

Relazione ad invito

Genomica applicata in viticoltura: strumenti e prospettive

Riccardo Velasco

Direttore del Centro di Viticoltura ed Enologia - CREA VE

Da poco più di un decennio, grazie allo sforzo di numerosi gruppi di lavoro in larga prevalenza italiani, francesi ed americani, abbiamo a disposizione la sequenza del genoma della vite, con genoma di riferimento riconosciuto a livello internazionale, nel tempo affinati nei suoi dettagli ed accompagnato da un sempre più ampio numero di genomi di varietà di *V. vinifera* che costituiscono una ricchezza di informazioni senza eguali in campo agrario. Se vogliamo fare un primo bilancio di questi primi dieci anni di post-genomica della vite si può affermare con un certo grado di soddisfazione che il contributo italiano presso centri nazionali ed esteri è stato ancora più determinante nel definire nuovi strumenti come (i) banche dati di polimorfismi presenti nei numerosi genotipi sequenziati, (ii) analisi del trascrittoma (insieme dei geni espressi) di una moltitudine di tessuti e stadi fenologici della pianta, (iii) correlazione tra genotipi e fenotipi con la conseguente identificazione dei geni

candidati per determinate funzioni di interesse, che hanno posto le basi per una nuova concezione del miglioramento genetico e comprensione della fisiologia della pianta. A fronte di una moltitudine di strumenti cosa resta da fare e quali prospettive per una apprezzabile crescita della viticoltura, nazionale ed internazionale? Di certo una maggiore sinergia tra fisiologia e genetica rappresenta il collo di bottiglia alla comprensione della biologia della pianta e della sua migliore gestione. La necessaria correlazione fenotipo/genotipo è sicuramente la sfida del prossimo decennio. Capitalizzare le informazioni genetiche e gli strumenti genomici rappresenta quindi un obbligo a fronte dei tanti sforzi compiuti e delle esigenze di una viticoltura economicamente ed ecologicamente sempre più sostenibile. All'orizzonte, infine, le nuove biotecnologie aprono ancor più nuovi scenari, quali oggi le reali prospettive?

Sessione Miglioramento genetico e analisi “omiche”

Verso la definizione di una dettagliata mappa trascrittomico dello sviluppo della bacca

Fasoli M.^{1*}, Richter C.L.¹, Zenoni S.², Dal Santo S.², Sandri M.², Zuccolotto P.³, Pezzotti M.², Dokoozlian N.¹, Tornielli G.B.²

* marianna.fasoli@ejgallo.com

¹ E. & J. Gallo Winery, Modesto CA, USA

² Biotechnology Department, University of Verona

³ Department of Economics and management, University of Brescia

Il progresso delle conoscenze genomiche e delle tecnologie di analisi di espressione genica su larga scala ha consentito di studiare e interpretare i cambiamenti fisici, biochimici e fisiologici che avvengono durante la crescita e maturazione della bacca attraverso l'analisi del trascrittoma. Tuttavia questi approcci hanno, in anni recenti, fornito informazioni ancora frammentarie poiché generalmente solo alcune fasi dello sviluppo dell'acino sono state analizzate dettagliatamente.

Per identificare gli eventi molecolari associati alle fasi dello sviluppo della bacca e quindi definire una mappa trascrittomico, è stata condotta un'analisi RNA-seq su bacche di Cabernet Sauvignon e Pinot noir raccolte settimanalmente dall'allegagione alla maturazione per tre anni consecutivi, per un totale di 219 campioni.

L'analisi dei risultati ha permesso di definire profili di espressione coerenti e conservati nelle due varietà e nelle tre annate nonché riarrangiamenti del trascrittoma, principalmente associati alla fase di invaiatura, che contraddistinguono le varietà e che hanno un evidente riscontro nel diverso accumulo di metaboliti nelle bacche delle due cultivar a maturazione. Inoltre è stato possibile evidenziare due rapide transizioni che coinvolgono geni il cui profilo di espressione definisce in modo preciso la tempistica della riprogrammazione molecolare che caratterizza l'inizio della maturazione. Questi geni rappresentano biomarcatori che potrebbero controllare i primissimi eventi trascrizionali associati alla transizione fra le fasi di crescita erbacea e di maturazione, rilevabili già diversi giorni prima dell'invaiatura. Infine, utilizzando la porzione più variabile del trascrittoma, è stato possibile delineare in forma preliminare un ideale modello del percorso trascrittomico che definisce dettagliatamente la progressione dello sviluppo della bacca.

Parole chiave: sviluppo della bacca, trascrittomico, invaiatura, maturazione.

Studio dei meccanismi di resistenza a *Plasmopara viticola* in vite: il caso della cultivar di *Vitis vinifera* Mgaloblishvili

Toffolatti S.L.^{1*}, De Lorenzis G.¹, Costa A.², Maddalena G.¹, Bonza M.C.², Pindo M.³, Stefani E.³, Cestaro A.³, Passera A.¹, Casati P.¹, Failla O.¹, Bianco P. A.¹, Maghradze D.⁴, Quaglino F.¹

* silvia.toffolatti@unimi.it

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali, Università di Milano

² Dipartimento di Bioscienze, Università di Milano

³ Centro Ricerca e Innovazione, Fondazione E. Mach, San Michele all'Adige (TN)

⁴ National Wine Agency of Georgia, Tbilisi (Georgia) and Technical University of Georgia, Tbilisi (Georgia)

Ipotesi. La vite europea, *Vitis vinifera* L., è considerata estremamente sensibile all'agente della peronospora, *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. e De Toni, a causa dell'assenza di co-evoluzione con il patogeno, originario del Nord America. Lo screening del germoplasma Caucasicco, considerato il centro primario di domesticazione della vite, ha portato all'identificazione di fonti di resistenza a *P. viticola*, come la cv georgiana Mgaloblishvili N. Questa recente scoperta ha offerto la possibilità unica di esplorare i meccanismi alla base della resistenza all'interno della specie.

Materiali e metodi. L'interazione tra patogeno e Mgaloblishvili è stata valutata tramite microscopia confocale e RNA-seq a diverse ore dall'inoculazione sperimentale (0, 24, 48, 72), analizzando gli aspetti fenotipici dell'interazione pianta-patogeno e identificando i geni differenzialmente espressi dal trattamento.

Risultati. La microscopia confocale ha evidenziato uno sviluppo ridotto di *P. viticola* a partire dai primi stadi dell'infezione associato ad una ridotta capacità di sporulazione. L'approccio di trascrittomico ha consentito di osservare che il patogeno induce l'espressione differenziale di geni codificanti per recettori coinvolti nel riconoscimento dei patogeni, fattori di trascrizione regolati dell'etilene e per la biosintesi di composti terpenici.

Principali conclusioni. I risultati suggeriscono la presenza di un sistema di difesa in *V. vinifera* modulato dal patogeno che potrebbe essere sfruttato nei programmi di miglioramento genetico per la resistenza a *P. viticola*.

Parole chiave: microscopia confocale, RNA-seq, recettori chinasi, etilene.

Miglioramento genetico assistito per la resistenza a peronospora, oidio e fillossera in FEM

Vezzulli S.^{1*}, Dolzani C.¹, Nicolini D.¹, Migliaro D.², Gratl V.³, Stedile T.¹, Zatelli A.¹, Dallaserra M.¹, Clementi S.¹, Dorigatti C.¹, Velasco R.¹, Zulini L.¹, Stefanini M.¹

* silvia.vezzulli@fmach.it

¹ Centro di Ricerca e Innovazione, Fondazione E. Mach, San Michele all'Adige (TN)

² Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Centro di Ricerca per la Viticoltura (CREA-VIT), Conegliano (TV)

³ Centrum of Chemistry and Biomedicine, University of Innsbruck (Austria)

Introduzione. Il programma di miglioramento genetico per le resistenze a stress biotici è iniziato nel 2010. Inizialmente è stata condotta una caratterizzazione sia genotipica che fenotipica di materiali acquisiti da altri programmi di breeding, europei ed extra-europei, e di materiale selvatico raccolto nel 2011 in boschi del New Jersey (USA). Il Golden Book FEM del breeder è stato arricchito con una serie di parentali adatti a diversi obiettivi: i genotipi conosciuti nei database internazionali e i genotipi sconosciuti, imparentati e non, sono stati impiegati come linee parentali nel processo di introgressione e di piramidazione di loci (regioni genomiche) di interesse.

Materiali e metodi. Pianificati e ottenuti gli incroci, la valutazione delle progenie è avvenuta secondo un processo di Marker-Assisted Selection (MAS) ottimizzato per mantenere un compromesso tra efficienza e contenimento dei costi. Prima è avvenuta la selezione fenotipica (test in serra) in base al tipo di malattia e al numero di loci attesi per la medesima malattia. Poi si è proceduto con lo screening molecolare in base ai loci specifici attesi nei parentali.

Risultati. Run1, Ren1, Ren3 e Ren9 sono i loci associati alla resistenza all'oidio presenti nel programma FEM fin dall'inizio; molto recentemente è stato introdotto anche il locus Ren2 proveniente da un programma di breeding USA. Riguardo ai loci associati alla resistenza alla peronospora, Rpv1, Rpv10 e Rpv12 sono ben rappresentati nel piano di incroci. Speciale attenzione è stata data al super-locus Rpv3 al quale sono associate vari aplotipi (varianti) di resistenza: la variante Rpv3-1 è la più diffusa nei materiali genetici impiegati ma, grazie agli studi di base pregressi, di recente è stato possibile inserire nel programma FEM anche le varianti Rpv3-2 e Rpv3-3. Anche il locus Rdv1 di resistenza alla fillossera è presente. Risultati aggiornati e dettagliati saranno presentati.

Conclusioni. Su un totale di 650 genotipi selezionati, il 32% presenta 2 loci di resistenza a peronospora e 2 a oidio e il 6% porta 3 loci di resistenza a peronospora e 3 a oidio.

Ringraziamenti. Gli autori ringraziano M. Stella Grando e Silvia Lorenzi per aver contribuito alla prima fase della MAS Vite presso FEM.

Parole chiave: Marker-assisted selection, Loci-R, ibridi vite, *Vitis*.

Caratterizzazione di nuovi prototipi di varietà tolleranti alle principali malattie fungine

Stefanini M.^{*}, Vezzulli S., Dallaserra M., Clementi S., Dorigatti C., Zatelli A., Zulini L.

* Marco.stefanini@fmach.it

Centro di Ricerca ed Innovazione, Fondazione Edmund Mach San Michele all'Adige (TN)

Ipotesi. Nell'ambito dell'attività di Miglioramento Genetico della Vite sviluppatosi in FEM è stato intrapreso un programma di incroci nel tentativo di ottenere genotipi tolleranti a peronospora e oidio. I primi incroci sono stati effettuati con le varietà tipiche del Trentino e genotipi portatori di fonti di resistenza provenienti da diversi Centri di ricerca Europei. Dal 2007 ad oggi sono stati ottenute diverse popolazioni di incrocio ed in particolare con le varietà trentine Teroldego, Marzemino, Nosiola, utilizzando le varietà resistenti Merzling e Bianca e Kulneany

Materiali e metodi. Nel triennio 2015-2017 di 3 genotipi (TeroldegoX Merzling), 3 genotipi (Marzemino X Merzling) e 1(NosiolaX Bianca) e 1 (Nosiola X Kulneany) sono stati raccolti i dati:

- di tolleranza alle diverse malattie fungine sia sulla foglia che sul grappolo, oltre alla presenza di attacchi di fillossera ed erinosi.
- alla vendemmia i dati di produzione delle piante, e le caratteristiche del mosto,.

Le uve di ogni genotipo sono state vinificate e per ogni annata i vini sono stati sottoposti ad analisi sensoriale.

Risultati. I genotipi valutati manifestano caratteri di tolleranza alle principali malattie fungine con valori dei codici OIV relativi tra il 7 e 9, i parametri produttivi e qualitativi sono equiparabili ai genotipi tolleranti coltivati in confronto. Sensorialmente 5 genotipi risultano interessanti e i vitigni a bacca rossa presentano livelli di diglucosidi paragonabili ai livelli della *V. vinifera*.

Conclusioni. Al termine di questa prova 5 genotipi si sono ritenuti, per tutti i caratteri rilevati, interessanti e pertanto saranno raccolti i dati per l'iscrizione al Registro Nazionale delle Varietà di Vite.

Parole chiave: Sostenibilità resistenze qualità dei vini.

Applicazioni localizzate di Jasmonati per modulare il contenuto in aromi e emissione di VOCs in grappoli e foglie di vite

D’Onofrio C.

claudio.donofrio@unipi.it

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, Università di Pisa

Recentemente è stato riportato che l’applicazione di jasmonati sull’intera chioma di Sangiovese ritardano la maturazione di circa una settimana e stimolano la biosintesi degli aromi delle uve incrementando significativamente il contenuto aromatico dei vini (D’Onofrio et al., 2017). L’obiettivo attuale è verificare come le applicazioni di jasmonati localizzate a livello di grappoli o foglie influenzino l’accumulo degli aromi nelle uve e nelle foglie e l’emissione dei composti volatili organici (VOCs) di questi organi.

Grappoli o foglie di Sangiovese sono stati trattati con jasmonato di metile (MeJa) monitorando l’emissione dei VOCs utilizzando un apparato con cartucce assorbenti appositamente realizzato. Grappoli e foglie sono stati campionati per determinare anche il contenuto in aromi liberi e legati dei tessuti attraverso le procedure di estrazione SPE e SPME.

I trattamenti localizzati a livello fogliare hanno incrementano fortemente il contenuto in aromi delle foglie senza influenzare significativamente la biosintesi degli aromi nel grappolo, e viceversa per i trattamenti localizzati sui grappoli. I trattamenti a livello di grappolo hanno incrementato principalmente il contenuto in monoterpeni, mentre a livello fogliare sono aumentati maggiormente i sesquiterpeni. Inoltre, i trattamenti con MeJa hanno indotto forti aumenti nell’emissione dei VOCs, principalmente monoterpeni e sesquiterpeni.

I risultati indicano chiaramente che i trattamenti con jasmonati che hanno come unico obiettivo incrementare il contenuto aromatico dei vini possono essere limitati ai soli grappoli. Inoltre, la forte variazione nell’emissione dei VOCs sia di grappoli che foglie indotte dall’applicazione dei jasmonati può avere delle importanti conseguenze nell’interazione della vite con gli insetti dannosi e utili.

Parole chiave: monoterpeni, sangiovese, sesquiterpeni, *Vitis vinifera*.

Linking monoterpenes and abiotic stress resistance in grapevine

Cappellin L.¹, Grando M.S.^{1,2}, Biasioli F.¹, Bertamini M.^{2*}

* massimo.bertamini@unitn.it

¹ *Research and Innovation Centre, Fondazione Edmund Mach, S. Michele all’Adige (TN)*

² *Center Agriculture Food Environment, University of Trento, San Michele all’Adige (TN)*

Rising temperatures and ozone levels are among the most striking stressful phenomena of global climate changes, and they threaten plants that are not able to react rapidly and efficiently. Generic responses of plants to stresses include the production of excess reactive oxygen species (ROS). Excessive ROS accumulation can lead to extensive oxidation of important components such as nucleic acids, proteins and lipids which can further exacerbate ROS accumulation leading to programmed cell death. Although most studies on plant antioxidants have focused on non-volatile compounds, volatiles belonging to the volatile isoprenoid family have been implicated in the protection against abiotic stresses, in particular thermal and oxidative stress whose frequency and extent is being exacerbated by ongoing global change and anthropogenic pollution. Historically, research has focused on isoprene, demonstrating that isoprene-emitting plants are more tolerant to ozone exposure and heat stress, reducing ROS accumulation. Yet, evidence is rising that other volatile isoprenoids may be involved in plant responses against abiotic stresses. Grapevines are not isoprene emitters but some varieties produce other volatile isoprenoids such as monoterpenes. We investigated photosynthesis and emission of volatile organic compounds upon heat stress in two *Vitis vinifera* cv. Chardonnay clones differing only for a mutation in the VvDXS gene (the first enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway), regulating volatile isoprenoid biosynthesis. We showed that the mutation led to a strong increase in monoterpene emission upon heat stress. At the same time, quantum yield of PSII (Fv/Fm) was very much affected by the stress in the non-emitting clone while the monoterpene emitter showed a significant resilience, thus indicating a possible antioxidant role of monoterpenes in grapevine. We repeated the study in *Vitis vinifera* cv. Gewürztraminer and cv. Savagnin. These cultivars also differed for a mutation in the VvDXS sequence. We found similar results to the previous case.

Parole chiave: Abiotic stress, Monoterpenes, Chl fluorescence, ROS.

Studio dei meccanismi di risposta allo stress idrico in portainnesti di vite tramite un approccio fisiologico e trascrittomico

Brancadoro L.^{1*}, De Lorenzis G.¹, Grossi D.¹, Pindo M.², Stefani E.², Cestaro A.², Failla O.¹, Scienza A.¹

* lucio.brancadoro@unimi.it

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali, Università di Milano

² Centro Ricerca e Innovazione, Fondazione E. Mach, San Michele all'Adige (TN)

Ipotesi. La vite, coltura tipica delle zone mediterranee, è considerata una specie tollerante alla siccità. Infatti, grazie al profondo apparato radicale, al controllo della traspirazione tramite la chiusura degli stomi e alla regolazione osmotica, è in grado di rimanere produttiva sotto regimi idrici non ottimali. Tuttavia, i meccanismi molecolari alla base dell'adattamento della vite allo stress idrico sono ancora poco chiari. In questo studio, sono state confrontate le risposte fisiologiche e trascrittomiche di due portainnesti di vite (tollerante e suscettibile) indotte dall'esposizione allo stress idrico.

Materiali e metodi. L'effetto dello stress idrico è stato valutato su radici e foglie di piante dei portainnesti 101.14 e 1103P franche e innestate con Cabernet Sauvignon. Lo stato idrico della pianta, i parametri fotosintetici ed i geni differenzialmente espressi in radici e foglie sono stati valutati a differenti percentuali di contenuto idrico del suolo.

Risultati. Lo stress idrico riduce gli scambi gassosi in entrambi i portainnesti. Il 101-14 franco mostra i valori maggiori e le piante innestate per entrambe le combinazioni presentano i valori minori. L'efficienza nell'uso dell'acqua è maggiore per il portainnesto 101-14 e minore per 1103P, con le tesi innestate che mostrano una minore efficienza. Il 1103P franco ha mostrato valori di stem water potential maggiori, mentre il 101-14 franco quelli minori. L'analisi trascrittomico ha evidenziato l'espressione differenziale di geni che consentono il mantenimento dello sviluppo radicale, estrazione di acqua dal suolo e dell'attività fotosintetica.

Principali conclusioni. I risultati indicano come il 1103P ritenuto tollerante agli stress idrici mostri un atteggiamento conservativo nei confronti dell'acqua mentre il 101-14, suscettibile, un atteggiamento dissipativo.

Parole chiave: portainnesti, fotosintesi, RNA-seq.

Caratterizzare i cloni di Sangiovese con l'impiego di parametri morfometrici

Valentini P. *, Giannetti F., Storchi P., Perria R., Puccioni S., Zombardo A.

* paolo.valentini@crea.gov.it

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Viticoltura Enologia, Arezzo

Nel costituire un database di parametri ampelometrici, utilizzando il software SuperAmpelo[®], ci siamo chiesti se fosse possibile distinguere i cloni di Sangiovese tra di loro, sulla base delle evidenze ampelometriche.

Le foglie di 37 accessioni, tra cloni e biotipi di Sangiovese, presenti nella collezione di Arezzo, sono state misurate ed utilizzate per le analisi statistiche multivariate. Per rendere più completo il database sono state inseriti i dati relativi alle analisi tecnologiche e le analisi chimiche degli antociani.

Ne è emerso che, sulla base di variazioni di alcuni parametri morfologici, la popolazione esaminata può essere suddivisa in gruppi; al loro interno, sono stati individuati dei cloni rappresentativi, che hanno dato il nome al gruppo. Per ogni gruppo abbiamo tentato di concretizzare le differenze e comporre una foglia tipo.

Altre accessioni di Sangiovese, potranno essere associate ad uno di questi gruppi sulla base dei rilievi ampelometrici.

Parole chiave: ampelometria, SuperAmpelo[®], biotipi.

