1 verrà successivamente re-incrociata con uno dei due parentali per rafforzarne i caratteri (esempio: Muller Thurgau è stato ottenuto da Riesling x Chasselas).

Infine l'incrocio per convergenza permette di combinare caratteri diversi ottenuti da più genotipi, poiché prevede la formazione di due individui F1 derivanti dall'incrocio di quattro varietà diverse e, successivamente, l'incrocio dei due nuovi individui tra di loro per dar luogo a F2. (D. Hartl, E.W. Jones, 2010)

5.1 INDIVIDUAZIONE DEI GENI DI RESISTENZA

L'approccio classico prevede la selezione dei geni di resistenza tramite *incrocio* di una varietà suscettibile con una parzialmente resistente, al fine di individuare i tratti genetici (geni ad eredità semplice o quantitative traits loci, QTL) associati alla resistenza.

L'approccio biotecnologico, invece, prevede la ricerca dei geni d'interesse in qualsiasi organismo da trasferire alla varietà da migliorare tramite trasformazione genetica; in Italia, però, l'utilizzo degli organismi geneticamente modificati (OGM) non è ammesso.

I QTL sono regioni di DNA associate ad un particolare carattere quantitativo a sua volta responsabile di un particolare fenotipo.

Sono stati oggetto di studio della genetica per molto tempo perché sono la caratteristica di riferimento comune della variazione naturale degli eucarioti e rappresentano caratteristiche importanti dal punto di vista agronomico delle piante coltivate (produttività, resistenza a stress biotici e abiotici...). (M.J. Kearsley, G.L. Farquhar, 1997).

QTL che controllano lo stesso carattere genetico possono trovarsi su diversi cromosomi.

Tutti i QTL associati ad un carattere vanno a costituire la struttura genetica del carattere, che indica se è determinato ad esempio da più geni, ma con effetto limitato o pochi geni con un effetto più marcato.

Nel caso preso in esame per lo studio della FD, si vanno ad incrociare Chardonnay R8 con Tocai friulano ISV6, al fine di individuare i QTL associati alla tolleranza alla FD, tra cui quelli coinvolti nell'attivazione di vie di difesa mediate da ormoni, quali jasmonato, acido salicilico e l'etilene.

Questi *pathway* come discusso in precedenza risultano spesso fondamentali nel bloccare gli attacchi da parte di microrganismi patogeni.

In particolare, l'acido jasmonico ha un ruolo fondamentale per contrastare i fitoplasmi.

È stato dimostrato che i fitoplasmi al momento dell'infezione rilasciano molecole chiamate *effettori* che vanno a silenziare l'espressione di alcuni geni della via del jasmonato, silenziamento che si è visto non avvenire nelle varietà meno suscettibili

(E. Angelini et. al., 2020), oltre all'accumulo di perossido di idrogeno, callosio e suberina.

In principio gli agricoltori usavano un metodo molto semplice di selezione massale che consisteva nell'incrociare un numero determinato di parentali tra di loro al fine di ottenere piante migliori dal punto di vista quanti-qualitativo.

Una volta ottenuto il risultato desiderato, di alcuni individui selezionati venivano utilizzati i semi per la propagazione.

Spesso però, si verificava il problema della selezione negativa, poiché il problema di questo approccio è che non si poteva sapere da quale parte del genoma provenissero i geni d'interesse e quindi spesso dagli incroci la progenie non esprimeva i caratteri desiderati dopo la ricombinazione.

In seguito all'applicazione di selezione basata sul genotipo, i genetisti si accorsero dell'importanza dell'individuazione dei QTL per poter controllare la selezione dei geni favorevoli e perché si resero conto che tramite questi incroci si era ottenuta una diminuzione della variabilità con conseguente perdita di biodiversità.

Anche nel caso della sperimentazione presa in esame, il primo passo nell'approccio è stato l'individuazione dei QTL nelle popolazioni segreganti ottenute da incrocio tra Chardonnay (susceptibile) e Tocai friulano (parzialmente resistente) che dopo la selezione dei tratti genotipici e fenotipici saranno integrati in una mappa genetica, per circoscrivere i tratti cromosomici contenenti i geni di resistenza alla FD. (L. Filippin et.al. 2022)

5.1.1 MARCATORI MOLECOLARI

Come riportato da Matta et al. (1996) la possibilità che ha una pianta di contrastare l'attacco da parte dei patogeni e i meccanismi che utilizza a tal fine dipendono dalle sue caratteristiche genetiche.

Non essendo possibile l'inserimento dei geni d'interesse all'interno di un genoma differente tramite trasformazione genetica per costruire piante geneticamente modificate (PGM) e quindi mantenere intatto il genoma dell'originale più il gene desiderato, si ha soltanto la possibilità di incrociare due individui con genomi differenti.

Il risultato dell'incrocio è una progenie di individui con il 50% del genoma di entrambi i parentali che quindi perderanno il genoma originario della varietà

commerciale e saranno modificate anche le caratteristiche del vino che costituisce il prodotto finale.

Questo rende l'approccio classico molto più complicato e lungo nel processo di creazione di un ibrido che non faccia perdere le caratteristiche organolettiche del prodotto originale e allo stesso tempo abbia le caratteristiche di resistenza desiderate.

Ad oggi, per velocizzare il processo, vengono utilizzati i marcatori molecolari che sono sequenze di DNA strettamente associate ad un QTL, con cui si può fare un selezione assistita, partendo sempre dall'incrocio di due varietà (donatore e varietà commerciale), al quale non seguirà più la valutazione fenotipica che sarà sostituita dalla genotipizzazione con marcatori molecolari per la determinazione dei polimorfismi nel DNA, per capire a quali piante è stato trasferito il carattere desiderato.

I marcatori più utilizzati sono i microsatelliti grazie al loro alto grado di polimorfismo, come anche gli SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) che rendono più semplice la diagnosi di presenza/assenza di quello specifico tratto genetico. (M. Reffiner et. al., 2019)

I marcatori molecolari a DNA hanno anche il vantaggio di non essere influenzati dalle variazioni ambientali nella valutazione del trasferimento della tolleranza e di non avere la necessità di aspettare la fase vegetativa nella quale si manifesta il carattere, perché questo, viene individuato a livello di DNA.

I marcatori molecolari sono sostanzialmente un frammento di DNA associato ad un tratto di cromosoma e sono uno strumento prezioso per determinare l'assenza o la presenza di un determinato gene o le differenze esistenti in quei tratti di DNA a cui sono associati.

L'ideale è avere marcatori ad un massimo di 5 cm di distanza dal carattere di interesse ed averne due che fiancheggino il QTL, quindi la zona del genoma che controlla il carattere, ma questo non è sempre possibile, perché talvolta bisogna prendere in considerazione intervalli >5cm che potrebbero comprendere centinaia di geni diversi per poi solo successivamente poter restringere il campo.

L'identificazione di nuovi marcatori molecolari da aggiungere all'intervallo QTL permette di individuare un intervallo inferiore per poter ottenere una nuova popolazione segregante.

Una volta che un QTL ad effetto maggiore è stato identificato, la risoluzione della sua posizione di mappa deve essere adeguatamente migliorata per isolare una regione cromosomica sufficientemente piccola per essere sequenziata.

La selezione assistita da marcatori (MAS, Marker Assisted Selection) consente di accorciare i tempi di selezione, di inserire più fonti resistenza in una pianta o altre caratteristiche desiderate e analizzare più di una caratteristica contemporaneamente e eliminare dal genoma tratti del genoma associati a caratteri indesiderati.

Nel caso della resistenza alle malattie, come nel caso preso in esame per l'individuazione dei tratti genetici associati alla resistenza alla FD, la finalità della selezione attraverso i marcatori è quella di ottenere piante con una resistenza durevole nel tempo e in un ambiente favorevole allo sviluppo del patogeno.

Questa esigenza nasce dal fatto che i patogeni hanno sviluppato la capacità di superare le resistenze messe in atto dalle piante durante la loro evoluzione, quindi nel caso ci sia più di un tratto genomico che individua resistenze di tipo diverso per lo stesso patogeno, la capacità di superare i meccanismi di resistenza risulta molto bassa e per questo si può parlare di piante con resistenza ad ampio spettro (durevole). (M. Reffiner et. al., 2019)

5.1.2 REGIONI TRASPOSONICHE

Gli elementi trasponibili sono sequenze ripetute di genoma capaci di replicarsi e spostarsi all'interno di esso in maniera autonoma, rivestono un ruolo fondamentale nella storia evolutiva poiché dotati di una notevole variabilità che poi contribuisce alla variabilità genomica generale.

Questi elementi ripetuti possono essere classificati in diversi gruppi organizzati in "famiglie", caratterizzate da specifiche localizzazioni e organizzazioni genomiche.

Il gruppo più rappresentativo è appunto quello degli elementi trasponibili o "trasposoni" che a sua volta è organizzato in elementi retrotrasponibili e trasponibili capaci di spostarsi da una zona all'altra del genoma.

Gli elementi trasponibili o trasposoni sono presenti in numero minore di copie e possono avere effetto attivatore, inattivatore o nullo sui geni adiacenti (funzione di Enhancer).

I retrotrasposoni invece vengono distinti in base alla presenza di lunghe sequenze ripetute alle loro estremità (100-5000 bp) in LTR che contengono al loro interno

una sequenza che regola la trascrizione e Non-LTR dove la trascrizione è regolata da promotori interni, in entrambi i casi hanno un meccanismo di replicazione che viene detto “copia-incolla” quindi molto veloce che consente di aumentare rapidamente il numero di copie nel genoma.

La loro natura mobile e la velocità di replicazione suggeriscono come molto probabilmente siano coinvolti nelle risposte di difesa dei vegetali, anche perché molti restano inattivi durante lo sviluppo per poi attivarsi in seguito a stress biotici e abiotici, per questa loro grande importanza sono considerati dei marcatori, fisici perché rappresentano delle vere e proprie “regioni” ripetute e poiché attivandosi, quel gene specifico, di conseguenza attiva una risposta, ed è importante capire di quale gene si tratta e capirne la correlazione di risposta.

Gli elementi trasponibili costituiscono il 50-80% del genoma dei vegetali che quindi si può dire abbiano elevata variabilità genetica e un grande potenziale evolutivo. (M. Graziani, 2012)

5.2 IBRIDI RESISTENTI

Lo studio di nuovi incroci e gli esperimenti di infezione da FD non possono essere svolti in laboratorio, ma solo in vigneto, ponendo le nuove piante alle condizioni pedo-climatiche presenti in natura, i fitoplasmi infatti non sono coltivabili in vitro, ma ne è permesso lo studio solo tramite la pianta ospite. Inoltre, l’interesse ultimo di questi studi è l’ottenimento di piante produttive e adatte alle condizioni presenti in natura, nella zona d’interesse.

Ora, è vero che un ibrido derivante da incrocio avrà il 50% del genoma dei parentali, quindi tendenzialmente si adatterà alle condizioni a cui sono abituati i parentali, ma si possono pur sempre ottenere ricombinazioni geniche e differenti caratteri fenotipici.

Una volta creata una mappa satura di marcatori molecolari di Tocai friulano ISV6, ovvero una mappa genetica che permette di individuare all’interno del genoma i tratti genetici associati alla tolleranza, questi possono essere uniti ai dati fenotipici rilevati in campo e utilizzati insieme per creare una mappa che circoscriva i tratti cromosomici contenenti i geni d’interesse per la resistenza alla Flavescenza dorata.

La mappa genetica verrà poi confrontata con i dati riguardanti i geni differenzialmente espressi (DEGs) nelle due varietà e successivamente si potrà passare ai veri e propri incroci interspecifici. (E. Angelini et al., 2020)

5.3 LA TECNICA DELL'INCROCIO

Nell'esecuzione degli incroci è importante essere molto precisi per evitare errori e inquinamenti.

I fiori della pianta madre vengono eliminati con delle forbicine poiché alcuni di essi possono essere già stati fecondati da polline ignoto, quindi viene prelevata la caliptra cercando di non danneggiare il pistillo, quindi si procede all'emasculazione ovvero l'asportazione di tutti gli stami.

Il grappolo viene poi protetto da un sacchetto in modo da non poter essere fecondato da polline, poiché si applicherà un'impollinazione manuale con i polline precedentemente prelevato da fiori di un'altra pianta di vite fino a quando non si vedranno le piccole bacche in formazione (fecondazione avvenuta).

Le bacche vengono lasciate in pianta fino a maturazione avvenuta, cioè sino a quando i vinaccioli sono in grado di germinare.

I grappoli vengono raccolti e conservati fino ad inverno avanzato e si possono prelevare poi i vinaccioli.

Verso la fine di febbraio i suddetti verranno piantati in cassette o vasetti di terracotta a temperatura controllata (15-16°C) e in un paio di mesi dovrebbero crescere delle piantine nate da incrocio.

L'incrocio può essere intraspecifico cioè tra due viti della stessa varietà o interspecifico ovvero tra due varietà diverse, è un tipo di moltiplicazione gamica, mentre l'autofecondazione non viene utilizzata in campo viticolo perché potrebbe portare a depressione da inbreeding e l'omozigosi non è richiesta in campo viticolo.

Nel caso dell'incrocio tra Chardonnay e Tocai friulano si può parlare di incrocio interspecifico per ricombinazione, poiché vengono coinvolte solo due varietà, si tratta di un processo lungo a causa dei lunghi tempi di generazione della vite rispetto ad altre specie. È poi una pianta molto difficile da manipolare geneticamente a causa della sua eterozigosi ed alla sua conseguente intolleranza all'ibridazione; è quasi sempre impossibile trasferire un singolo carattere, come la

resistenza ad una malattia da una varietà ad un'altra senza cambiare in modo significativo la qualità della varietà ricevente. (N. Bertazzon et.al., 2020)

CONCLUSIONI

Questo elaborato si è concentrato su una fitoplasmosi, la Flavescenza dorata (FD), che conosciamo dagli anni '50 e che è tornata di nuovo attuale in seguito alle ondate epidemiche registrate negli ultimi anni che hanno messo in seria difficoltà la viticoltura del nord Italia.

I fitoplasmi sono parassiti obbligati difficili da studiare perché non coltivabili e lo studio in relazione all'ospite risulta più laborioso e allunga i tempi di diagnosi in quanto è necessario aspettare le diverse fasi fenologiche in cui possono essere osservati i sintomi o in cui è possibile rilevare la positività stessa al fitoplasma, verificabile tramite PCR solo da campioni di tessuti vegetali (non presenti in inverno).

La vite è una pianta dotata di capacità intrinseche di sopravvivenza che le consentono di riconoscere e mettere in atto i suoi sistemi difensivi in presenza di stress biotici ed abiotici, tuttavia nel corso della storia dell'evoluzione i parassiti hanno spesso sviluppato una resistenza a questi sistemi di difesa, per cui ad oggi si cerca il metodo per contrastarli utilizzando il miglioramento genetico.

La selezione da sempre è stata utilizzata in vite, inizialmente tramite la sola selezione clonale per aumentare ad esempio la quantità dei raccolti, e ad oggi si concentra soprattutto sulla qualità delle produzioni della vite che ormai è diventata una coltura intensiva.

Un tempo la maggiore biodiversità consentiva un'interazione maggiore tra animali e vegetali di specie diverse che sfruttavano il meccanismo di antagonismo, ristabilendo naturalmente l'equilibrio tra organismo e patogeni.

Il miglioramento genetico applicato al caso studio presentato in questo elaborato prevede lo studio dei meccanismi trascrittomici di Tocai friulano ISV6, che dopo le osservazioni fatte su piante infette ha dimostrato una parziale resistenza al fitoplasma.

Dunque, l'obiettivo è capire come trasferire quei geni associati alla resistenza in una varietà suscettibile come Chardonnay R8.

In Italia la trasformazione genetica non è ammessa, quindi per il trasferimento di geni di resistenza viene utilizzata la tecnica dell'incrocio, che non consente però di mantenere il corredo genetico originario, ma si avrà un ibrido con metà corredo cromosomico di entrambi i parentali.

Lo studio si basa sull'individuazione dei QTL che sono regioni di DNA associate ad un particolare carattere quantitativo a sua volta responsabile di un particolare fenotipo, ma capire dove si trovino all'interno del genoma non è sempre facile e per questo vengono utilizzati i marcatori molecolari ovvero sequenze di DNA strettamente associate ad un QTL, la cui caratteristica più importante è il polimorfismo (microsatelliti e SCAR sono quelli a più elevato grado di polimorfismo nel caso della vite).

I marcatori permettono anche di ovviare al problema delle tempistiche molto lunghe perché consentono di non dover aspettare la fase vegetativa nella quale si manifesta il carattere perché viene individuato a livello di DNA, e inoltre non sono influenzati dalle variazioni ambientali nella valutazione del trasferimento della tolleranza.

Nel caso preso in esame per l'individuazione dei tratti genetici associati alla resistenza alla FD in Tocai friulano, la finalità della selezione attraverso i marcatori è quella di ottenere piante con una resistenza durevole nel tempo e in un ambiente favorevole allo sviluppo del patogeno, tramite l'individuazione di più di un tratto genomico che individua resistenze di tipo diverso per lo stesso patogeno, limitando così la sua capacità di evolversi verso meccanismi di resistenza nei confronti di quelli di difesa dell'ospite.

Una volta creata una mappa genetica satura di marcatori molecolari di Tocai friulano ISV6, si possono individuare i tratti genetici associati alla tolleranza che possono essere uniti ai dati fenotipici rilevati in campo e utilizzati insieme per creare una mappa che circoscriva i tratti cromosomici contenenti i geni d'interesse per la resistenza alla Flavescenza dorata.

La mappa genetica verrà poi confrontata con i dati riguardanti i geni differenzialmente espressi (DEGs) nelle due varietà e successivamente si potrà passare ai veri e propri incroci interspecifici.

I vinaccioli ottenuti dall'incrocio possono essere piantati in vasetto e dar luogo a delle barbatelle derivanti da incrocio interspecifico per ricombinazione.

La vera difficoltà risiede nel fatto che non è possibile tramite questa tecnica trasferire esclusivamente il/i carattere/i desiderati, perciò si incorre nel rischio di modificare le caratteristiche organolettiche dell'uva, quindi poi del vino che è il prodotto di interesse commerciale finale.

Ne consegue che le prove saranno numerose e ci saranno diverse valutazioni delle popolazioni F1 ottenute al fine di individuare le piantine portanti i geni d'interesse e che garantiscano un prodotto finale conforme alle esigenze.

Le ricerche sono attualmente in atto e richiederanno tempo, per il momento non si può far altro che utilizzare al massimo le competenze agronomiche, i monitoraggi e l'utilizzo di insetticidi.

BIBLIOGRAFIA

Belli, U., (2015), *Come le malattie delle piante hanno inciso su vita e storia dell'uomo*, Verona, Edizioni l'informatore agrario.

Saracco, C., (2001), *Le malattie della vite*, Bologna, Edagricole-Edizioni Agricole della società Gruppo Calderini Edagricole s.r.l.

Sicheri, G., (2008) *Viticultura*, Milano, Ulrico Hoepli Editore S.p.A,

Hartl, D.L., Jones E.W., (2010), *Genetica, Analisi di geni e genomi*, Napoli, Edises.

Belli, U., (2012), *Elementi di patologia vegetale*, Padova, Piccin Nuova Libreria S.p.A.

Ferrari, M, Marcon, E., Menta, A., (2006), *Fitopatologia, entomologia agraria e biologia applicata*; Firenze, RCS Libri S.p.A.

Grisan, S., Martini, M., Musetti, R., & Osler, R. (2011). Development of a molecular approach to describe the diversity of fungal endophytes in either phytoplasma-infected, recovered or healthy grapevines. *Bulletin of Insectology*, 64(Suppl), S207-8.

Rossi, M., Pesando, M., Vallino, M., Galetto, L., Marzachi, C., & Balestrini, R. (2018). Application of laser microdissection to study phytoplasma site-specific gene expression in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Microbiological research*, 217, 60-68.

Musetti, R., Ermacora, P., Martini, M., Loi, N., & Osler, R. (2013). What can we learn from the phenomenon of "recovery". *Phytopathogenic Mollicutes*, 3(1), 63-65.

Kearsey, M. J., & Farquhar, A. G. L. (1998). QTL analysis in plants; where are we now?. *Heredity*, 80(2), 137-142.

Malembic-Maher, S., Salar, P., Filippin, L., Carle, P., Angelini, E., & Foissac, X. (2011). Genetic diversity of European phytoplasmas of the 16SrV taxonomic group and proposal of 'Candidatus Phytoplasma rubi'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(9), 2129-2134.

Barcaccia, G., & Falcinelli, M. (2006). *Genetica e genomica* (Vol. 2). Liguori.

Raffeiner, M., Zini, E., & Letschka, T. (2019). Analisi di accessioni di vite con marcatori molecolari associati a geni di resistenza a fillossera, antracnosi e tumore batterico. *Laimburg Journal*, 1.

Pellacani, N., (2019), *Applicazione bio-elicitori in vigneto per migliorare la composizione delle uve* [tesi di laurea], Bologna: Università degli studi di Bologna.

Cane, N., (2011), *La tipizzazione molecolare rivela la diversa origine geografica della Flavescenza dorata della vite e del suo vettore Scaphoideus titanus Ball* [tesi di laurea], Torino: Università degli studi di Torino.

Graziani, M., (2012), *Mappaggio finale di un QTL principale per la resa in granella sul cromosoma 3B di frumento duro* [tesi di dottorato], Bologna: Alma Mater Studiorum-Università di Bologna.

Belli, G., Bianco, A., Casati, P., Scattini, G., (2002), *La flavescenza dorata della vite in Lombardia*, Milano: Università degli studi di Milano, Istituto di patologia vegetale, Servizio fitosanitario regionale.
<https://www.regione.lombardia.it/wps/wcm/connect/1af7e5b0-be7e-4bac-8250-882dadaa8527/Flavescenza.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=ROOTWORKSPAC-E-1af7e5b0-be7e-4bac-8250-882dadaa8527-kIh6EVN>

Lucchi, A., Alma, A., (2022), *Scaphoideus titanus: ruolo epidemiologico, monitoraggio e possibilità d'intervento*, Toscana, Servizio fitosanitario regionale.
https://www.agr.unipi.it/wp-content/uploads/2022/03/webinar_25marzo22.pdf

Portella, G., Vecchio, G., (2003), *Le tecniche molecolari: dalla ricerca alla diagnostica*, Napoli, Università Federico II, Rivista di attualità diagnostiche, *EsaDia*.
<https://www.roche.it/content/dam/rochexx/roche-it/documenti/diagnostic/pdf/pubblicazioni/Esadia13.pdf>

Morone, C., Gotta, P., (2006) *Giallumi della vite*, Guida al riconoscimento, Piemonte, Servizio fitosanitario regionale, Collana "Agricoltura", 47.
<https://docplayer.it/23984343-Giallumi-della-vite-guida-al-riconoscimento-schede-di-fitopatologia.html>

Angelini, E., Forte, V., Velasco, R., Faggioli, F., Ferretti, L., Gargani, E., Roveresi, P.F., (2021), *La Flavescenza dorata della vite*, C.R.E.A., Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria.
https://www.senato.it/application/xmanager/projects/leg18/attachments/documento_evento_procedura_commissione/files/000/318/201/Flavescenza_dorata_relazione_CREA_per_Commissione_Agricoltura_del_Senato.pdf

Bertazzon, N., Forte, V., Filippin, L., Casarin, S., Angelini, E., (2020), *Le risposte di difesa di due varietà diversamente sensibili alla Flavescenza dorata della vite:*

studi e recenti prospettive, Conegliano, C.R.E.A., Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, ATTI giornate fitopatologiche, 2, 437-446.

Angelini, E., Bertazzon, N., Casarin, S., (2022), *Alla ricerca delle fonti di resistenza alla Flavescenza dorata*, Conegliano, Vitenda 2022.
<http://www.viten.net/files/45b/45b1254d02688610711e308b57db3989.pdf>

Bertazzon, N., Bagnaresi, P., Forte, V., Mazzucotelli, E., Filippin, L., Guerra, D., Zechini, A., Cattivelli, L., Casarin, S., Angelini, E., (2021), *Studio dei meccanismi responsabili delle differenze di suscettibilità delle varietà di vite alla Flavescenza dorata*, Conegliano, Infowine.
https://www.infowine.com/it/articoli_tecnici/studio_dei_meccanismi_responsabili_delle_differenze_di_suscettibilit%C3%A0_delle_variet%C3%A0_di_vite_alla_flavescenza_dorata_sc_19841.htm