

## **Analisi del genoma: principi ed applicazioni alla vite**

Gabriele Di Gaspero, Michele Morgante, Raffaele Testolin  
Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Udine  
Istituto di Genomica Applicata, Parco Scientifico & Tecnologico di Udine

### *I progetti di sequenziamento*

La vite è stata la prima specie frutticola ad essere sequenziata. Ha anche beneficiato del privilegio di avere due individui completamente sequenziati, risultato di due progetti paralleli conclusi con due pubblicazioni quasi simultanee nella seconda metà del 2007 (Jaillon et al 2007, Velasco et al 2007). Uno dei due individui sequenziati è una vite chiamata PN40024, ottenuta mediante autofecondazione ripetuta. L'autofecondazione porta ad una condizione di omozigosi lungo la maggior parte dei cromosomi che costituiscono il genoma: un individuo diploide come la vite presenterebbe quindi per ogni cromosoma due copie identiche. Una volta ottenuta questa condizione nell'individuo da sequenziare risulta notevolmente semplificata la fase di assemblaggio del genoma, durante la quale viene ricostruito con strumenti computazionali l'ordine della sequenza del DNA lungo i cromosomi. La sequenza del genoma dell'individuo modello risulta molto accurata e le porzioni di sequenza ricostruite in modo continuo lungo il cromosoma sono più lunghe. Il sequenziamento dell'individuo omozigote PN40024 è stato realizzato da un consorzio pubblico italo-francese, a cui hanno partecipato numerose università italiane, unitesi a livello nazionale nel consorzio VIGNA (Vitis Genome Analysis), il Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura (CRA), il CRIBI di Padova e l'Istituto di Genomica Applicata di Udine, assieme ai partner francesi dell'INRA e del centro nazionale di sequenziamento Genoscope (Jaillon et al 2007). Tuttavia l'omozigosi è una condizione inusuale in una specie come la vite, in cui la maggior parte delle varietà coltivate sono derivate dall'incrocio tra due differenti genitori che per ogni cromosoma possiedono due copie sostanzialmente diverse, una ereditata dal genitore materno e l'altra dal genitore paterno. A questo proposito il secondo individuo di vite completamente sequenziato, il vitigno 'Pinot nero', risulta invece eterozigote. Un genoma di questo tipo presenta dei problemi computazionali più complessi per la ricostruzione della sequenza continua lungo i cromosomi e un assemblaggio finale più frammentato. Presenta tuttavia il pregio di fornire una fotografia della diversità tra le copie di cromosomi omologhi presenti all'interno di una varietà. Il sequenziamento del genoma di 'Pinot nero' è stato realizzato dall'Istituto Agrario di S. Michele all'Adige in collaborazione con alcuni partner tecnologici statunitensi quali Myriad Genetics, 454 Life Sciences, Roche e Amplicon Express (Velasco et al 2007).

Il merito scientifico più significativo del sequenziamento del genoma della vite è stato la scoperta delle tracce dell'antica esaploidizzazione avvenuta in un progenitore delle dicotiledoni, causata dalla fusione di tre genomi ancestrali e seguita dalla loro diploidizzazione (Jaillon et al 2007). A differenza di quanto avvenuto in altre specie sembra che i tre genomi ancestrali non si siano riarrangiati nella storia recente dell'evoluzione della vite (Figura 1). In merito a questo nel genoma della vite sono ancora oggi visibili grandi blocchi di geni, conservati in triplette di cromosomi, in una configurazione molto simile a quella che doveva essere presente nel genoma del progenitore ancestrale, poco dopo l'evento di esaploidizzazione. Nelle altre piante dicotiledoni sequenziate invece riarrangiamenti tra porzioni di cromosoma appartenenti a differenti triplette ed eventi più recenti di duplicazione del genoma avvenuti negli ultimi 50-70 milioni di anni hanno parzialmente oscurato i segni della triplicazione ancestrale e complicato la ricostruzione della storia evolutiva più antica.

### *Progetti di risequenziamento*

La sequenza di riferimento rappresenta il genoma di un individuo della specie ed è il punto di partenza per lo studio della variabilità tra gli individui all'interno della specie. Le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS), utilizzabili già da 3-4 anni, permettono di risequenziare qualsiasi nuovo individuo a costi contenuti, e di allineare la sua sequenza con quella di riferimento, identificando varianti nucleotidiche e strutturali utili alla comprensione della diversità genetica per i caratteri oggetto di studio o di selezione.

L'Università di Udine e l'Istituto di Genomica Applicata sono impegnati nel progetto di risequenziamento di diverse varietà di vite rappresentative della variabilità naturale della specie, al fine di comprendere della diversità genetica esistente all'interno delle varietà di *Vitis vinifera*. Tocai friulano, Sangiovese, Schiava grossa, Sauvignon, Grenache sono le varietà per le quali le analisi sono in corso. Aldilà delle centinaia di migliaia o in altri casi milioni di variazioni di singolo nucleotide, che possono avere una ripercussione funzionale quando avvengono all'interno dei geni o dei loro promotori, un'importante quota del genoma compresa tra il 10 e il 20% può essere presente in una varietà e mancare in un'altra. Nel caso di Tocai friulano, ad esempio, le variazioni strutturali sembrano coinvolgere circa 100 milioni di nucleotidi su una dimensione totale di circa 480 milioni attesa per un genoma di *Vitis vinifera*. Questa porzione del genoma, non essenziale per la sopravvivenza dell'individuo, è solo in parte dovuta alla presenza di elementi trasponibili, i quali possono essere alternativamente presenti nei singoli individui e in numerosi punti del genoma. Buona parte di queste variazioni strutturali è dovuta anche alla presenza/assenza di porzioni cromosomiche dell'ordine di decine o centinaia di migliaia di nucleotidi ciascuna che possono contenere nel loro insieme centinaia di geni: tra questi alcuni possono effettivamente concorrere a determinare l'unicità delle caratteristiche fenotipiche di ciascun individuo. Nel confronto tra Tocai friulano e la sequenza di riferimento di PN40024, 56 milioni di nucleotidi compresi in grandi porzioni di dimensioni tra 50,000 e più di un milione ciascuna sono alternativamente presenti nei due individui. Più di 1,300 geni sono presenti in queste regioni. Questo è solo il confronto tra due varietà all'interno della specie. La comparazione tra più individui definirà quanta e quale parte del genoma è essenziale per specificare le funzioni biologiche di base, per lo sviluppo e la riproduzione della vite, e quindi condivisa da tutti gli individui della specie, e quale parte non è indispensabile pur contenendo geni. Proprio questa porzione del genoma potrebbe contribuire alla diversificazione fenotipica all'interno della specie.

#### *Applicazioni per il miglioramento genetico*

A tre anni dal completamento della sequenza del genoma della vite, molte delle promesse che accompagnavano questo progetto si stanno traducendo in realtà in decine di centri di ricerca in cui si studia la genetica della vite e si fa il miglioramento genetico per caratteri di interesse viticolo ed enologico (Di Gaspero e Cattonaro 2010).

La possibilità di esplorare la sequenza della vite nucleotide per nucleotide, nelle parti del genoma che determinano un certo carattere, controllando ogni gene presente in quella regione, e di risequenziare le diverse varietà, comprendendone le differenze individuali, sono un'informazione fondamentale per la selezione dei nuovi incroci che costituiranno le varietà del futuro.

La rivoluzione riguarda il miglioramento genetico attraverso l'incrocio naturale di individui interfertili, un processo che per decenni ha fatto affidamento solo sull'intuito e sulla sensibilità dei *breeder* nella scelta dei parentali e delle loro progenie. Analizziamo l'evoluzione dei metodi e degli strumenti che supportano il *breeder* nel disegno delle combinazioni di incrocio e nella selezione mirata delle viti di qualità superiore.

La vite è una coltura che finora ha beneficiato poco del miglioramento genetico moderno, ad eccezione delle varietà di uva da tavola, per le quali il rinnovamento varietale risponde in modo più rapido all'evoluzione delle preferenze del consumatore. Il mercato del vino,

soprattutto il segmento delle produzioni di pregio, è fortemente ancorato alla tradizione e il legame tra il territorio (*terroir*) e le varietà storicamente legate ad esso, sebbene spesso non selezionate in quel territorio, è particolarmente forte.

In passato, la viticoltura ha fatto ricorso al miglioramento genetico sull'onda emotiva di dover far fronte a improvvisi flagelli che si sono abbattuti sulla coltura, piuttosto che fondare questo processo su solide basi scientifiche e mediante una sistematica esplorazione delle risorse genetiche. Il grafico della figura 2 riporta il numero di varietà costituite mediante incrocio e selezione e introdotte in coltivazione dall'inizio dell'Ottocento. Il primo impulso alla selezione di nuove varietà è stato dato dall'introduzione accidentale in Europa della fillossera, avvenuta a metà dell'Ottocento, e dall'immediato tentativo di creare varietà resistenti mediante incrocio con viti nordamericane. Il risultato di tale attività sono stati i cosiddetti 'ibridi produttori diretti'. Una seconda ondata nel rilascio di nuove varietà è avvenuta negli anni 1880-1900 a seguito dell'introduzione di funghi patogeni, nello specifico gli agenti eziologici di peronospora e oidio. Per tale attività è stato in parte riciclato il materiale utilizzato per la resistenza a fillossera, che risultava essere resistente anche ai patogeni fungini, in parte è stato importato nuovo materiale dal Nord America.

La storia del miglioramento genetico della vite condotto nella seconda metà dell'Ottocento è una faccenda quasi esclusivamente americana e francese. Il materiale resistente veniva raccolto e selezionato in diverse zone del Nord America dove i patogeni della vite erano endemici e poi mandato in Francia. Oltralpe, questo materiale è stato incrociato in una miriade di combinazioni con varietà di *Vitis vinifera*, spesso in maniera caotica e ha dato alla luce migliaia di selezioni che portano nel loro nome il ricordo del costituente, come le serie di ibridi Couderc, Ganzin, Seibel, Landot, Burdin, Bertille-Seyve, Seyve-Villard.

In viticoltura, con il termine 'ibridi' si tende a fare delle generalizzazioni, tuttavia esistono profonde differenze tra le diverse famiglie di ibridi. L'icona più esemplificativa è l'uva fragola con il suo caratteristico aroma 'foxy', che comprende diverse varietà ottenute per ibridazione tra le specie *Vitis labrusca* e/o *Vitis riparia* e *Vitis vinifera*, le più note delle quali sono Isabella, Clinton, Noah, Bacò. Già nella prima metà dell'Ottocento ibridi di *labrusca* e *riparia* erano stati prodotti nella costa Nord Orientale degli Stati Uniti, dove gli Europei avevano portato la viticoltura e le varietà europee. A causa degli inverni rigidi di quelle zone, i coloni avevano usato le specie native per migliorare la resistenza al freddo. Bisogna comunque considerare che questa è solo una parte trascurabile del materiale utilizzato nel *breeding* francese.

La maggior parte del materiale viticolo americano introdotto in Francia nella seconda metà dell'Ottocento deriva da altre specie, quali *Vitis rupestris* e *Vitis lincecumii*. Questo materiale raccolto da *breeder* e appassionati di viticoltura locali, come Hermann Jaeger e Thomas V. Munson, in un'areale circoscritto nel Midwest, negli stati del Missouri, dell'Oklahoma, dell'Arkansas e del Texas, presenta caratteristiche molto diverse dalla uva fragola (Figura 3). Solo oggi, con l'analisi del DNA e la ricostruzione dei pedigree, si sono potuti comprendere il grado di diversità genetica e il diverso valore delle linee all'interno dell'eterogeneo materiale importato dal Nord America, che ha costituito le fondamenta del miglioramento genetico della vite in Europa.

Dopo le difficoltà della prima metà del Novecento, il miglioramento genetico della vite ha vissuto una nuova era nel dopoguerra (Figura 2), soprattutto nelle regioni viticole meno vocate e nei Paesi con economie meno sviluppate, dove l'utilizzo di varietà resistenti e la riduzione dei trattamenti chimici era un fattore indispensabile per raggiungere un certo margine di profitto. La selezione per la resistenza ai patogeni è stata portata avanti in quei Paesi, utilizzando le migliori linee prodotte dal miglioramento genetico francese del secolo precedente, soprattutto quelle derivanti da *V. rupestris*, che già avevano una elevata qualità dei frutti ed erano esenti da aromi di tipo selvatico, quali il ben noto 'foxy'.

Oggi, grazie alla possibilità di fondare il miglioramento su una più solida base scientifica e sulle informazioni derivanti dalla sequenza del genoma della vite, si aprono nuovi orizzonti per

programmi di incrocio e selezione più mirati, che consentirebbero nel giro di una o poche generazioni di incrocio di arrivare a selezioni con caratteristiche comparabili a quelle che rappresentano l'attuale piattaforma varietale per l'uva da vino.

### *Esplorazione della variabilità genetica e delle risorse naturali*

Quale sia il livello di diversità genetica presente nel materiale vegetale già utilizzato nei programmi di miglioramento della specie è la prima domanda che un *breeder* si pone.

Nel caso della vite, e più nello specifico del miglioramento per la resistenza ai patogeni, l'opera di selezione effettuata a metà dell'Ottocento sul materiale importato dall'America, ha rappresentato un drastico collo di bottiglia, e le nuove varietà sono state prodotte a partire da un numero esiguo di parentali resistenti, giudicati idonei a rispondere alle esigenze della viticoltura di quell'epoca.

Con i moderni strumenti di indagine molecolare è oggi possibile investigare quante resistenze diverse e indipendenti siano presenti nelle varietà selezionate a partire dal materiale di origine nordamericana. Poche a quanto sembra dai risultati delle prime indagini molecolari. Ma forse sufficienti per poterle combinare mediante incroci a più vie in un unico individuo, se ognuna di queste resistenze è rintracciabile nelle progenie mediante i marcatori molecolari ad essa associati. Questo raggiungerebbe l'importante obiettivo di creare selezioni dotate di resistenze multiple e quindi durevoli nel tempo, in quanto ogni resistenza monogenica è specifica per alcune ma non tutte le razze di un patogeno.

Quanto ampia sia la variabilità genetica per i caratteri da migliorare presente nel germoplasma ancora inesplorato è il secondo aspetto di cui si preoccupa un *breeder*. Se la variabilità genetica è ampia c'è una maggiore probabilità di trovare nuove accessioni da introdurre nei programmi di miglioramento genetico. Il materiale genetico presente nei centri di ricerca delle repubbliche dell'ex Unione Sovietica durante il Novecento è entrato marginalmente nelle collezioni di germoplasma europee e solo negli ultimi trent'anni. Questo materiale, una volta valutato, potrebbe portare nuova linfa ai programmi di miglioramento europei. Ci riferiamo soprattutto alle numerose varietà selezionate per ibridazione tra *Vitis vinifera* e *Vitis amurensis*, una specie dell'Asia orientale che rappresenta una formidabile sorgente di resistenza a peronospora e al freddo, e che presenta caratteristiche qualitative superiori a quelle delle viti selvatiche americane.

Un altro esempio delle potenzialità ancora nascoste nel germoplasma della vite è la recente scoperta del gene *REN1*, che conferisce resistenza ad oidio, in alcune varietà di *Vitis vinifera*, imparentate tra loro e ritrovate in una vasta area che va dal Medio Oriente alle repubbliche dell'Asia Centrale, le quali si sono probabilmente originate nel centro di domesticazione della vite in Asia minore e in seguito disperse dai traffici commerciali lungo le Vie della Seta (Coleman et al 2009).

### *La rivoluzione nei metodi di selezione*

L'identificazione di un marcatore associato ad un carattere fenotipico, sia esso una resistenza o un carattere legato alla qualità della bacca, è l'approccio più semplice usato per la selezione assistita. Questo sfrutta infatti la concatenazione fisica presente tra il gene che controlla un certo carattere, portato da uno dei 19 cromosomi della vite, e i marcatori molecolari nello stesso cromosoma. L'associazione tra un carattere e i rispettivi marcatori diagnostici non è tuttavia scontata: a causa della ricombinazione che avviene all'interno del cromosoma, con una frequenza inversamente proporzionale alla distanza fisica tra gene e marcatore lungo il cromosoma, la loro concatenazione risulta spesso vanificata.

Avere a disposizione la sequenza intera del genoma permette di ispezionare la porzione del cromosoma interessato e identificare marcatori più vicini alla regione di interesse o addirittura

dentro il gene responsabile del carattere, marcatori che non subiscono ricombinazione e che visualizzano le mutazioni causali della variante del carattere in esame, in quanto conservate durante l'evoluzione della specie. Il marcatore diventa così 'stabile' e in grado di predire la presenza/assenza di quel carattere in modo più affidabile nei sementali ottenuti in differenti incroci.

Molti programmi di incrocio, nel tentativo di trasferire caratteri presenti solamente nelle specie selvatiche, richiedono la realizzazione di incroci interspecifici e devono prevedere successivamente il reincrocio (*backcross*) con un 'genitore ricorrente', rappresentato nello specifico da varietà coltivate con un buon valore agronomico. Si tratta di un lavoro lungo che richiedeva in passato 6-8 generazioni di reincrocio, quindi circa 30-50 anni. L'estensione del concetto di selezione assistita a livello dell'intero genoma anziché per un solo carattere, permette dopo poche generazioni di reincrocio (2-3) di identificare quegli individui che hanno accumulato un maggior numero di porzioni cromosomiche dal genitore 'ricorrente' e di ripulire rapidamente le progenie dal sangue della specie selvatica, mantenendone solamente il gene o i pochi geni di interesse.

#### *Gli argomenti di ricerca genetica e i caratteri selezionati*

Passi da gigante sono stati compiuti nell'ultimo decennio nell'identificazione dei determinanti della resistenza a diversi patogeni e nel loro impiego nel *breeding*. Questo settore è estremamente reattivo alle novità. A solo un paio d'anni dalla scoperta del gene di resistenza ad oidio *REN1* e delle accessioni di *vinifera* che lo portano, queste sorgenti vengono già utilizzate da diversi gruppi di ricerca in Italia, Francia, Germania, Ungheria e Stati Uniti, assieme ai marcatori molecolari che consentono di rintracciare il gene nelle progenie, con lo scopo di combinare questa nuova resistenza in linee in cui erano già introdotte altre resistenze derivanti da specie selvatiche.

La sfida che la genomica deve ora affrontare per essere di ulteriore supporto al miglioramento genetico è la comprensione della basi genetiche dei profili aromatici delle uve, che influenzano le caratteristiche enologiche. Se è vero che sono stati identificati alcuni geni-chiave per la sintesi di categorie di composti chimicamente ben definiti e che impartiscono aromi molto caratteristici, come i terpeni o le metossipirazine, poco o nulla è noto sulla moltitudine di composti che, dal loro complesso e dalla loro interazione, determinano i profili aromatici unici e irripetibili di ogni varietà e di ogni incrocio in selezione.

Nuove tecniche di estrazione, come la *Solid phase micro extraction* (SPME) e la *Stir bar sorptive extraction* (SBSE) e strumenti analitici più sensibili, come i gas-cromatografi accoppiati a spettrometri di massa di nuova generazione, permettono di analizzare matrici complesse, fornendo informazioni su molte centinaia di composti analizzabili in un singolo esperimento. Una volta identificati con metodi di determinazione rapida i composti responsabili delle componenti più importanti della qualità della bacca, mosto e vino, si aprono due strade: la prima riguarda la selezione degli incroci sulla base dei loro profili aromatici; la seconda, più ambiziosa, riguarda lo studio del controllo genetico di questi composti e la selezione assistita da marcatori molecolari.

La ricerca su questo fronte è appena iniziata, ma è già in grado di fornire i primi strumenti utili per la selezione. E' importante sottolineare – volendo fare delle previsioni a lungo termine – che la selezione per i composti che determinano i profili aromatici dell'uva e quindi del vino, come per tutti i composti la cui sintesi è sotto controllo genetico, potrebbe essere fatta senza aspettare che una pianta ottenuta per incrocio arrivi a produrre uva. La selezione assistita, cioè basata sull'analisi del DNA, può essere fatta su piante da seme una volta comparse le prime foglie (Figura 4). Scartata la maggior parte delle piante non danno risultati interessanti, la selezione più fine, basata sulle osservazioni del comportamento produttivo della pianta in

campo e sulle micro-vinificazioni dell'uva, può essere riservata a quella percentuale molto ridotta di piante, che hanno superato il primo test basato sull'analisi del genoma.

### *Espansione e specializzazione di famiglie geniche che controllano la sintesi di metaboliti secondari*

I metaboliti secondari sono composti chimici non essenziali per la vita della pianta, a differenza di quelli coinvolti nei processi di crescita e riproduzione. Nel caso della vite questi metaboliti sono i principali responsabili delle differenze nella composizione della bacca di diversi vitigni, e possono quindi determinare l'unicità del profilo organolettico di ogni vino. Si tratta di composti chimicamente molto diversi e in grado di influenzare le proprietà organolettiche visive e olfattive, mentre in alcuni casi possono avere proprietà salutistiche. Antociani, terpeni, e stilbeni sono tre esempi rappresentativi della diversificazione in termini di funzione biologica e di implicazioni tecnologiche per l'enologia. Nonostante la diversità a livello chimico-organolettico, questi composti presentano delle sorprendenti similitudini per quanto riguarda l'evoluzione dei geni che controllano le rispettive vie biosintetiche. Molti di questi sono altamente duplicati nel genoma di vite e ogni copia ha subito una successiva specializzazione trascrizionale o funzionale.

Gli antociani sono i flavonoidi principali responsabili della pigmentazione dell'epidermide del frutto nei vitigni a bacca rossa. La variabilità naturale nella gradazione della pigmentazione, da rosso chiaro a blu scuro, è una caratteristica varietale ed è dovuta in parte alla concentrazione totale di antociani, in parte al diverso contributo delle cinque tipologie di questi metaboliti sintetizzate nella bacca (Figura 5). Varietà a bacca scura tendono ad accumulare, malvidina, petunidina e delfinidina, e loro derivati, mentre le varietà a bacca rossastra accumulano preferenzialmente cianidina e peonidina, e derivati. Malvidina, petunidina e delfinidina tendono a conferire ai vini un colore più carico. Nello specifico la malvidina è una molecola più stabile di cianidina e peonidina, un aspetto che ha un'importante risvolto tecnologico per la stabilità del colore dei vini rossi durante l'invecchiamento nella successiva fase di commercializzazione. Il contenuto di malvidina, petunidina e delfinidina rispetto a cianidina e peonidina nella bacca è determinato dalla espressione relativa di due geni codificanti la flavonoide 3'5'-idrossilasi ( $F3'5'H$ ) e flavonoide 3'-idrossilasi ( $F3'H$ ), i quali competono per substrati comuni e convogliano i loro prodotti di reazione nella sintesi dell'una o dell'altra categoria di antociani.

Sebbene questo semplice modello spieghi la composizione antocianica di fiori e frutti in molte specie, nella vite il percorso biosintetico presenta una maggiore complessità. A differenza di altre piante, il gene  $F3'5'H$  è presente nel genoma di vite in numerose copie, 16 per la precisione, la maggior parte delle quali si sono originate per successive duplicazioni locali, durante la recente storia evolutiva della famiglia delle Vitacee (Falginella et al 2010). A partire dall'invaiaitura, nelle varietà a bacca scura vengono attivate molte più copie del gene  $F3'5'H$ , rispetto a ciò che avviene nelle varietà a bacca rossa. Inoltre anche tra le varietà a bacca scura con una simile composizione antocianica può variare la copia di  $F3'5'H$  che contribuisce maggiormente all'espressione della famiglia genica. Infine durante il processo di sintesi degli antociani, che permane attivo nella bacca per diverse settimane dall'invaiaitura alla raccolta, le diverse copie del gene  $F3'5'H$  vengono attivate in maniera sequenziale durante il progredire della maturazione, come nel caso del vitigno 'Marzemino' descritto in Figura 6.

I terpeni sono una famiglia di composti costituiti da multipli dell'unità isoprenica e si differenziano tra loro per il numero di unità isopreniche e per la presenza di diversi sostituenti ai gruppi funzionali dell'unità di base. L'eugenolo, principio attivo dell'olio essenziale di garofano, il mentolo, estratto dalla menta piperita e usato nella preparazione di profumi e farmaci, la canfora, il geraniolo, il limonene, il citronellolo, sono tutti esempi di terpeni. Molti di questi composti sintetizzati da alcune varietà di vite conferiscono alla bacca e quindi al vino i caratteristici profumi floreali. Molecole più complesse che derivano dall'unione di diversi

monomeri isoprenici, come il sesquiterpene rotundone, sono stati associati all'aroma speziato di pepe nero della cultivar 'Syrah' (Siebert et al 2008).

Alcuni di questi composti, soprattutto i monoterpeni linalolo, geraniolo e nerolo, vengono accumulati in concentrazioni molto elevate nelle varietà cosiddette 'aromatiche', nelle quali determinano il ben noto aroma 'moscato'. I ricercatori della Fondazione Edmund Mach di S. Michele all'Adige hanno identificato il gene maggiore responsabile del controllo di questo carattere, una 1-deossi-D-xilulosio 5-fosfato sintasi (*DXS*), codificante il primo enzima della parte plastidiale della via biosintetica che porta alla sintesi di un precursore comune dei monoterpeni (Battilana et al. 2009). L'eccesso di sintesi di questo precursore probabilmente determina un accumulo significativamente maggiore di monoterpeni nelle varietà con aroma 'moscato'.

Il modo con cui i precursori comuni dei terpeni vengono convertiti nella miriade di possibili molecole terpeniche dipende anche da reazioni che avvengono più a valle lungo la via biosintetica e che coinvolgono l'enzima della terpene sintasi (*TPS*). In realtà nel genoma di vite esiste un'intera batteria di geni *TPS*, ognuno dei quali codifica per una forma leggermente diversa di terpene sintasi. Ricercatori dell'Università della British Columbia di Vancouver hanno rinvenuto nella sequenza del genoma della vite PN40024 69 geni *TPS* funzionali, 40 dei quali sono espressi nella pianta. Per molti degli enzimi codificati da questi geni lo studio delle caratteristiche biochimiche ha rivelato un'elevata specializzazione funzionale per ciascuna copia di *TPS* (Martin et al 2010). La sottofamiglia delle *TPS-a* sintetizza decine di sesquiterpeni e ogni enzima è deputato alla sintesi di metaboliti, tra i quali i più rappresentati sono  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -humulene e germacrene. Un singolo membro della sottofamiglia *TPS-a* identificato in 'Cabernet Sauvignon' è invece altamente specifico e sintetizza solo farnesene, un composto che viene associato all'aroma di mela verde. La sottofamiglia delle *TPS-b* produce monoterpeni. La sottofamiglia delle *TPS-g* produce alcoli terpenici, e i diversi membri si diversificano per i substrati che utilizzano. Alcuni enzimi sono versatili e accettano indifferentemente i precursori geranil-difosfato e farnesil-difosfato al fine di convertirli, rispettivamente, in linalolo e nerolidolo. Altri membri sono specifici per il geranil-difosfato e lo trasformano esclusivamente in geraniolo.

Gli stilbeni sono una classe di polifenoli con una parziale azione antimicrobica e vengono sintetizzati dalla pianta in risposta ad attacchi di patogeni. Tra gli stilbeni presenti nella bacca il resveratrolo è ben noto anche per le sue proprietà benefiche, antinfiammatorie e di protezione cardiovascolare. Come visto per i geni *F3'5'H* e *TPS*, anche il gene che controlla la sintesi del resveratrolo, la stilbene sintasi (*STS*), è presente in numerose copie nel genoma di vite, 43, secondo una prima stima (Jaillon et al 2007). Attraverso un'analisi di espressione a larga scala mediante il sequenziamento del trascrittoma con tecnologie di nuova generazione (RNAseq) è stato dimostrato che tutte queste copie, ad eccezione di una, vengono attivate all'inizio della fase di maturazione della bacca (Zenoni et al 2010). Alcune copie di *STS* vengono ulteriormente indotte nella bacche durante il processo di appassimento post-raccolta delle uve della cultivar 'Corvina' proprio della produzione dell'Amarone (Zamboni et al 2008).

La proliferazione e la specializzazione avvenuta all'interno delle tre famiglie geniche *F3'5'H*, *TPS* e *STS* potrebbe essere solo la punta di un iceberg, che lascia spazio all'ipotesi di una maggiore complessità di regolazione del metabolismo secondario, in particolare quello associato alle qualità organolettiche del frutto.

#### *Il monitoraggio del comportamento della pianta mediante analisi di espressione genica e delle modificazioni post-trascrizionali*

La conoscenza dei circa 30,000 geni che compongono il genoma di vite e il progresso delle tecnologie di analisi di espressione genica stanno rivoluzionando le strategie di monitoraggio del comportamento della pianta in risposta alle condizioni di coltivazione e nell'interazione

con l'ambiente. Tradizionalmente, la fisiologia della pianta e l'evoluzione della maturazione della bacca vengono seguite nel vigneto attraverso la misurazione di alcuni parametri grossolani quali il potenziale idrico della pianta, la sua capacità fotosintetica, e il livello di accumulo di zuccheri e sostanze polifenoliche. Le nuove tecnologie consentono invece di impiegare microchip su cui è depositato l'intero set di geni o di risequenziare e quantificare la porzione di geni trascritti dalla pianta. Questa fotografia dell'espressione genica permette di acquisire un'informazione più precisa e più completa, che riflette in tempo reale le vie metaboliche e biosintetiche attivate nella pianta nell'interazione tra varietà e ambiente, un aspetto unico e caratteristico di ogni annata e zona viticola che sta alla base del concetto di *terroir*. La frontiera della ricerca si sposta ora sempre più avanti, fino allo studio del ruolo di micro RNA (miRNA), non codificanti per alcuna proteina, ma in grado di interferire a livello post-trascrizionale con l'espressione del gene che presenta una sequenza nucleotidica complementare ad esso. Numerosi miRNA sono infatti espressi in maniera differenziale in diversi stadi di maturazione della bacca e alcuni dei loro target sono geni coinvolti in diversi processi fisiologici che accompagnano la maturazione della bacca (Mica et al 2010).

## Bibliografia

- Battilana J, Costantini L, Emanuelli F, Sevini F, Segala C, Moser S, Velasco R, Versini G, Stella Grando M (2009) The 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene co-localizes with a major QTL affecting monoterpene content in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* 118:653-669
- Coleman C, Copetti D, Cipriani G, Hoffmann S, Kozma P, Kovács L, Morgante M, Testolin R, Di Gaspero G (2009) The powdery mildew resistance gene REN1 co-segregates with an NBS-LRR gene cluster in two Central Asian grapevines. *BMC Genetics* 10:89
- Di Gaspero G, Cattonaro F (2010) Application of genomics to grapevine improvement. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16:122-130
- Falginella L, Castellarin SD, Testolin R, Gambetta GA, Morgante M, Di Gaspero G (2010) Expansion and subfunctionalisation of flavonoid 3',5'-hydroxylases in the grapevine lineage. *BMC Genomics* 11:562
- Jaillon O, Aury J-M, Noel B, Policriti A, Clepet C, et al (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463-468
- Martin DM, Aubourg S, Schouwey MB, Daviet L, Schalk M, Toub O, Lund ST, Bohlmann J (2010) Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *BMC Plant Biology* 10:226
- Mica E, Piccolo V, Delledonne M, Ferrarini A, Pezzotti M, Casati C, Del Fabbro C, Valle G, Policriti A, Morgante M, Pesole G, Pè ME, Horner DS (2010) High throughput approaches reveal splicing of primary microRNA transcripts and tissue specific expression of mature microRNAs in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics* 11:109
- Siebert TE, Wood C, Elsey GM, Pollnitz AP (2008) Determination of rotundone, the pepper aroma impact compound, in grapes and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:3745-3748
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, et al. (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PlosOne* 2(12)e: 1326
- Zamboni A, Minoia L, Ferrarini A, Tornielli GB, Zago E, Delledonne M, Pezzotti M. (2008) Molecular analysis of post-harvest withering in grape by AFLP transcriptional profiling. *Journal of Experimental Botany* 59:4145-4159

Zenoni S, Ferrarini A, Giacomelli E, Xumerle L, Fasoli M, Malerba G, Bellin D, Pezzotti M, Delledonne M (2010) Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-Seq. *Plant Physiology* 152:1787-1795

Didascalia delle figure

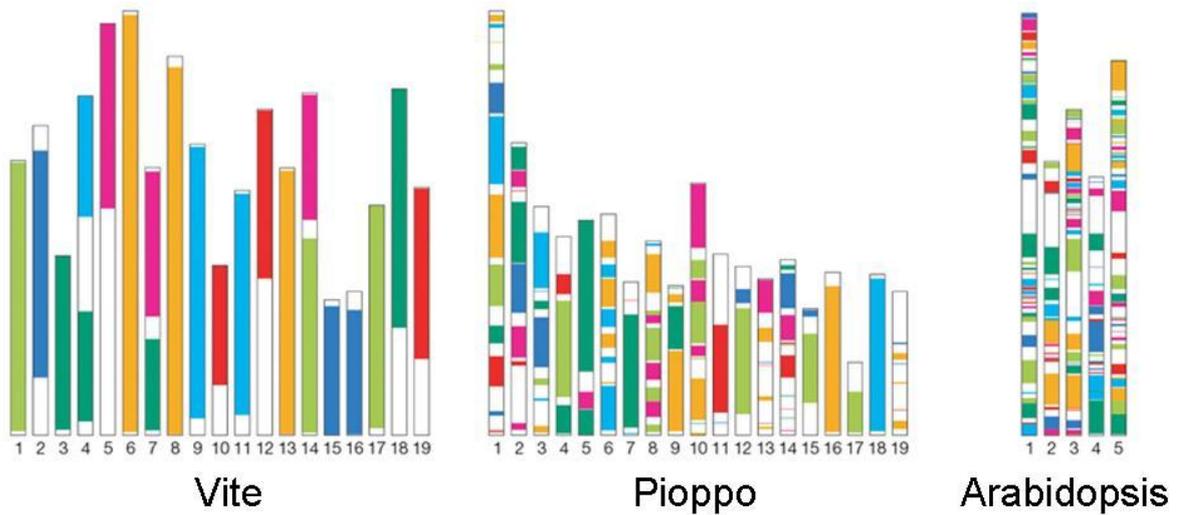


Figura 1. Diagramma dei cromosomi di tre piante sequenziate. Lungo i 19 cromosomi della vite, porzioni rappresentate con lo stesso colore rappresentano blocchi di geni conservati in triplette di cromosomi. Ciascun cromosoma all'interno della tripletta deriva da uno dei tre genomi ancestrali presenti nel progenitore comune delle dicotiledoni al momento dell'evento di esaploidizzazione. I riarrangiamenti cromosomici avvenuti in altre specie, sono rappresentati dalla frammentazione dei blocchi cromosomici ancestrali come appare nei genomi di pioppo e Arabidopsis. Tratta da Jaillon et al 2007, Nature.

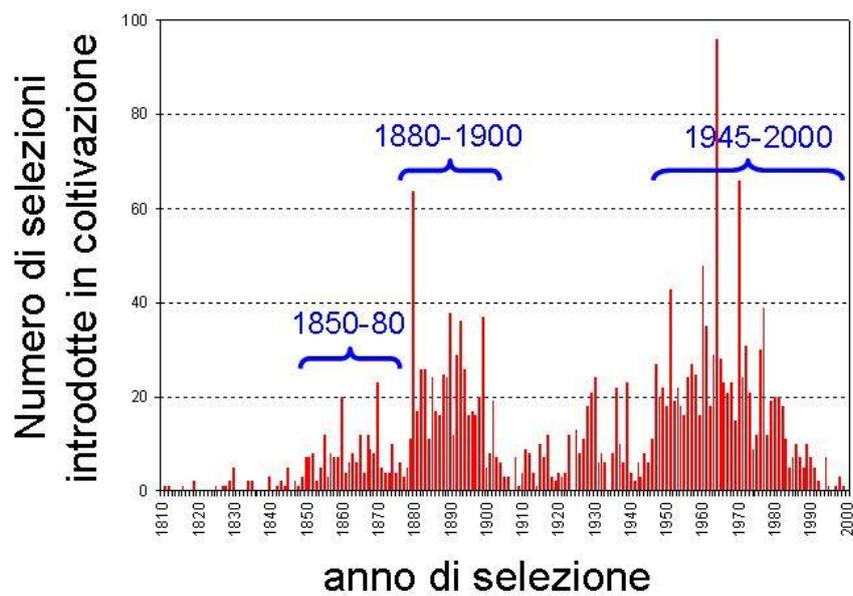


Figura 2. Numero di varietà di vite costituite mediante incrocio e selezione e introdotte in coltivazione. Fonte: Vitis International Variety Catalogue, Julius Kühn-Institut (JKI), Siebeldingen, Germania.

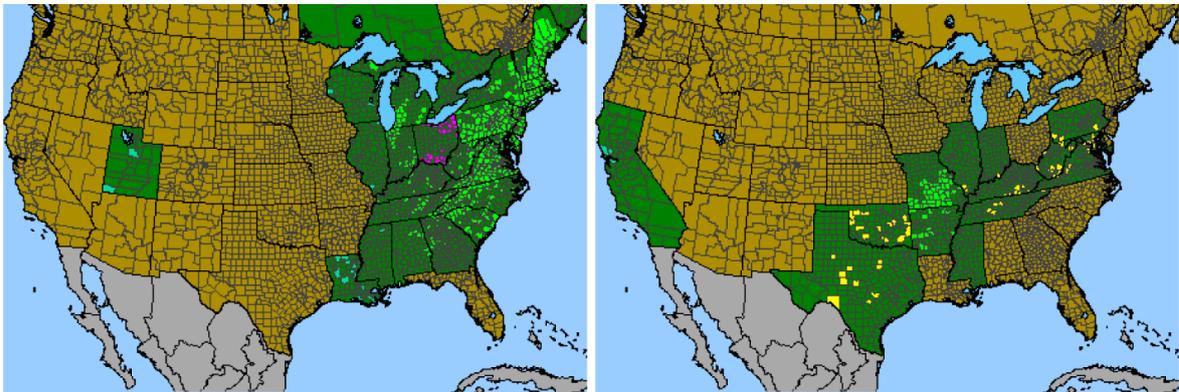


Figura 3. Areale di distribuzione di *Vitis labrusca* (a sinistra) e *Vitis rupestris* (a destra), due specie nord-americane usate storicamente nel miglioramento genetico della vite per la resistenza a patogeni. In verde scuro sono riportati gli stati nei quali la specie è presente, in verde chiaro le contee nelle quali la presenza è endemica (principalmente East Coast e New England per *Vitis labrusca*, Missouri e Arkansas per *Vitis rupestris*), in giallo le contee nelle quali la specie è rara, in azzurro le contee nelle quali la specie è stata introdotta, in viola le contee nelle quali la specie è considerata invasiva. Fonte: Biota of North America Program (BONAP), North Carolina Botanical Garden.



Figura 4. Incroci di vite allo stadio di semenzale.



Figura 5. Variabilità fenotipica per il colore della buccia tra vitigni a bacca rossa, causata da un diverso profilo nella composizione antocianica. In foto sono riportati due semenzali di Sangiovese × Bianca, allo stesso stadio di maturazione.

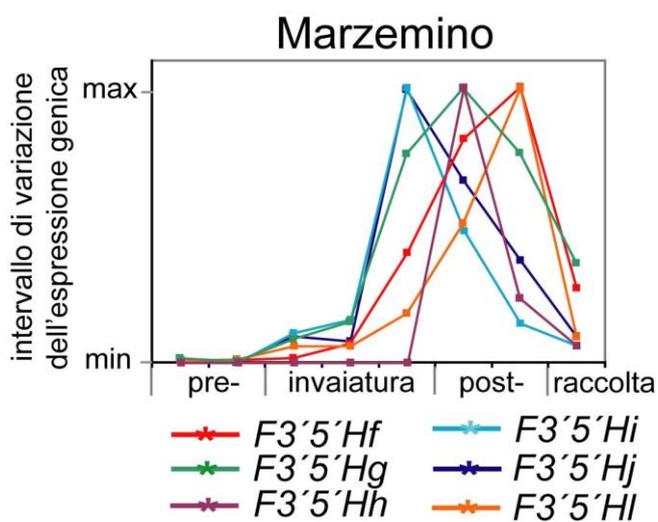


Figura 6. Dinamica di espressione di sei copie del gene della flavonoide 3'5'-idrossilasi ( $F3'5'H$ ), indicate dalle lettere -f, -g, -h, -i, -j, -l nella varietà 'Marzemino' durante la maturazione della bacca.