



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

CURRICULUM AGRICOLTURA SOCIALE

**TECNICHE DI RIGENERAZIONE E
TRASFORMAZIONE GENETICA DI VITE
PER LA RESISTENZA A PERONOSPORA**
REGENERATION TECHNIQUES AND GENETIC TRANSFORMATION OF *VITIS*
FOR RESISTANCE TO *PLASMOPARA VITICOLA*

TESI SPERIMENTALE

Studente:
ROBERTA MARIA GRAVAGNO

Relatore:
PROF. BRUNO MEZZETTI

Correlatori:
DOTT.SSA SILVIA SABBADINI
DOTT. LUCA CAPRIOTTI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

A me stessa
“andrà tutto bene”

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE	6
ELENCO DEI GRAFICI.....	9
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	10
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE.....	12
1.1 La vite	13
1.1.1 Caratteristiche morfologiche.....	14
1.1.2 Importanza del settore vitivinicolo in Italia	15
1.1.3 Miglioramento genetico della vite	17
1.2 Biotecnologie e ingegneria genetica	22
1.2.1 Colture in vitro e biotecnologie vegetali.....	26
1.2.2 Organogenesi ed embriogenesi nella vite	28
1.2.3 New Breeding Techniques (NBTs).....	31
1.2.4 Silenziamento genico (RNAi).....	34
1.3 Peronospora della vite (<i>Plasmopara viticola</i>).....	38
1.3.1 Strategie di difesa.....	40
1.3.2 Caratterizzazione genomica	41
CAPITOLO 2 SCOPO DELLA TESI	44
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI	46
3.1 Materiale vegetale.....	46
3.1.1 Genotipi di vite utilizzati nella sperimentazione.....	46
3.1.2 Organogenesi	49
3.1.3 Embriogenesi somatica	50
3.2 Locali e attrezzature di laboratorio	52
3.2.1 Sterilizzazione.....	52
3.3 Substrati di coltura	52
3.3.1 Stock di ormoni e agenti selettivi utilizzati.....	53

3.4 Trasformazione genetica	54
3.4.1 Ceppi di <i>Agrobacterium spp.</i> e costrutti genici.....	54
3.4.2 Substrati per la trasformazione	56
3.4.3 Protocollo di trasformazione genetica da tessuto meristemico	58
3.4.4 Protocollo di trasformazione genetica da embrioni somatici.....	61
3.5 Prove di rigenerazione e trasformazione applicate a <i>Vitis</i>	63
3.5.1 Prova di trasformazione genetica per organogenesi mediata da <i>A. tumefaciens</i> EHA101 e <i>A. rhizogenes</i> per la valutazione dell'effetto di diverse specie di <i>Agrobacterium</i> sull'efficienza di trasformazione	64
3.5.2 Prima prova di trasformazione genetica per organogenesi mediata da <i>A.</i> <i>tumefaciens</i> EHA101 sul genotipo modello Thompson Seedless.....	64
3.5.3 Seconda prova di trasformazione genetica per organogenesi mediata da <i>A. tumefaciens</i> EHA101 sul genotipo modello Thompson Seedless	65
3.5.4 Prova di rigenerazione per embriogenesi somatica da fiore intero	65
3.5.5 Prova di trasformazione genetica per embriogenesi somatica mediata da <i>A.</i> <i>tumefaciens</i> EHA101 su Ancellotta.....	65
3.6 Raccolta e analisi dei dati	65
3.6.1 Test statistici impiegati	66
CAPITOLO 4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	68
4.1 Prova di trasformazione genetica per organogenesi mediata da <i>A.</i> <i>tumefaciens</i> EHA101 e <i>A. rhizogenes</i> per la valutazione dell'effetto di diverse specie di <i>Agrobacterium</i> sull'efficienza di trasformazione	68
4.2 Prima prova di trasformazione genetica per organogenesi mediata da <i>A. tumefaciens</i> EHA101 sul genotipo modello Thompson Seedless.....	75
4.3 Seconda prova di trasformazione genetica per organogenesi mediata da <i>A. tumefaciens</i> EHA101 sul genotipo modello Thompson Seedless	81
4.4 Prova di rigenerazione per embriogenesi somatica da fiore intero	85
4.5 Prova di trasformazione genetica per embriogenesi somatica mediata da <i>A.</i> <i>tumefaciens</i> EHA101 su Ancellotta.....	87
CAPITOLO 5 CONCLUSIONI	91
BIBLIOGRAFIA	94
RINGRAZIAMENTI	100

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 3.1 Specifiche concentrazioni di fitoregolatori per genotipo in substrato MS.....	50
Tabella 3.2 Numero sezioni infettate con <i>A. tumefaciens</i> EHA101 e <i>A. rhizogenes wild</i>	64
Tabella 4.1 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti infettati per singola combinazione genotipo-agrobatterio a 3 e a 12 settimane dalla co-coltura	69
Tabella 4.2 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti infettati del genotipo Thompson Seedless con il ceppo EHA101, rilevata a diverse settimane dalla co-coltura.....	76
Tabella 4.3 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti infettati del genotipo Thompson Seedless con il ceppo EHA101, distinti secondo il costruito integrato, rilevata a 3 e a 12 settimane dalla co-coltura.	81
Tabella 4.4 Efficienza per calli pre-embriogenici ottenuti da fiori interi di Lambrusco Salamino e Ancellotta	86
Tabella 4.5 Efficienza di trasformazione a 4 settimane dalla co-coltura di embrioni somatici di Ancellotta con il ceppo EHA101 di <i>A. tumefaciens</i> contenente il costruito chimera.	89

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 3.1 Callo pre-embriogenico ottenuto su substrato MS1 da fiore intero di Lambrusco Salamino.....	51
Figura 3.2 Il plasmide pK7GWIWG2-7F2,1	55
Figura 3.3 I costrutti Pv-DCL441+DCL331 hpRNA/Pv-DCL441 hpRNA.....	55
Figura 3.4 Colonie batteriche sviluppate sul substrato di crescita batterica LB solido dopo 48 ore di incubazione	58
Figura 3.5 Tubi di infezione in preparazione	59
Figura 3.6 Preparazione della co-coltura	60
Figura 3.7 Embrioni somatici allo stadio cotiledonare di Lambrusco Salamino	62
Figura 3.8 Co-coltura embrioni somatici-agrobatterio.....	62
Figura 4.1 Petri 2 bulk 1 di Lambrusco Salamino infettato con EHA101 <i>A. tumefaciens</i> al controllo di 3 settimane: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 0,8 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 0,8 x. I tessuti non trasformati appaiono al filtro GFP di colorazione rosso omogenea, al contrario l'espressione del gene eGFP appare con l'emissione di fluorescenza verde.....	69
Figura 4.2 Petri 6 bulk 1 di Lambrusco Salamino infettato con <i>A. rhizogenes</i> al controllo di 3 settimane: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 0,8 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 0,8 x. Si notano consistenti calli esprimenti GFP.....	71
Figura 4.3 Petri 6 bulk 1 di Lambrusco Salamino infettato con <i>A. rhizogenes</i> al controllo di 12 settimane: a sinistra foto ottenuto sotto luce bianca ad un ingrandimento di 0,8 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 0,8 x. Si rilevano ancora buoni consistenti calli esprimenti GFP.....	72
Figura 4.4 Petri 12 bulk 1 di Kober 5BB infettato con EHA101 <i>A. tumefaciens</i> al controllo di 12 settimane: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 1 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 1 x. Si rilevano varie aree necrotiche.	72

Figura 4.5 Petri 4 bulk 3 di Kober 5BB infettato con <i>A. rhizogenes</i> al controllo di 6 settimane: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 1 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 1 x. Si nota la radice esprimente GFP sviluppatasi dai tessuti meristemati.	73
Figura 4.6 Petri 19 bulk 5 di Kober 5BB infettato con <i>A. rhizogenes</i> al controllo di 6 settimane: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 1,25 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 1,25 x. Si nota la piccola radice esprimente fluorescenza.	73
Figura 4.7 Sezione meristemica di Thompson Seedless infettata con il ceppo EHA101 <i>A. tumefaciens</i> visualizzata allo stereoscopio ad un ingrandimento di 0,8 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra), in post co-coltura. Si nota una buona suscettibilità al batterio utilizzato nella prova di trasformazione.	78
Figura 4.8 Germoglio putativamente transgenico di Thompson Seedless ottenuto dalla Petri 9 bulk 2, visualizzato alla terza settimana dalla co-coltura ad un ingrandimento di 2 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra).	78
Figura 4.9 Espianto chimerico di Thompson Seedless individuato nella Petri 23 bulk 3 alla terza settimana dalla co-coltura: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 2 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 2 x.	79
Figura 4.10 Il germoglio putativamente transgenico 9.2 di Thompson Seedless, visualizzato alla sesta settimana dalla co-coltura ad un ingrandimento di 2 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra), mostra necrosi.	79
Figura 4.11 Germoglio putativamente transgenico di Thompson Seedless ottenuto dalla Petri 25 bulk 5, in selezione su substrato MS BA3 NAA 0,02 CEF-CARB 200 KAN 50, visualizzato allo stereoscopio alla dodicesima settimana ad un ingrandimento di 2 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra).	80
Figura 4.12 Il germoglio putativamente transgenico 25.5 di Thompson Seedless su substrato MS BA 0,25 mg/L per la proliferazione, visualizzato ad un ingrandimento di 2 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra), ha sviluppato necrosi nella parte basale.	81
Figura 4.13 Sezione meristemica di Thompson Seedless infettata con il ceppo EHA101 caricato con il costrutto chimera, visualizzata allo stereoscopio ad un ingrandimento di 0,8 x in post co-coltura, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra). Si notano alcuni germoglietti non ancora fluorescenti.	83

Figura 4.14 Germoglio putativamente transgenico di Thompson Seedless contenente il costruito 441 ottenuto dalla Petri 16 bulk 1, visualizzato alla sesta settimana dalla co-coltura ad un ingrandimento di 0,8 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra).....	84
Figura 4.15 Germoglio putativamente transgenico di Thompson Seedless contenente il costruito chimera ottenuto dalla Petri 12 bulk 2, visualizzato alla nona settimana dalla co-coltura ad un ingrandimento di 1 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra).....	84
Figura 4.16 Germoglio putativamente transgenico di Thompson Seedless contenente il costruito 441 ottenuto dalla Petri 20 bulk 4, visualizzato alla quindicesima settimana dalla co-coltura ad un ingrandimento di 0,8 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra).	85
Figura 4.17 A sinistra callo pre-embriogenico e primi embrioni somatici allo stadio globulare, a destra embrioni somatici allo stadio a cuore, ottenuto da fiore intero di Lambrusco Salamino.....	86
Figura 4.18 Embriogenesi somatica da fiore intero di Lambrusco Salamino. Si nota la contemporanea presenza di embrioni somatici allo stadio a torpedo e cotiledonare.	87
Figura 4.19 Embrione somatico di Ancellotta infettato con il ceppo EHA101 di <i>A. tumefaciens</i> contenente il costruito chimera, visualizzato a 72 ore dalla co-coltura ad un ingrandimento di 2 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra). Si rileva un'ottima efficienza di trasformazione transiente.	88
Figura 4.20 Callo embriogenico esprime GFP su substrato DM solido, sviluppatosi dagli embrioni somatici di Ancellotta infettati con il ceppo EHA101 di <i>A. tumefaciens</i> dopo 4 settimane dall'inizio della subcultura. A sinistra visualizzato sotto luce bianca, a destra sotto luce UV con filtro GFP, ad un ingrandimento di 2 x.....	89
Figura 4.21 Callo embriogenico esprime GFP su substrato E96 solido, sviluppatosi dagli embrioni somatici di Ancellotta infettati con il ceppo EHA101 di <i>A. tumefaciens</i> dopo 4 settimane dall'inizio della subcultura. A sinistra visualizzato sotto luce bianca, a destra sotto luce UV con filtro GFP, ad un ingrandimento di 2 x.....	90

ELENCO DEI GRAFICI

- Grafico 4.1 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti infettati delle diverse combinazioni agrobatterio-genotipo, dopo 3 e 12 settimane dalla co-coltura con *A. rhizogenes* (in blu) e *A. tumefaciens* EHA101 (in rosso). Si valutano le differenze significative tra i trattamenti. 70
- Grafico 4.2 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti di Thompson Seedless infettati con il ceppo EHA101. Si rilevano differenze significative tra i valori ottenuti alla terza e alla dodicesima settimana. 77
- Grafico 4.3 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti di Thompson Seedless infettati con il ceppo EHA101. Si rilevano differenze significative tra i valori ottenuti alla terza e alla dodicesima settimana sia nel caso in cui sia stato integrato il costrutto 441 (in arancione) sia nel caso in cui sia stato integrato il costrutto chimera (in viola). 82
- Grafico 4.4 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti di Thompson Seedless infettati con il ceppo EHA101. Non si rilevano differenze significative rispetto ai due costrutti genici utilizzati (441 in arancione, chimera in viola). 83

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

2,4-D	Acido-2,4-diclorofenossiacetico
ABA	Acido abscissico
AGO	Argonauta
ANOVA	Analysis of variance
BA	6-benziladenina
BP	Paia di basi
CV.	Cultivar
DCL	Dicer-like proteins
DOC	Denominazione di origine controllata
DOCG	Denominazione di origine controllata e garantita
DOP	Denominazione di origine protetta
dsRNAs	Small RNA duplex (RNA a doppio filamento)
GFP	Green fluorescent protein
GUS	Beta-glucuronidasi
HIGS	Host-induced gene silencing
HPRNAs	Short hairpin RNA
IAA	Acido indol-3-acetico
IGP	Indicazione geografica protetta
KB	Kilobasi
MAS	Marker assisted selection
MIRNAs	MicroRNA
MRNA	RNA messaggero

MS	Terreno di Murashige e Skoog
NAA	Acido alfa-naftilacetico
NOA	Acido 2-naftossiacetico
NBTs	New Breeding Techniques
NPTII	Neomicin fosfotransferasi II
OIV	Organizzazione internazionale della vigna e del vino
ONU	Organizzazione delle Nazioni Unite
PCR	Reazione a catena della polimerasi
PTGS	Post-transcription gene silencing
RDRs	RNA polimerasi RNA-dipendenti
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference
SIGS	Spray-induced gene silencing
siRNAs	Short interfering RNA
sRNAs	Small nuclear RNA
snRNAs	Small nucleolar RNA
TDZ	Thidiazuron

Capitolo 1

INTRODUZIONE

L'Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile, sottoscritta da 193 Paesi membri dell'ONU, presenta i 17 Obiettivi per lo Sviluppo Sostenibile la cui realizzazione chiama al senso della responsabilità anche il settore agricolo (ONU, 2015). Ebbene, si parla ormai sempre più di sviluppare strategie agricole che siano ecosostenibili, che permettano all'agricoltura di essere resiliente ai cambiamenti climatici e di ridurre l'impatto ambientale delle proprie azioni per una migliore uso e conservazione delle risorse. A tal proposito, aspetto fondamentale di cui l'agricoltura deve tenere conto è quello della difesa fitosanitaria delle colture dagli agenti patogeni e parassitari che causano ingenti perdite economiche. Le tecniche di difesa fitosanitaria convenzionali, basate sull'utilizzo massale di prodotti chimici, sono ormai obsolete, spesso coinvolte nello sviluppo di ceppi patogeni resistenti, nei processi di inquinamento ambientale e nella riduzione della salubrità dei prodotti alimentari. Negli anni si sono sviluppate e applicate con risultati interessanti le tecniche di lotta integrata e lotta biologica, con cui si riesce a controllare patogeni e parassiti tramite interventi a basso impatto ambientale, rispettosi anche degli organismi utili. A queste si affianca poi un'ulteriore possibilità rappresentata dall'uso delle biotecnologie che mostrano di avere una grande potenzialità nello sviluppo di strategie di difesa fitosanitaria ancora più efficienti, su cui ci si dovrebbe concentrare maggiormente e su cui però ancora l'opinione pubblica mostra parecchia disinformazione. Eppure le biotecnologie applicate al mondo vegetale rappresentano una grande risorsa per risolvere le grandi sfide attuali e future che l'agricoltura dovrà affrontare. In questo lavoro di tesi viene presentata la possibilità di ottenere, attraverso l'applicazione di protocolli di rigenerazione e di trasformazione genetica, genotipi di vite che acquisiscono la resistenza alla peronospora tramite il meccanismo di silenziamento genico, presentando quindi la possibilità di una concreta soluzione basata sulle biotecnologie al tema della difesa fitosanitaria in viticoltura.

1.1 La vite

La viticoltura è uno dei maggiori settori di eccellenza dell'agricoltura italiana, che può vantare produzioni di qualità apprezzate dai mercati europei e internazionali. Nonostante il settore vitivinicolo affronti spesso situazioni critiche dovute a fattori ambientali, quali in particolare cambiamenti climatici e diffusione di fitopatologie, e a frequenti situazioni di frammentazione della struttura produttiva, l'Italia continua ad essere il primo produttore mondiale di vino, con una produzione registrata nel 2019 pari a 47,5 milioni di ettolitri, rappresentando il 18,3% della produzione mondiale, e con una superficie vitata pari a 708 milioni di ettari (OIV, 2020). In realtà l'aumento dell'1% della superficie vitata in Italia nel 2019 non ha portato ad un aumento effettivo della produzione totale, di cui anzi si è registrato un calo del 13% rispetto all'annata favorevole del 2018 (OIV, 2020). Il calo produttivo nel 2019 si è riscontrato in maniera consistente anche negli altri due paesi forti, Francia e Spagna, che insieme all'Italia hanno rappresentato il 48% dell'intera produzione mondiale di vino (OIV, 2020). Per quanto riguarda la produzione di uva da tavola, l'Italia rientra nella top ten dei produttori mondiali, rientrando nel 2018 al settimo posto con una produzione di 1,1 milioni di tonnellate e registrando un aumento del 10% rispetto all'anno precedente (OIV, 2019). Inoltre, diverse sono le produzioni certificate che conquistano il mercato, tra cui si riscontrano le 526 denominazioni di vini DOP (408) e IGP (118), le 3 denominazioni IGP di uva da tavola (di Canicattì, di Mazzarrone, di Puglia), e le numerose certificazioni di produzioni in biologico (ISMEA Mercati, 2020).

La produzione vitivinicola si basa fondamentalmente sulla coltivazione di diverse varietà che appartengono quasi esclusivamente alla specie *Vitis vinifera*, caratteristica del territorio europeo (Palliotti, et al., 2018), che a sua volta si suddivide in due sottospecie:

1. *sub-specie sativa*, caratterizzata da fiori ermafroditi, comprende quasi tutte le varietà coltivate nel mondo per la produzione di uva per il consumo fresco, l'essiccazione o la vinificazione;
2. *sub-specie sylvestris*, comprende le forme selvatiche, di scarso interesse per la coltivazione, caratterizzata da fiori unisessuati (maschili o femminili), grappoli e acini piccoli e poco zuccherini.

La specie *V. vinifera* appartiene al genere *Vitis* (famiglia *Vitaceae*), di cui fanno parte altre specie interessanti soprattutto per essere impiegate come portinnesti e per le attività di miglioramento genetico, quali *Vitis rupestris*, *Vitis riparia*, *Vitis berlandieri* e *Vitis labrusca*, di origine americana.

1.1.1 *Caratteristiche morfologiche*

La vite è una pianta legnosa perenne, a foglia caduca nei climi temperati d'origine, mentre tende ad essere sempreverde nelle regioni tropicali in cui si è diffusa successivamente (Palliotti, et al., 2018). È una specie a fecondazione principalmente autogama e in parte allogama (ad impollinazione principalmente anemofila).

La vite viene ampiamente coltivata come pianta bimestre in cui il sistema radicale è solitamente rappresentato dal portinnesto, mentre la cultivar definisce la struttura caulinare di cui fanno parte scheletro e chioma. Il sistema radicale è formato da diverse tipologie di radici, quali radici di sostegno o di 1° ordine con funzioni di ancoraggio, riserva e trasporto di nutrienti, radici esploranti o di 2° ordine con maggiore capacità esplorativa, e numerose radici fini con funzione di assorbimento. Lo scheletro è la parte perenne della parte epigea della pianta, è formato da strutture legnose (alcune poliennali) ricoperte da ritidoma quali fusto, branche e tralci. Sul fusto, caratterizzato da funzioni di sostegno, riserva e conduzione, si inseriscono le numerose branche e/o i cordoni permanenti (branche di I ordine a sviluppo orizzontale), che a loro volta portano branche di ordine superiore su cui si inseriscono i tralci legnosi di un anno. I tralci sono organi annuali, aventi in media 15-20 nodi separati da internodi di lunghezza inizialmente molto ridotta, che cresce dalla base (corona) fino al 4°-5° nodo. Sul tralcio si trova la gemma ibernante, che schiude l'anno successivo per formare il germoglio, e si può trovare anche un asse laterale detto femminella, originato da una gemma pronta. Lungo il tralcio, tra il 3° e il 7° nodo e in posizione opposta alla gemma ibernante, si trovano i residui dei grappoli. Al di sopra della zona dei grappoli, sempre in posizione opposta alla gemma ibernante, si trovano cirri e viticci, organi di aggancio omologhi ai grappoli. A partire dal 3°-7° nodo il tralcio è formato da una successione di fitomeri, cioè una tripletta di nodi con i primi due provvisti di viticci o grappoli e il terzo che ne è privo. Si definiscono capi a frutto i tralci potati lasciando almeno 5-6 nodi, e speroni quelli potati lasciando 1-3 nodi. Infine i succhioni, presenti sulle strutture perenni, sono delle strutture che si sviluppano da gemme dette latenti (che derivano dalle gemme ibernanti non schiuse nell'anno successivo alla loro formazione). La chioma è la parte effimera del sistema caulinare ed è rappresentata dall'insieme dei germogli, organi erbacei che si sviluppano dalle gemme ibernanti presenti su ogni nodo del tralcio legnoso, e in alcuni casi anche dalle gemme della corona o dalle gemme latenti. I primi 8-10 nodi derivano dallo sviluppo dei primordi già preformati nella gemma ibernante, mentre il resto si forma dal meristema apicale del germoglio in crescita. Sul nodo, all'ascella fogliare si trovano le gemme che per dominanza apicale non si sviluppano nello stesso anno di formazione, pertanto sono destinate a diventare gemme ibernanti. In particolari condizioni,

all'ascella della foglia, il meristema ascellare, non protetto da perule e pertanto non idoneo a svernare, riesce a sfuggire al controllo dato dalla dominanza apicale, dando origine ad una femminella (asse vegetativo secondario). Le foglie sono semplici tipicamente palmate con 5 nervature che danno origine a 3-5 lobi, provviste di un lungo picciolo. Mostrano spiccata eterofillia, per cui forma e dimensioni possono variare, e hanno disposizione alterna distica. La pagina superiore ha epidermide cutinizzata e priva di stomi, presenti nell'epidermide inferiore. La pagina inferiore della foglia può essere ricoperta da tomento, la cui fittezza è una caratteristica genetica, usata anche per il riconoscimento varietale.

I fiori sono riuniti in un'infiorescenza a grappolo ramificato (racemo), la cui dimensione e posizione sul germoglio è una caratteristica genetica utile al riconoscimento varietale, così come il numero delle infiorescenze per germoglio (in media 1-2). Un'infiorescenza può avere una lunghezza media variabile tra valori minimo 7-8 cm e massimo 30 cm, e il numero di fiori può essere compreso tra 100 e oltre 2.000. È dotata di un peduncolo, che la raccorda all'asse del germoglio, e di un asse principale ramificato (rachide), che porta i fiori riuniti a gruppi di 3-5 a formare i racemoli. Il fiore è piccolo, poco appariscente e di colore verde, formato da un calice gamosepalo con 5 sepali verdi saldati tra loro e poco sviluppati e da una corolla gamopetala con 5 petali saldati all'apice, detta caliptra. L'androceo contiene generalmente 5 stami ognuno dei quali presenta un filamento che sorregge un'antera biloculare a deiscenza longitudinale, e un pistillo formato da una parte inferiore rigonfia, con l'ovario sormontato da uno stilo corto che termina in uno stigma umido. L'ovario è formato da 2 carpelli, contenenti ciascuno 2 ovuli, alla cui base ci sono 5 ghiandole nettariifere in posizione alterna ai filamenti staminali, da cui si sviluppa un liquido che favorisce l'adesione del polline e la sua germinazione. Il fiore di vite è solitamente ermafrodito e autofertile, seppur ci sono casi di fecondazione allogama con trasporto di polline che avviene principalmente a carico del vento, sebbene sia possibile anche ad opera degli insetti. I frutti, riuniti nell'infruttescenza a grappolo composto, sono bacche dette acini collegate al rachide tramite il pedicello, formate da esocarpo (buccia), mesocarpo (polpa) ed endocarpo contenente i semi o vinaccioli. Il vinacciolo è piriforme, presenta un corpo allargato e un becco. Sulla parte dorsale del corpo si nota un avvallamento, detto calaza, ed un solco, detto rafe, mentre nella parte ventrale ci sono 2 fossette. Nel becco è collocato l'embrione.

1.1.2 Importanza del settore vitivinicolo in Italia

Il settore vitivinicolo in Italia ha un importante peso sull'economia del Paese, caratterizzato da un fatturato annuo di 11 miliardi di euro, pari all'8% del fatturato nazionale del settore agroalimentare, ben 2 mila imprese industriali e 50,4 milioni di ettolitri di vino prodotti nel

2018 (Unicredit, 2019) e 47,5 milioni di ettolitri nel 2019 (OIV, 2020), che garantisce all'Italia l'importante ruolo nella produzione mondiale. Si rileva una forte propensione all'export, con un fatturato pari a 6,2 miliardi di euro generato sui mercati esteri (Unicredit, 2019), acquisendo la posizione di secondo esportatore mondiale di vini (Sarnari, 2019), dovuto soprattutto al forte successo dei vini tipici italiani associati alle certificazioni DOP e IGP, che conquistano i consumatori per i sapori tipici che li caratterizzano, fortemente legati alla terra e alla tradizione italiana. In particolare si registrano valori di esportazione dei vini DOP e IGP compresi tra il 58% e il 63% nel 2018, di cui si rilevano in totale 526 produzioni certificate per cui l'Italia detiene il primato mondiale dei vini certificati (ISMEA Mercati, 2020). Le regioni in cui si concentra la maggiore produzione di vini certificati sono Piemonte, Trentino-Alto Adige, Toscana, Veneto e Friuli-Venezia Giulia. Secondo un recente studio di UniCredit, si registra un contributo importante dalle regioni del Mezzogiorno per la produzione di vini da tavola, in cui sono presenti 7700 aziende vitivinicole, caratterizzate inoltre da una crescente produzione di vini certificati, che rappresentano circa il 10% della produzione nazionale, con Puglia, Sicilia e Campania che registrano ottimi livelli produttivi (UniCredit, 2020). Inoltre, si registra un crescente interesse nel consumo di vini biologici con la conseguente risposta di un registrato aumento delle superfici dedicate al biologico (Sarnari, 2019).

Tra le problematiche principali che colpiscono il settore vitivinicolo in Italia ci sono il costante calo dei consumi interni, registrato fin dagli anni '70, con un consumo pro-capite poco inferiore ai 40 litri per persona (CRIBIS, 2019), per cui i produttori si vanno orientando sempre più sui mercati esteri, e i livelli consistenti di giacenza registrati annualmente a fine campagna, dovuti ad una mancata risposta efficiente della domanda complessiva rispetto alla variabilità dell'offerta, che si sommano alla produzione dell'annata successiva, potendo causare problematiche di mercato se non gestiti bene. Il settore è poi caratterizzato da imprese di dimensioni molto diverse, con una diversa competitività strettamente legata alle condizioni strutturali e al territorio, coinvolte spesso in realtà cooperative che rappresentano un importante sostegno. Si è notato ad esempio che le imprese più fragili, che non riescono ad essere forti e competitive come dovrebbero, sono quelle di dimensione intermedia, quindi non abbastanza grandi per operare nella parte oligopolistica del mercato con un pieno sfruttamento delle economie di scala e fin troppo grandi per posizionarsi con successo nel mercato di nicchia (Sarnari, 2019). A livello tecnico-agricolo, le problematiche legate alla difesa fitosanitaria e alle questioni ambientali dovute al cambiamento climatico, comportano la necessità di sviluppare particolari strategie per garantire al settore vitivinicolo l'alta produzione che determina il forte successo economico del settore. È necessario favorire lo sviluppo di

innovazioni, tecnologie, modelli organizzativi e competenze specifiche per i diversi modelli produttivi (Sarnari, 2019), innovazioni che coinvolgono anche il settore del miglioramento genetico, che deve però tenere conto del fatto che il successo dei vini italiani nel mercato, sia interno che estero, è fortemente dovuto all'apprezzamento dei vini ottenuti dai vitigni certificati, marchi portabandiera della produzione italiana di qualità a cui numerosi consumatori sono affezionati. Per tale motivo si reputa come inadatta l'idea di volersi limitare all'uso delle tecniche tradizionali di miglioramento genetico a fronte della disponibilità di numerose nuove tecnologie che permettono di ottenere genotipi capaci di fronteggiare le principali problematiche della viticoltura mantenendo l'identità che caratterizza i vitigni certificati (DOC e IGP).

1.1.3 *Miglioramento genetico della vite*

Il miglioramento genetico è definito come la scienza di individuare, cambiare e migliorare le piante nel succedersi delle generazioni attraverso la modifica del patrimonio genetico (Barcaccia & Falcinelli, 2011). Nel caso della vite è stato fortemente essenziale e necessario nel momento in cui la viticoltura europea si trovava in forte difficoltà per le nuove malattie introdotte a metà dell'800, causa di forte perdite economiche. Di conseguenza uno dei principali obiettivi delle attività di miglioramento genetico dell'epoca fu quello di sviluppare nuovi genotipi caratterizzati da resistenza o tolleranza verso queste avversità biotiche, in particolare fillossera, oidio e peronospora, obiettivo che permane ancora oggi e che riguarda sia i portinnesti che le cultivar. A questo si aggiungono altri obiettivi, quali l'aumento della produttività sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, l'adattabilità verso stress abiotici e altri biotici, la modificazione della struttura dell'albero a livello di vigoria e habitus vegetativo, la diversificazione dell'epoca di maturazione, ecc.

I breeder che si occupano della vite devono tenere conto delle caratteristiche che contraddistinguono questa specie come pianta arborea, quali il tipico ciclo poliennale, le fasi fenologiche differenziate, la lunga fase di giovanità (nella vite può durare da 3 a 6 anni), l'eterozigosi, la poliploidia (poco diffusa in vite) e i caratteri di autoincompatibilità in particolari specie (drupacee, pomacee, olivo, nocciolo, castagno). *V. vinifera subsp. sativa* è una specie autogama, caratterizzata da una grande variabilità genetica che ha portato negli anni ad ottenere genotipi particolarmente interessanti grazie a specifiche combinazioni di caratteri di interesse agronomico e commerciale. In alcuni casi tale variabilità è dovuta a mutazioni gemmarie e a modificazioni genetiche causate da virus, che comportano una variazione a livello dei principali caratteri per cui si può parlare di popolazioni con numerosi biotipi che possono essere considerate a pieno titolo varietà locali (Barcaccia & Falcinelli, 2011).

I metodi di miglioramento genetico tradizionale per la vite sono la selezione clonale e l'incrocio/ibridazione. Per selezione clonale si intende quella procedura che identifica le mutazioni solitamente non evidenti dal punto di vista fenotipico. Per la vite si deve seguire il particolare protocollo di selezione clonale presente nel Decreto del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali del 6 Febbraio 2001 nel quale vengono indicate le varie fasi da seguire. L'iter inizia con la valutazione della variabilità di un vitigno e l'individuazione delle piante madri dei presunti cloni in base alle caratteristiche che interessano al selezionatore, su cui si effettuano poi dei test fitosanitari sulla cui base si scartano i cloni non adatti. Individuati i cloni interessanti, per cui è possibile effettuare risanamento mediante termoterapia o coltura *in vitro* di meristemi apicali nel caso non si siano superati i test fitosanitari, si passa alla costituzione di almeno un vigneto di moltiplicazione, con minimo 20 ceppi per ogni biotipo sullo stesso portinnesto, e si effettuano rilievi agronomici sulle discendenze clonali per almeno 3 annate per assicurarsi che il carattere per cui quel clone è stato individuato sia stabile nel tempo. Per i vitigni da uva da vino è presente un passaggio in più in cui si devono effettuare una serie di analisi per valutare le potenzialità enologiche. Superato positivamente l'iter, il clone, che deve mostrare caratteristiche migliori rispetto alla media delle popolazioni da cui deriva, potrà essere sottoposto alla procedura di omologazione, per il quale è competente il Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali. Vari sono i cloni ottenuti tramite selezione clonale iscritti nel catalogo cloni del Registro Nazionale delle varietà di Vite, quali ad esempio i cloni Fedit 18, Rauscedo 2, VCR 540, CAB 1 e VCR 463 di Ancellotta, i cloni Rauscedo 5, CAB 1, CAB 3, VCR 1, VCR 23, VCR 20, Ampelos TEA 2D, VITIS 5 e VITIS 7 di Lambrusco Salamino, il clone VCR 122 di Thompson Seedless e i 14 cloni di Kober 5BB (Mipaaf, 2020).

Si definisce incrocio l'unione di due individui appartenenti alla stessa specie mentre ibridazione l'incrocio tra due individui appartenenti a specie o generi diversi. Gli ibridi sono stati il risultato di incroci spontanei o effettuati dai viticoltori nelle colonie americane tra i vitigni locali e il materiale vegetativo di viti portate dall'Europa, e hanno avuto maggiore successo per le uve da tavola che per quelle destinate alla vinificazione, che hanno avuto invece una certa difficoltà nel trovare un posto accanto alle varietà di *V. vinifera* molto apprezzate e fortemente legate al territorio. L'alta eterozigosi che caratterizza la vite comporta un importante carico di alleli recessivi sfavorevoli. Per evitare il fenomeno della depressione da inbreeding, che porta alla comparsa dei caratteri recessivi e per cui non è conveniente protrarre a lungo l'autofecondazione, si considera come miglior metodo per il breeding

l'incrocio tra i migliori individui di linee non imparentate, ricorrendo occasionalmente a reincontri per concentrare le combinazioni di caratteri desiderabili (Grande, 2007).

Da metà '800, con la diffusione in Europa di oidio, fillossera e peronospora, si effettuarono i primi incroci tra viti europee e specie americane col fine di ottenere vitigni da vino resistenti, i cosiddetti ibridi produttori diretti (Isabella, Clinton, Noah, Jaquez, Herbemont, ecc.). Dai primi risultati si vide che gli ibridi ottenuti utilizzando come parentale *V. labrusca* erano discretamente tolleranti alle malattie crittogamiche ma non totalmente resistenti alla fillossera, inoltre presentavano spesso problemi di adattamento ai suoli europei e le qualità organolettiche dell'uva erano molto scarse. A tal proposito nel 1931 fu emanata una legge che vietava la coltivazione degli ibridi produttori diretti per la produzione di uva da vino (Legge 376/31). Si passò poi dagli ibridi produttori diretti agli ibridi produttori innestati su portinnesto americano, che tuttavia in Europa non ebbero successo perché, nonostante garantissero una produzione abbondante e una discreta tolleranza alle ampelopatie, a livello qualitativo i risultati non erano ancora tali da poter sostituire i vitigni europei. Infatti, il vino ottenuto da questi ibridi risultava essere scarso a causa del sapore "volpino" tipico dell'uva fragola, inoltre gli acini della *V. labrusca* e dei suoi discendenti contenevano pectine che in vinificazione producono alcol metilico. Nonostante questi insuccessi, comunque la ricerca ha continuato in progetti di ibridazione negli Istituti di ricerca francesi, tedeschi, ungheresi e americani. Ad esempio in Germania si incrociarono vecchi ibridi con cultivar di *V. vinifera* per migliorare le caratteristiche qualitative del vino e la tolleranza alle malattie crittogamiche, ottenendo differenti ibridi cosiddetti di terza generazione per cui è stata proposta la denominazione di "varietà di vite resistenti alle malattie", che presentano tolleranza a oidio e peronospora e che danno vini esenti dall'aroma "volpino" (Gribaudo & Grando, 2005). Alcuni ibridi da vino di terza e quarta generazione sono il Ruby Cabernet (Cabernet sauvignon x Carignan), il Pinotage (Pinot nero x Cinsault), il Manzoni bianco (Riesling renano x Pinot bianco), l'Albarossa (Barbera x Nebbiolo di Dronero), il Bussanello (Riesling italiano x Furmint), il Rebo (Merlot x Teroldego), il Petit Bouschet (Aramon x Tinturier), il Müller Thurgau (Riesling x Madeleine Royale) e l'Armagnac (Folle blanc x Noah). In Italia nel 2009 sono stati inclusi nel Registro Nazionale delle varietà di Vite per la prima volta degli ibridi interspecifici, il Bronner e il Regent, ottenuti a Friburgo in Germania. Altre immissioni degli ibridi ottenuti a Friburgo sono state fatte poi nel 2013 e nel 2014 sono stati inseriti il Muscaris e il Souvignier Gris. Infine, nel 2015 sono stati inseriti altri 10 vitigni ibridi che mostrano resistenza a oidio e peronospora (Fleurtaï, Soreli, Julius, Cabernet Eidos, Cabernet Volos, Merlot Kanthus, Merlot Khorus, Sauvignon Kretos, Sauvignon Nepis, Sauvignon Rytos) ottenuti dall'Università di Udine nella

selezione di incroci tra importanti varietà francesi e ibridi complessi ungheresi e tedeschi (Intrieri, 2019). In Italia da qualche anno è ormai diventato possibile coltivare ibridi e poter vinificare però soltanto per vini da tavola e per gli IGP, resta invece il divieto d'uso per la produzione di vini DOC e DOCG (DOP). Diversi programmi di ricerca in Italia sono attivi al Fem di San Michele all'Adige, nei Centri di Ricerca del Crea per la Viticoltura e l'Enologia di Conegliano e di Arezzo, al Centro Ricerche Produzioni Vegetali dell'Emilia-Romagna e c'è interesse anche da parte di alcune organizzazioni vivaistiche private. Nei programmi di incrocio si utilizzano come parentali i vitigni tradizionali ibridati con le migliori varietà interspecifiche di ultima generazione (Intrieri, 2019). L'obiettivo è quello di ottenere nuove accessioni che abbiano una certa resistenza alle tipiche fitopatie caratterizzate anche da buone caratteristiche enologiche e da altri aspetti interessanti, come un forte aumento della fertilità, cicli brevi, precocità di maturazione e minore sensibilità ai geli invernali.

Riguardo alle uve da tavola, le cultivar ottenute per ibridazione si sono affermate con maggiore successo. Tra le prime si rilevano la Regina dei Vigneti (bacca bianca, Elisabeth x Perla di Csaba), l'Italia (bacca bianca, Bicane x Moscato d'Amburgo) che è l'uva da tavola più coltivata in Italia e tra le più diffuse al mondo, le californiane a bacca rossa Cardinal e Red Globe, la Michele Palieri (bacca nera, A. Lavallée x Red Malaga), la Matilde (bacca bianca, Italia x Cardinal) e la Victoria (bacca bianca, Cardinale x Regina). Nella valutazione di un ibrido è importante considerare che l'ambiente ha un forte controllo sull'espressione del fenotipo, per cui è necessario sviluppare programmi di breeding locali per ottenere genotipi adatti a una determinata località. Uno dei foci per il miglioramento genetico delle uve da tavola è stato quello di ottenere uve apirene, a grande richiesta dal mercato. L'apirenia nella vite si può ottenere per partenocarpia, in assenza di fecondazione, o per stenospermocarpia, in cui si ha la fecondazione, però dopo l'allegagione l'embrione abortisce e si formano i cosiddetti semi rudimentali. Ovviamente non è possibile utilizzare viti apirene come parentale femminile. Queste sono usate soltanto come parentale maschile impollinatore da cui però si ottengono differenti gradi di apirenia. Per superare questo ostacolo si usa la tecnica dell'*embryo rescue*, cioè il prelievo precoce degli embrioni e la loro coltura *in vitro* fino allo sviluppo della plantula, che permette di effettuare poi un'impollinazione controllata tra due genotipi apireni e indurre la germinazione degli embrioni che altrimenti abortirebbero.

Riguardo ai portinnesti, fin dall'inizio si è adottato come metodo principale quello dell'ibridazione utilizzando come parentali le specie americane *V. riparia*, *V. rupestris* e *V. berlandieri* poiché mostravano una certa tolleranza alla fillossera. Per migliorare la capacità di radicazione e la tolleranza ad alte concentrazioni di calcare, alcune selezioni furono poi

incrociate con *V. vinifera*. Gli obiettivi che riguardano il miglioramento genetico dei portinnesti sono le resistenze a stress biotici, quali fillossera e nematodi, e a stress abiotici, quali clorosi ferrica, siccità, salinità, carenze o eccessi minerali, lo sviluppo di portinnesti con differenti gradi di vigoria, e il livello di influenza sulla maturazione del nesto. Dai primi incroci semplici si sono ottenuti portinnesti per suoli non clorosanti da *V. riparia* x *V. rupestris* (3309 C, 101-14), portinnesti per suoli fertili e non siccitosi da *V. berlandieri* x *V. riparia* (Kober 5BB, S.O.4, 420 A, 161-49 C, 157-11 C, 125 AA, 34 EM), portinnesti per suoli poveri e siccitosi da *V. berlandieri* x *V. rupestris* (1103 Paulsen, 140 Ruggeri, 110 Richter, 775 Paulsen, 779 Paulsen) e portinnesti per suoli molto calcarei da *V. berlandieri* x *V. vinifera* (41 B, Fercal), quasi tutti resistenti o tolleranti alla fillossera (Palliotti, et al., 2018). Successivamente sono stati prodotti gli ibridi complessi, chiamati così perché derivano da più generazioni di incroci, tra cui Star 50, Star 74 e M3, ottenuti presso le Università di Bologna e di Milano e registrati nel 2014, che tollerano la fillossera e la clorosi ferrica e inducono una vigoria abbastanza contenuta. Rispetto alla resistenza a nematodi, sono stati utilizzati come portinnesti dotati di questa caratteristica alcuni semenzali delle due specie americane *Vitis champini* e *Muscadinia rotundifolia*, che però non possono essere utilizzati in Europa perché sono specie non resistenti alla fillossera. Tra i primi ibridi ottenuti ci sono l'Harmony e il Freedom, risultati dall'incrocio tra il 1613 C con un semenzale di *V. champini*, che inducono un elevato vigore vegetativo nelle cultivar che vi sono innestate e che però non sono utilizzabili in Europa per lo stesso motivo precedente, ma sono molto diffusi in Australia in cui la fillossera è abbastanza circoscritta. Invece, portinnesti che mostrano un moderato livello di resistenza alla fillossera e che tollerano i nematodi del genere *Xiphinema spp.* sono VR039-16 e VR043-43, ottenuti dall'ibridazione tra *V. vinifera* e *M. rotundifolia*, e UCD-GNR 1 ottenuto dall'ibridazione tra *V. rupestris* e *M. rotundifolia*.

Altre tecniche di miglioramento genetico tradizionali applicate su vite sono la mutagenesi indotta, basata sull'induzione artificiale di mutanti attraverso mezzi chimici (colchicina, utile per ottenere apirenia) o fisici (cobalto-60, raggi X e γ), e la selezione somaclonale, basata sulla rigenerazione in vitro di plantule a partire da espunti meristemati e tissutali su terreni di coltura che sottoposti a determinati trattamenti sviluppano variabilità somaclonale. Per variabilità somaclonale si intende l'insieme delle variazioni genetiche che insorgono in tessuti vegetali quando coltivati *in vitro*, variazioni che possono alterare caratteri sia qualitativi che quantitativi e che sono ereditabili. Il livello di variazione che si sviluppa dipende dall'origine dell'espunto utilizzato, dalla lunghezza dei cicli di coltura in vitro e dalla natura e concentrazione delle sostanze chimiche utilizzate nel substrato. Tali mutazioni, nel caso di

tessuti apicali, possono svilupparsi anche soltanto a livello di alcuni strati istogeni per cui si sviluppa del chimerismo. Numerose sono le mutazioni naturali spontanee per cui si sono ottenute interessanti cultivar, come i Pinot bianco e Pinot grigio, che sono mutazioni del Pinot nero, la Easy Cardinal, mutazione della Cardinal, la Concord apirena, e la Malvasia rosa, mutazione della Malvasia di Candia. Non si registrano particolari genotipi ottenuti tramite la mutagenesi artificiale, mentre sono state fatte alcune sperimentazioni per selezionare somacloni resistenti ad alte concentrazioni di NaCl, senza dare particolari risultati (Gribaudo & Grando, 2005).

1.2 Biotecnologie e ingegneria genetica

Approcci alternativi al breeding convenzionale arrivano dai settori delle biotecnologie molecolari e dell'ingegneria genetica applicati alle cellule vegetali. L'obiettivo di sviluppare nuove varietà di vite resistenti alle fitopatie continua attraverso le tecniche di incrocio e selezione clonale, e queste sono già supportate da alcune biotecnologie come la selezione assistita da marcatori (MAS) e l'ottenimento di informazioni molecolari dettagliate sul genoma di vite, sequenziato per la prima volta nel 2006 dai ricercatori della Fondazione Edmund Mach e dell'Università di Udine (Velasco, et al., 2007), e sull'espressione genica. Le tecniche di ingegneria genetica basate sull'uso del DNA ricombinante sono una grande risorsa per ottenere risultati in modo più veloce ed efficiente. L'ingegneria genetica permette infatti di modificare rapidamente uno o pochi tratti di una cultivar evitando di alterare la complessa costituzione del genotipo affermato e mantenendo quindi le caratteristiche distintive della cultivar (Grande, 2007). Risulta quindi essere una rilevante risorsa per il miglioramento genetico dei vigneti d'élite, per cui le tecniche tradizionali non hanno mai raggiunto risultati del tutto soddisfacenti. Inoltre, risulta essere un'importante risorsa per l'adattabilità ai cambiamenti climatici e per la sostenibilità ambientale dei vigneti, aspetti sempre più importanti su cui concentrarsi per portare avanti produzioni di qualità.

La trasformazione genetica è una tecnica che consente di trasferire, inserire e integrare geni esogeni in un altro organismo, scavalcando qualunque vincolo di compatibilità sessuale tra gli organismi così da poter prelevare geni anche da organismi donatori geneticamente molto distanti dall'accettore. Le piante ottenute tramite questa tecnica diventano così organismi geneticamente modificati, definiti dalla Direttiva 2001/18/CE come "organismi il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale". L'inserimento dei geni esogeni all'interno del genoma della pianta può avvenire attraverso un trasferimento diretto, in cui il costrutto è

inserito inizialmente in vettori di clonaggio e poi da questo estratto, linearizzato e inserito nelle cellule vegetali attraverso procedure come l'elettroporazione, la microiniezione, la fusione di liposomi e il bombardamento biolistico, o indiretto, utilizzando vettori di trasformazione virali o batterici opportunamente modificati.

Il principale vettore utilizzato per la trasformazione genetica indiretta è *l'Agrobacterium tumefaciens*, batterio gram-negativo che, penetrando una ferita, causa nella pianta una malattia neoplastica che porta alla formazione di tumori che si sviluppano principalmente sul fusto. L'agrobatterio stimola la divisione cellulare e porta alla formazione di una massa disorganizzata di tessuto tumorale chiamata galla. Un'altra specie di agrobatterio utilizzata è *l'Agrobacterium rhizogenes*, batterio gram-negativo che causa la formazione di neoplasie a livello radicale. Durante l'infezione, le cellule vegetali incorporano nel proprio genoma una determinata quantità di DNA che proviene dal batterio. I ceppi virulenti contengono il plasmide Ti (Ri, nel caso di *A. rhizogenes*) che è un frammento circolare di DNA extracromosomiale di circa 200 kb di lunghezza non fondamentale per la vita del batterio. Il plasmide contiene il T-DNA, una piccola porzione lunga tra 12 e 24 kb che viene integrata per ricombinazione nel DNA cromosomico della cellula vegetale, e proprio in questa porzione sono presenti i geni che codificano per gli enzimi necessari per la biosintesi di auxine e citochinine (zeatina), regolandone la quantità prodotta e sviluppando un certo sbilanciamento ormonale che stimola la divisione cellulare, e di opine (octopine e nopaline) che sono amminoacidi coniugati catabolizzati come fonte di nutrimento dal batterio. A livello del plasmide Ti è poi presente la regione *vir*, lunga 35 kb, che non viene trasferita nelle cellule vegetali, in cui si trovano i geni *virA*, *virB*, *virD* e *virG* essenziali, i geni *virC* e *virE* che stimolano la formazione di tessuto neoplastico, e i geni *virF* e *virH* che non sono essenziali e infatti non sono presenti in tutti i ceppi di *A. tumefaciens*. Questi determinano la capacità infettiva dell'agrobatterio. La virulenza dell'agrobatterio è regolata da composti fenolici a basso peso molecolare e da monosaccaridi specifici che sono prodotti dalla pianta nel momento dell'infezione e stimolano i geni di virulenza. Tra questi l'acetosyringone (Godwin, et al., 1991). Questi composti sono riconosciuti dalle proteine VirA e VirG codificate dai geni *virA* e *virG*, dove VirA è una proteina sensore capace di percepire le condizioni ambientali se favorevoli per il trasferimento del T-DNA, e VirG è una proteina regolatrice di risposta. VirA interagisce con i monosaccaridi solo quando questi hanno formato un legame con una DNA-binding protein, mentre per i composti fenolici l'interazione può essere anche diretta ed è influenzata dal locus genico *virA* presente nel plasmide (Lee, et al., 1996). Altri elementi presenti nel plasmide sono le due sequenze di bordo di 25 bp che delimitano il T-DNA,

chiamate left border e right border, indispensabili per l'escissione e l'integrazione del T-DNA nel genoma della cellula ospite, la sequenza di origine della replicazione (*ori*), che permette al plasmide di mantenersi stabilmente nelle cellule batteriche in divisione, e le sequenze necessarie per la coniugazione. Il T-DNA viene integrato nel DNA cromosomico della cellula vegetale sotto forma lineare a singolo filamento, con l'estremità 5' del T-DNA delimitata dalla right border e l'estremità 3' dalla left border. Successivamente si ha la sintesi del nuovo filamento di T-DNA in direzione 5' → 3'.

La tecnica di trasformazione mediata da agrobatterio si basa sull'uso del suo naturale meccanismo di infezione, disarmando però il plasmide attraverso l'eliminazione dei geni che causano l'eccessiva proliferazione cellulare ed inserendo a livello del plasmide il costrutto genico da integrare nel genoma delle cellule vegetali infettate. Vengono eliminate anche le sequenze non necessarie al plasmide per svolgere la funzione di vettore e i geni per la sintesi delle opine. La transgenesi è stata possibile grazie alla tecnologia del DNA ricombinante, che permette l'assemblaggio *in vitro* di molecole di DNA chimeriche (il costrutto) utilizzando gli enzimi di restrizione, che tagliano il DNA, e la DNA-ligasi, che unisce l'estremità dei frammenti di DNA, e l'uso di vettori di clonaggio e di trasferimento di DNA esogeno. L'intera regione codificante del T-DNA viene sostituita assemblando più sequenze geniche per formare il costrutto genico di interesse, che contiene:

- il gene promotore, collocato a monte di ogni regione codificante di cui ne regola l'espressione genica. Il promotore può essere di tipo costitutivo, come il *35S* estratto dal virus del mosaico del cavolfiore (CaMV), determinando l'espressione del gene in tutte le cellule e in tutte le fasi della vita della pianta, o di tipo inducibile, per cui il gene viene espresso solo se sono presenti determinati stimoli, di solito stress termici o ferite, o di tipo fase-specifici o tessuti-specifici, come il *DefH9* estratto da *Antirrhinum majus*, per cui il gene si esprime solo in determinate fasi fenologiche o tessuti;
- il gene d'interesse;
- il gene marcatore di selezione che conferisce resistenza a una molecola esogena tossica per la pianta, che sia un antibiotico o un erbicida, come il gene *NPTII* che codifica per l'enzima Neomicin fosfotransferasi II (NPTII) il quale conferisce alle cellule trasformate la resistenza alla kanamicina e il gene che codifica per la fosfinotricina acetil transferasi che conferisce la resistenza all'erbicida fosfinotricina. È utile per l'identificazione e la selezione delle cellule che hanno effettivamente subito l'evento di trasformazione genica;
- il gene reporter che codifica per specifiche proteine che conferiscono una caratteristica misurabile e quantificabile rendendo possibile l'identificazione delle cellule che hanno subito l'evento di trasformazione attraverso l'uso di determinati strumenti, come i geni *eGFP* e *GUS*. L'*eGFP* codifica per la Green Fluorescent Protein (GFP), una proteina fluorescente individuata per la prima volta nella medusa *Aequorea victoria* utilizzata come biomarcatore molecolare conservativo per la sua proprietà di

emettere una fluorescenza verde brillante quando colpita da luce ultravioletta (Zimmer, 2002). Il gene *uidA* codifica per la beta-glucuronidasi, che se sottoposta a saggio enzimatico GUS tramite procedure distruttive evidenzia le porzioni putativamente trasformate di tessuto vegetale, colorandole di blu;

- il gene terminatore, che segnala la fine della trascrizione della sequenza codificante, può essere il *35S* o il *NOS* (*nopaline synthase*).

Il plasmide, in cui è stato inserito il costrutto genico, viene clonato in *Escherichia coli* e inserito nell'agrobatterio tramite elettroporesi o shock termico. Il plasmide deve necessariamente portare i geni *vir* per poter infettare la cellula vegetale. La presenza dei geni *vir* viene assicurata attraverso due possibilità: il vettore cointegrato e il vettore binario. Nel caso del vettore cointegrato, il costrutto e i geni *vir* sono sullo stesso plasmide, mentre nel caso del vettore binario il costrutto e la sequenza di geni *vir* sono clonati su due plasmidi distinti.

L'inserimento del costrutto genico avviene in modo casuale, sia per sito di inserimento che per numero di copie inserite, ed è necessario rigenerare le piante da singole cellule per non ottenere chimere. Il processo infettivo e l'inserimento del costrutto sono favoriti aggiungendo nel substrato di coltura composti fenolici come l'acetosiringone, che stimolano la trascrizione dei geni *vir* aumentando l'efficacia del processo di trasformazione. Una volta integrato il costrutto nelle cellule, queste sono sottoposte alla fase di selezione e rigenerazione in vitro, sottoponendole ad una pressione selettiva ad opera del fattore di selezione che di solito è l'antibiotico o l'erbicida per cui è stato inserito il gene di resistenza nel costrutto, la cui concentrazione viene determinata effettuando precedentemente delle prove di tossicità sulle cellule vegetali. La rigenerazione implica la calibrazione dei rapporti citochina/auxina per ottenere la formazione dei germogli e delle radici (Gentile & Mezzetti, 2007). Durante la selezione, la presenza del gene reporter permette di valutare l'andamento e individuare le cellule che hanno subito il processo di trasformazione. In realtà è a volte possibile avere dei casi di espressione transiente, per cui il risultato dato dal gene reporter non può essere utilizzato come prova conclusiva certa dell'integrazione stabile del costrutto (Barcaccia & Falcinelli, 2011). Per tale motivo è necessario svolgere un lavoro di caratterizzazione molecolare per la conferma e l'identificazione degli eventi di trasformazione, utilizzando tecniche molecolari come la PCR, con cui si effettua una prima caratterizzazione valutando la presenza/assenza del gene di interesse associato al marcatore, l'ibridazione tipo Southern Blot sul DNA, che permette di conoscere il numero di copie del costrutto inserite con successo nel genoma della pianta, e l'ibridazione tipo Northern Blot sull'RNA, che permette di valutare l'espressione genica.

Inizialmente la vite era considerata una specie recalcitrante alla trasformazione genetica, essendo inizialmente difficile l'introduzione di geni esogeni e la completa rigenerazione delle

plantule trasformate. Successivamente i protocolli di trasformazione e di rigenerazione sono stati affinati e sono stati ottenuti risultati interessanti, in alcuni casi attingendo direttamente dal germoplasma di *Vitis* soprattutto per i geni di interesse agronomico. Tra questi:

- resistenza all'antracnosi e all'oidio in Neo Muscat e Pusa Seedless, esprimendo il gene *RCC2* che codifica per la chitinasi, estratto dal genoma del riso (Yamamoto, et al., 2000);
- resistenza alle eutipine, tossine prodotte da *Eutypa lata*, ascomicete responsabile dell'eutipiosi, nel portinnesto Richter 110, esprimendo il gene *Vr-ERE* (*Vigna radiata eutypine detoxifying gene*) che converte le tossine del fungo in eutipinolo non tossico (Legrand, et al., 2003);
- inibizione della germinazione delle spore e della crescita delle ife di *Elsinoe ampelina*, il fungo che causa l'antracnosi, in Thompson Seedless tramite il gene *VvTL-1* (*Vitis vinifera thaumatin-like protein gene*) (Dhekney, et al., 2011);
- resistenza all'oidio determinata dal gene *Run1* presente nel genoma di *M. rotundifolia* (Barker, et al., 2005);
- riduzione dei sintomi della peronospora dovuta ad una sovra espressione del gene *VvWRKY1* che porta all'espressione dei geni coinvolti nella sintesi dell'acido jasmonico (Marchive, et al., 2018);
- migliore resistenza a malattie fungine in Thompson Seedless a seguito dell'introduzione del gene *STS* (*stilbene sintasi*), clonato da *V. pseudoreticulata*, che sintetizza la fitoalessina resveratrolo nel momento in cui il patogeno attacca i tessuti vegetali (Fan, et al., 2008);
- resistenza ad *Agrobacterium vitis*, il batterio che causa la rogna della vite, attraverso l'espressione del gene per la proteina *virE2* e di un peptide ad azione litica di origine animale (Vidal, et al., 2006);
- resistenza a virus ottenuta attraverso le tecniche di RNA interference (Gray, et al., 2014);
- migliore tolleranza a stress abiotici in Richter 110 attraverso la produzione di ferritina codificata dal gene *MsFer* presente nel genoma di *Medicago sativa* (Zok, et al., 2010);
- aumento della fertilità a seguito di una maggiore sintesi di auxine a livello degli acini di uva in Silcora e Thompson Seedless, per l'introduzione del gene *DefH9-iaaM* che promuove il metabolismo auxinico nelle cellule placenta-ovulo. Si ottiene una maggiore fertilità delle gemme basali dei tralci con maggiore numero di infiorescenze per germoglio, e un aumento delle dimensioni del grappolo determinato da un maggiore numero di acini per grappolo in Thompson e da maggiori dimensioni degli stessi acini in Silcora (Costantini, et al., 2007).

1.2.1 Colture in vitro e biotecnologie vegetali

Le colture in vitro comprendono quell'insieme di tecniche utilizzate per la propagazione di materiale vegetale (organi, tessuti, cellule) che danno come risultato la rigenerazione di una pianta completa, ottenuta in condizioni di sterilità su substrati nutritivi di composizione nota e in condizioni ambientali controllate (temperatura, umidità, luce). L'applicazione di queste tecniche è possibile grazie alla particolare caratteristica di totipotenza, cioè la capacità

rigenerativa delle cellule vegetali di riprodurre tessuti e organi completi e funzionali a partire da espianti, come apici meristemati ed embrioni avventizi. Nelle cellule vegetali il differenziamento è spesso reversibile e viene favorito quando il tessuto vegetale viene reciso e mantenuto in coltura. Le cellule de-differenziate possono iniziare nuovamente la divisione cellulare e, avendo tutte le informazioni genetiche necessarie, rigenerare una pianta completa. Le tecniche di colture *in vitro* rappresentano un importante strumento per le biotecnologie vegetali, utili ai fini della ricerca, del miglioramento genetico, delle attività industriali e del comparto vivaistico con la micropropagazione. Per quanto riguarda il miglioramento genetico, queste possono essere applicate per raggiungere differenti fini, come l'ottenimento di ibridi somatici tramite fusione di protoplasti, l'applicazione dell'*embryo rescue* su embrioni interspecifici o intergenerici, l'ottenimento di linee aploidi, la selezione di linee cellulari resistenti a stress abiotici e biotici e di mutanti utili ottenuti dalla variazione somaclonale, la produzione di semi artificiali, la trasformazione genetica di tessuti per la rigenerazione via organogenesi o embriogenesi per ottenere piante transgeniche.

La coltivazione *in vitro* di un tessuto vegetale si basa sull'interazione che si sviluppa tra il genotipo della pianta, le condizioni ambientali e il terreno nutritivo. Il terreno nutritivo, o substrato di coltura, gioca un ruolo fondamentale perché rappresenta la fonte nutrizionale per le cellule vegetali che *in vitro* hanno un comportamento eterotrofo, non effettuando alcun tipo di attività fotosintetica. Un terreno di coltura è solitamente formato da acqua, sali minerali, vitamine, zuccheri, fitoregolatori e agenti solidificanti. Il substrato maggiormente utilizzato per la maggior parte delle colture è il Murashige & Skoog, ideato dagli omonimi scienziati nel 1962 (Murashige & Skoog, 1962). La sperimentazione, applicata ad espianti di *Nicotiana tabacum*, ha portato allo sviluppo di un terreno contenente sali inorganici (macronutrienti quali nitrato di ammonio, cloruro di calcio, solfato di magnesio, fosfato di potassio, nitrato di potassio, e micronutrienti quali acido borico, cloruro di cobalto, solfato di rame, solfato ferroso, solfato di manganese, ioduro di potassio, molibdato di sodio, solfato di zinco), vitamine (quali tiamina, glicina, niacina, piridossina, mio-inositolo), fitoregolatori (quali acido 3-indolacetico e chinetina), e altre sostanze quali saccarosio e l'agar come gelificante, ad un pH specifico per ogni specie. Il substrato Murashige & Skoog viene applicato effettuando opportune variazioni nella formulazione che dipendono dal genotipo e dal tipo di processo che si vuole ottenere. Elementi fondamentali sono i regolatori di crescita, in particolare auxine e citochinine, la cui tipologia, concentrazione e rapporto nel substrato determinano differenti sviluppi: un alto rapporto auxine/citochinine induce la formazione di radici (rizogenesi), un basso rapporto induce la proliferazione cellulare che può risultare nella

formazione di un callo dal quale potrà rigenerare un germoglio (organogenesi indiretta), o la rigenerazione diretta di un germoglio (organogenesi diretta).

Si definisce morfogenesi il processo di differenziazione *ex novo* di strutture e tessuti organizzati a partire da un espianto (organo o porzione di organo vegetale) o da callo (aggregato di cellule indifferenziate). Questa può riguardare singoli organi, per cui si parla di organogenesi, o embrioni, per cui si parla di embriogenesi, con l'ottenimento di embrioni somatici. Organogenesi ed embriogenesi possono essere di tipo diretto o indiretto, in base al tessuto da cui parte la morfogenesi: nel caso in cui questa prenda avvio dal callo prodotto dall'espianto stesso si parla di morfogenesi indiretta, nel caso non vi sia il passaggio di produzione intermedia di callo sarà di tipo diretto. La competenza alla morfogenesi, indentificata con la totipotenza, può essere naturale o può essere indotta sottoponendo le cellule a determinati stimoli. Solitamente questa viene mantenuta dalla maggior parte delle cellule vegetali, sia quelle indifferenziate (cellule meristematiche) che quelle differenziate in modo reversibile (cellule epidermiche e floematiche), mentre viene persa dalle cellule differenziate in modo irreversibile (cellule xilematiche). La capacità cellulare alla morfogenesi è influenzata dal tipo di espianto e dipende fortemente dal genotipo: alcuni infatti si mostrano altamente recalcitranti, e questo è spesso limitante nell'applicazione delle biotecnologie cellulari applicate a piante.

1.2.2 *Organogenesi ed embriogenesi nella vite*

Per organogenesi si intende la formazione di organi unipolari (radici o germogli) a partire da aggregati cellulari indifferenziati o da tessuti vegetali non meristematici, attraverso la formazione di centri meristematici avventizi detti meristemoidi. Solitamente consta di due fasi distinte di coltura *in vitro*, quale la prima che prevede la differenziazione dei germogli e la seconda in cui si aumenta la concentrazione di auxine per la rigenerazione delle radici. Resta comunque possibile anche la sequenza inversa, con rizogenesi prima a cui segue caulogenesi. Il processo organogenico, che può essere di tipo diretto o indiretto, è caratterizzato da due fasi, quali la prima di induzione dove a livello cellulare si ha una modifica del programma di sviluppo promosso da fattori esogeni (fitoregolatori) che interagiscono con i fattori proteici cellulari coinvolti nella regolazione dell'espressione genica, e la seconda fase di differenziazione, che corrisponde all'insieme degli eventi per cui si forma il meristemoide e successivamente si rigenera l'organo, che sia radice o germoglio in base all'informazione genetica ricevuta durante l'induzione.

Per embriogenesi somatica si intende la formazione di embrioni somatici, strutture morfologicamente e fisiologicamente simili agli embrioni zigotici ottenuti dal processo di

fecondazione, a partire da singole cellule vegetali. Gli embrioni somatici sono individui completi, dotati di una struttura bipolare con un meristema apicale e un meristema radicale dai quali si può sviluppare una pianta completa. Anche il processo embriogenico è caratterizzato dalla fase di induzione e dalla fase di differenziazione, dove però l'acquisizione della bipolarità è immediata da parte della cellula precursore. L'origine degli embrioni somatici è unicellulare, a partire da cellule di piccole dimensioni in attiva divisione. Successivamente alla fase d'induzione, si differenziano da queste cellule le masse pre-embriogeniche, da dove poi una o più cellule avviano il processo per la formazione di un embrione e per l'organizzazione degli apici meristemati. Lo sviluppo ontogenetico dell'embrione somatico è molto simile a quello dell'embrione zigotico, ed è stato suddiviso in quattro fasi e cinque livelli (*stage*) (Barcaccia & Falcinelli, 2011). Nella prima fase si ha una crescita isodiametrica dell'aggregato cellulare con una serie di divisioni mitotiche che portano alla formazione di un aggregato globulare non polarizzato (*stage 1*) e poi di una struttura globulare polarizzata detta a sfera (*stage 2*) che si organizza nella seconda fase differenziando due poli, cioè l'apice caulinare e l'apice radicale. Nella terza fase si ha una progressione della polarità, con un graduale aumento dell'attività enzimatica a livello dell'asse centrale, e un'organizzazione del tessuto vascolare, dove l'embrione presenta prima una struttura a cuore (*stage 3*) e poi una a torpedo (*stage 4*). Infine, nella quarta fase si attivano i meristemi e l'embrione assume la tipica struttura cotiledonare (*stage 5*) da cui si ottiene la plantula. Anche l'embriogenesi somatica può essere diretta o indiretta. Quando diretta, gli embrioni si sviluppano direttamente da cellule del tessuto dell'espianto primario del tipo cellule pro-embriogeniche determinate che già hanno competenza per lo sviluppo embriogenico. Quando indiretta invece, lo sviluppo degli embrioni parte dal callo pre-embriogenico dove internamente si deve avere l'induzione di cellule embriogeniche determinate ottenuta grazie ai trattamenti induttivi a base di sostanze ormonali, soprattutto di auxine, che stimolano la differenziazione delle cellule embriogeniche e la maturazione degli embrioni somatici.

Per quanto riguarda l'applicazione di queste due tecniche di rigenerazione nella vite, negli anni i ricercatori si sono interessati a sviluppare diversi protocolli di organogenesi ed embriogenesi adattandoli anche alla predisposizione del singolo genotipo nel dare risultati più soddisfacenti seguendo un tipo di morfogenesi piuttosto che un'altra, con la possibilità di avere diversi metodi di propagazione clonale su larga scala di tale specie, utili anche ai fini vivaistici per la produzione di materiale di propagazione virus-esente. Alcuni dei lavori più interessanti, in cui si descrivono particolari protocolli, sono:

- Sviluppo di germogli avventizi per organogenesi da singoli frammenti di un germoglio apicale (Barlass & Skene, 1978). Dall'apice, prelevato quando dispone di 2-3

foglioline primordiali, si ottengono dei frammenti messi in coltura su mezzo liquido MS arricchito di citochinine (es. 6-benziladenina BA). Da ogni apice si ottengono circa 20 ammassi cellulari. Dopo un mese, gli ammassi cellulari differenziano strutture simili a foglioline, che vengono trasferite su substrato MS solido. Su questo le simil-foglioline crescono in lunghezza e dopo un mese si sviluppano i germogli a partire dal rigonfiamento della venatura centrale. Tale area viene escissa e posta in subcoltura: per ogni 50 mm² risultano circa 25 germogli avventizi. È una tecnica molto semplice e rapida, capace di produrre circa 8000 plantule in 3-4 mesi da un solo germoglio apicale;

- Sviluppo di germogli avventizi per organogenesi da foglie (Stamp, et al., 1990). Si prelevano foglie apicali che hanno una lunghezza inferiore ai 15 mm e si mettono in coltura su substrato MS a concentrazioni variabili di BA in base alla cultivar. Dai tessuti meristematici presenti a livello del picciolo si sviluppano germogli, gemme e foglie avventizi. Occasionalmente queste strutture si sviluppano anche a partire dalle venature incise della lamina fogliare. Il processo di rigenerazione, fino ad arrivare all'ambientamento in serra, dura circa 24 settimane. Da sottolineare che la rigenerazione dalla base del picciolo e dalla lamina fogliare non comporta una fase intermedia di formazione di callo: si tratta quindi di un meccanismo di organogenesi diretta, dove le cellule coinvolte sono già morfologicamente predisposte;
- Sviluppo di germogli avventizi per organogenesi da ammassi meristematici ottenuti *in vitro* (Mezzetti, et al., 2002). Gli ammassi, o bulk meristematici, sono tessuti dotati di un'elevata capacità rigenerativa, ottenuti partendo da germogli avventizi. Attraverso il procedimento contrario, che consiste in una riduzione graduale del contenuto di citochine nel substrato, è possibile ottenere un'importante proliferazione di germogli avventizi;
- Sviluppo di embrioni somatici da embrioni zigotici (Scorza, et al., 1995). Gli embrioni zigotici sono posti in coltura su substrato *Emershad and Ramming* che stimola l'embriogenesi somatica da questo tipo di espianto. La proliferazione degli embrioni somatici viene favorita aggiungendo al substrato la citochinina BA in concentrazioni variabili in base al genotipo;
- Sviluppo di embrioni somatici da foglie e antere (Stamp & Meredith, 1988). Gli espianti di partenza sono foglie intere con una lunghezza variabile tra 1,5 e 5 mm, e antere con una colorazione variabile dal bianco traslucido al verde pallido, lunghe 0,5-1 mm, isolate da fiori non aperti. Questi sono posti in coltura, con varie combinazioni di regolatori di crescita (BA, 2,4-D e NOA), individuate in base alla cultivar, che stimolano la formazione del callo pre-embriogenico. Questo, nel caso delle foglie, appare dopo circa 30-40 giorni direttamente dal tessuto fogliare, e non dal callo parenchimatico, a livello della zona prossimale alla venatura centrale. Dal callo pre-embriogenico si formano poi gli embrioni somatici. Inoltre, dalle strutture embrionali globulari si ha un continuo sviluppo di ulteriori strutture embrionali globulari. Di conseguenza il risultato sarà l'avere allo stesso tempo diverse strutture embrionali in vari stadi di sviluppo (globulare, a cuore, a torpedo, cotiledonare). Nel caso delle antere, dopo 40 giorni di incubazione totale al buio si sviluppa tessuto embriogenico, composto da callo pre-embriogenico disorganizzato, strutture embrionali globulari ed embrioni somatici. Anche in questo caso l'embriogenesi ha origine direttamente dai tessuti delle antere e non dal callo parenchimatico. Si è visto che l'incubazione al buio delle antere aumenta lo sviluppo di cellule embriodiche (Rajasekaran & Mullins, 1979);

- Sviluppo di embrioni somatici da ovario (Motoike, et al., 2001). Circa 10-14 giorni prima dell'antesi fiorale, si estraggono gli ovari e si mettono in coltura su substrato arricchito con i regolatori di crescita 2,4-D e BA. Sono poi mantenuti al buio a 21°C per circa 50 giorni, fino allo sviluppo del callo pre-embriogenico. La massa pre-embriionale ottenuta passa ad una successiva coltura per la proliferazione, in cui si usano come sostanze ormonali IASP, 2,4-D e TDZ. Successivamente si passa ad un'ulteriore subcultura, su substrato arricchito con IASP, NOA, TDZ e ABA che assicura la proliferazione e la maturazione degli embrioni somatici;
- Sviluppo di embrioni somatici da stami e pistilli (Dhekney, et al., 2016). Si prelevano stami e pistilli allo stadio di sviluppo adeguato al processo embriogenico, e si mettono in piastre Petri contenenti lo specifico substrato, disponendo gli stami provenienti da 5 infiorescenze diverse raggruppati al centro e i corrispondenti pistilli intorno. Le piastre vengono mantenute al buio ad una temperatura di 26 °C per 5 settimane, successivamente si passano alla luce mantenendo un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. Il primo risultato è la formazione del callo pre-embriogenico, trasferito quindi su un altro substrato per lo sviluppo e la proliferazione. Successivamente si passa in subcoltura liquida di proliferazione, posta poi in filtrazione dopo 2 settimane, da cui si hanno i primi embrioni somatici. Tale operazione viene effettuata più volte in media ogni 2-3 settimane. Gli embrioni somatici ottenuti si trasferiscono infine sul terreno deputato allo sviluppo e alla proliferazione degli embrioni, rinnovandolo ad intervalli di 4-6 settimane;
- Sviluppo di embrioni somatici da segmenti nodali (Maillot, et al., 2006). Si utilizzano i segmenti nodali, formati da un germoglio ascellare con un breve stelo e picciolo, messi in coltura su substrati MS la cui formulazione presenta la metà dei macroelementi normalmente aggiunti, utilizzando come sostanze ormonali il 2,4-D e il BA. Dopo un mese di incubazione al buio, si procede con un'ulteriore subcultura su un substrato arricchito con le auxine IAA e NOA e la citochinina BA, passando al fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. Su questo terreno si sviluppano gli embrioni somatici.

Nel caso dell'embriogenesi somatica, in alcune occasioni si è rilevato che questo tipo di rigenerazione può influire sul fenotipo della pianta. Ad esempio, si sono rilevate delle variazioni fenotipiche nelle piante della cv. Thompson Seedless rigenerate da antere per embriogenesi somatica, sottoposte a trasformazione genetica (Franks, et al., 1998): le foglie mostravano una forma lobata e presentavano venature fogliari rosse, che non sono caratteristiche del fenotipo della cultivar. Si è associato il manifestarsi di questi caratteri al fenomeno di regressione allo stadio giovanile.

1.2.3 *New Breeding Techniques (NBTs)*

Nuove tecniche di miglioramento genetico sono state sviluppate grazie alle maggiori informazioni sui genomi e alle nuove biotecnologie disponibili, rappresentando un'ulteriore opportunità per lo sviluppo di nuovi genotipi che soddisfino le esigenze richieste dal mondo dei produttori e dei consumatori, in tempi più veloci e superando le difficoltà legate al

miglioramento genetico delle specie arboree quali l'alto grado di eterozigosi, la lunghezza della fase giovanile e l'autoincompatibilità. Alcune di queste nuove tecniche permettono di ottenere nuovi genotipi esenti da transgeni, il che fa auspicare ad una maggiore accettabilità da parte del consumatore considerando anche che queste tecniche si fanno portabandiera nel garantire prodotti caratterizzati da una certa sicurezza alimentare e da una certa qualità nutrizionale. Di seguito si riportano le nuove tecniche disponibili (Limera, et al., 2017), di cui alcune applicate anche su vite.

Co-trasformazione genetica: è una tecnica che permette di ottenere genotipi trasformati in cui non risultano inseriti nel loro genoma i geni marcatori selezionabili, spesso sotto accusa nell'accettabilità degli OGM, combinando una selezione positiva a una negativa (Dutt, et al., 2008). La tecnica, applicata su Thompson Seedless, consiste nell'utilizzare due ceppi di agrobatteri per infettare gli espianti vegetali: in un ceppo è presente il plasmide binario che contiene solo il gene d'interesse (in questo caso l'*eGFP*), mentre nell'altro il plasmide contiene il gene reporter per la resistenza a kanamicina per la selezione positiva (*nptII*) e il gene *codA* che codifica per la citosina deaminasi per la selezione negativa, uniti insieme da un promotore bidirezionale. Le cellule vegetali, durante il processo infettivo, integrano il costrutto di uno o di entrambi i plasmidi. Nella fase di selezione positiva le cellule modificate che contengono il gene d'interesse crescono insieme alle cellule contenenti il costrutto con i geni marcatori. Quando si passa alla selezione negativa, basata sull'azione della citosina deaminasi, le cellule che hanno integrato nel genoma i geni marcatori smettono di crescere e sopravvivono soltanto quelle che hanno il costrutto d'interesse.

Cisgenesi e Intragenesi: la cisgenesi è una tecnica di modificazione genetica delle piante in cui si usano geni che provengono solo dalla specie stessa o da una specie con cui può essere convenzionalmente incrociata. Il gene utilizzato è una variante naturale di un gene già presente nel genoma della specie, e viene trasferito con tutta la sequenza originale che porta i suoi introni, il suo promotore e il suo terminatore. Nell'intragenesi il gene introdotto proviene dalla stessa specie o da una specie sessualmente compatibile. In questo caso però il gene introdotto è un gene ibrido, detto intragene, perché nel costrutto possono essere inseriti un promotore e un terminatore diversi rispetto a quelli naturali. Il risultato sarà in entrambi i casi quello di una pianta trasformata che non contiene DNA esogeno. Ad esempio, nel caso della trasformazione mediata da agrobatterio, le sequenze bordo che delineano il costrutto sono di origine vegetale, estratte sempre da una specie sessualmente compatibile. Un lavoro che può essere interessante per applicare le tecniche di cisgenesi e intragenesi su vite è quello in cui è stato utilizzato come

gene reporter il fattore di trascrizione *VvMybA1* estratto dal genoma della stessa vite e coinvolto nella biosintesi di antocianine (Kandel, et al., 2016).

Genome editing: è una tecnica di ingegneria genetica che si basa sull'uso di nucleasi ingegnerizzate per manipolare le informazioni genetiche in modo accurato. È possibile modificare o sostituire con grande precisione parti del genoma, attraverso il cosiddetto “taglia e cuci” del DNA. Le “forbici molecolari” che si utilizzano per apportare le modifiche al DNA sono gli enzimi nucleasi, di cui ne esistono diverse tipologie: la nucleasi Zinc-finger (ZFN), le nucleasi TALE (TALENs) e la nucleasi CRISPR-Associated Protein Cas9. Le ZFN e le TALENs sono utilizzate per apportare cambiamenti genetici diretti: permettono di generare rotture del doppio filamento (Double-Strand-Breaks - DSBs) in quasi tutte le posizioni genomiche. Queste interruzioni sono poi soggette ai due meccanismi di riparazione, il Non-Homologous End-Joining (NHEJ) per cui vengono saldate estremità non omologhe, e la riparazione per ricombinazione omologa in cui si usa una sequenza identica come stampo per la riparazione della rottura. La nucleasi Cas9 fa parte del sistema CRISPR/Cas9, processo che deriva da un meccanismo naturale presente nel sistema immunitario dei batteri utilizzato come strumento di difesa dagli acidi nucleici virali che vengono silenziati utilizzando l'endonucleasi Cas9 e gli RNA CRISPR (crRNAs). CRISPR sta per *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, traducibile come “brevi ripetizioni palindrome raggruppate e separate a intervalli regolari”. La Cas9 può essere programmata per effettuare specifiche modifiche al genoma di una cellula, qualsiasi sia la sua natura, come ad esempio eliminare una sequenza di DNA dannosa, correggere una mutazione o sostituire una sequenza genica con un'altra. Per guidare la Cas9 verso il punto esatto su cui effettuare il “taglio” si utilizza la molecola di RNA guida (sgRNA), associata alla Cas9, anch'essa ingegnerizzata, per permettere l'ancoraggio alla sequenza di DNA bersaglio su cui si vuole intervenire. La proteina Cas9 riesce ad introdurre in una posizione specifica mutazioni casuali, mentre la si accompagna con una sequenza di DNA esogeno nel caso in cui l'obiettivo sia l'inserimento di una mutazione mirata. L'interruzione operata dall'endonucleasi viene riparata attraverso la riparazione per ricombinazione omologa, utilizzando come stampo la sequenza di DNA esogeno. Applicazioni della CRISPR-Cas9 sono state realizzate anche su vite, ottenendo ad esempio piante di Neo Muscat con foglie albine attraverso una mutazione mirata sul gene *VvPDS* (Nakajima, et al., 2017) e piante di Chardonnay resistenti all'oidio causando una mutazione sul gene locus *MLO-7* (Malnoy, et al., 2016).

Mutagenesi diretta da oligonucleotidi: è una tecnica che permette di introdurre una nuova mutazione nel genoma sostituendo una o poche coppie di basi, utilizzando oligonucleotidi di

DNA sintetizzati chimicamente o frammenti di DNA-RNA chimerici di 20-100 nucleotidi, che sono complementari alla sequenza di DNA stampo su cui intervenire tranne per la posizione da mutagenizzare. Gli oligonucleotidi vengono introdotti nelle cellule vegetali attraverso il metodo biolistico o per elettroporazione di protoplasti.

Altre tecniche interessanti e utili al miglioramento genetico delle specie arboree sono l'RNA interference e il trans-grafting, spiegate nel paragrafo successivo.

1.2.4 Silenziamento genico (RNAi)

Il silenziamento genico, in inglese RNA interference (RNAi), è la tecnica applicata nella formulazione dei costrutti genici utilizzati in questo lavoro di tesi. Si basa sulla possibilità di disattivare l'espressione di un gene prima della sua traduzione nella proteina corrispondente. L'RNAi è possibile grazie a una serie di meccanismi molecolari che hanno la funzione principale di inibire o sopprimere l'espressione di un gene, e tali meccanismi sono attivati da particolari molecole di RNA a doppio filamento (dsRNAs). Questi non codificano per alcuna proteina, ma la loro azione è quella di esercitare una sorta di controllo su quegli RNA che invece codificano per proteine, cioè l'RNA messaggero (mRNA). Di questo gruppo ne fanno parte:

- i microRNA (miRNAs), caratterizzati da una lunghezza di 22-24 nucleotidi. Sono codificati da loci endogeni di pianta, trascritti nel nucleo, con funzione regolatrice di vari processi di sviluppo nell'ospite. Questi sono coinvolti nel silenziamento genico poiché si legano all'RNA messaggero (mRNA) e ne impediscono la traduzione in proteine;
- gli short interfering RNA (siRNAs), caratterizzati da una lunghezza di 21-24 nucleotidi. Sono prodotti a partire da molecole esogene di dsRNAs più lunghe, derivanti da virus, transgeni e trasposoni. Sono responsabili del silenziamento genico, insieme ai miRNA, legandosi a filamenti target di mRNA con una sequenza ad essi complementare ed omologa, inducendone la successiva degradazione operata dagli enzimi idrolitici endonucleasi;
- gli small nucleolar RNA (snoRNAs). Questi regolano il taglio dei lunghi pre-rRNA (RNA trascrizionale) nelle loro subunità funzionali, e partecipano anche alle modificazioni/maturazione che le subunità di rRNA subiscono;
- gli small nuclear RNA (snRNAs). Sono RNA che entrano nella costituzione degli spliceosomi, le strutture nucleari coinvolte nella maturazione degli mRNA e che operano la rimozione delle regioni non codificanti dei geni (introni) e la saldatura di quelle codificanti (esoni) in modo da permettere a queste di essere tradotti in proteine.

L'RNA interference nelle piante, che si presume sia il risultato dell'evoluzione di un meccanismo di difesa contro i virus (Barcaccia & Falcinelli, 2008), è un potente mezzo di silenziamento genico sperimentale, utilizzato dai ricercatori attraverso l'introduzione di molecole di RNA a doppio filamento (dsRNAs) che hanno come target la sequenza

complementare ed omologa del gene che si vuole silenziare. Il silenziamento genico è ottenuto ad opera dei miRNAs e dei siRNAs (Kamthan, et al., 2015). Queste molecole differiscono nel tipo di struttura precursore. I miRNAs derivano da molecole precursori di RNA a doppio filamento (pri-miRNAs e pre-miRNAs), con struttura a forcina (hpRNA) per la forma che assumono a causa della presenza di un anello a cui corrisponde la regione non codificante dell'introne. I siRNAs derivano dai cosiddetti double-stranded RNA (dsRNAs), i lunghi RNA a doppio filamento. Sia gli hpRNAs che i dsRNAs subiscono una serie di tagli ad opera della ribonucleasi Dicer, la cui azione porta alla formazione di molecole di RNA a doppio filamento più corte (lunghe 21-24 nucleotidi), cioè i miRNAs e i siRNAs. Le molecole coinvolte nella fase di taglio dell'RNA a doppio filamento sono anche gli enzimi Dicer-like (DCLs), e altre molecole sono coinvolte nel processo di silenziamento genico, le proteine argonate (AGO) che fanno parte del complesso RISC, e le RNA polimerasi RNA-dipendenti (RDRs). I miRNAs e i siRNAs si legano all'*RNA-induced silencing complex* (complesso RISC), che recluta uno dei due filamenti dei siRNA o miRNA, utilizzandolo come filamento guida per appaiarsi a tutti i trascritti target aventi una sequenza ad esso complementare ed omologa. A questo punto si differenzia il meccanismo dato che i miRNAs e i siRNAs sono caratterizzati da diverse funzioni determinate in base alle diverse modalità di appaiamento che li caratterizzano. I siRNAs si attaccano all'mRNA bersaglio attraverso un appaiamento perfetto, che viene riconosciuto e distrutto per degradazione dalle endonucleasi. Nel caso dei miRNAs invece l'appaiamento è imperfetto o incompleto, poiché molti miRNAs non sono pienamente complementari con la sequenza bersaglio e non riescono a distinguere piccole variazioni nel sito di riconoscimento. L'appaiamento imperfetto per le piccole differenze tra i due filamenti porta alla formazione di una protuberanza, impedendo all'mRNA bersaglio di essere tradotto in proteina, e allo stesso tempo lo protegge così da non essere distrutto dalle endonucleasi. Nel caso delle piante, le vie di silenziamento genico utilizzate sono il silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS), il silenziamento genico trascrizionale e il silenziamento genico ad opera dei microRNA silencing (Limera, et al., 2017). Le RNA polimerasi RNA-dipendenti amplificano il segnale di silenziamento attraverso la sintesi di siRNAs secondari (Meister & Tuschl, 2004), permettendo un silenziamento sistemico nella pianta. Le molecole in grado di attivare il meccanismo di silenziamento sistemico hanno la capacità di spostarsi da una cellula all'altra e sistematicamente anche su lunghe distanze all'interno della pianta attraverso il sistema vascolare. Questo meccanismo è utilizzato nella tecnica del trans-grafting: le molecole di small RNA si spostano dal portinnesto geneticamente modificato al nesto non transgenico, solitamente attraverso il sistema floematico, e assicurano un

meccanismo di difesa basato sul silenziamento genico degli acidi nucleici invasivi prodotti ad esempio da virus, oppure inducono modificazioni epigenetiche. Il movimento tra cellule vicine avviene mediante trasferimento apoplastico o simplastico ad opera dei plasmodesmi, mentre il movimento sistemico avviene attraverso il sistema vascolare (Limera, et al., 2017). Il *transgrafting* è sicuramente una tecnica che permette di ridurre il flusso genico indesiderato, dato che si evita la diffusione di polline e di semi transgenici e si possono ottenere frutti non transgenici (Lemgo, et al., 2013). Infatti, i composti molecolari codificati dai geni esogeni integrati nel portinnesto raggiungerebbero i tessuti del nesto attraverso il sistema vascolare soltanto nel momento in cui si presenta il target su cui devono agire. È quindi solo un trasferimento di molecole e non di geni, per cui ugualmente i tessuti del nesto manterrebbero la caratteristica di non essere transgenici. Tale tecnologia è stata applicata su vite, attraverso l'uso come portinnesto di un genotipo di Thompson Seedless geneticamente modificato per l'introduzione nel genoma del gene *Shiva-1* che codifica per il peptide litico Shiva-1, utilizzato su genotipi di Thompson Seedless e Chardonnay non transgenici (Dutt, et al., 2005). Si è visto che il peptide Shiva-1, che inibisce l'azione infettiva di *Xylella fastidiosa*, si sposta attraverso i vasi xilematici dal portinnesto transgenico al nesto non transgenico.

Un aspetto che rende interessante l'RNA interference è quello che le molecole coinvolte in questo meccanismo possono agire anche nei confronti di molecole di RNA messaggero prodotte da specie di regni differenti (Limera, et al., 2017). Su questa possibilità è basato il lavoro di questa tesi, volto all'ottenimento di genotipi resistenti a *Plasmopara viticola* inserendo nel genoma di vite uno dei due costrutti genici a forcina sviluppati, il costrutto 441 Pv-DCL441 hpRNA e il costrutto chimera Pv-DCL441+DCL331 hpRNA, che codificano per due diversi costrutti a forcina che hanno come geni target le sequenze di *P. viticola* codificanti per una (441) o entrambe (chimera) le *dicer-like proteins* (DCLs). I due costrutti genici esprimono sequenze isolate da un ceppo locale di *P. viticola*, e codificano per un costrutto a forcina (doppio filamento di RNA più loop non codificante) che viene processato dalla *dicer* della vite in lunghi *double-stranded RNA* (dsRNAs). Questi vengono nuovamente processati e tagliati dalla *dicer*, ottenendo i siRNAs che, legandosi al complesso RISC, assumono la struttura di RNA a singolo filamento e poi si dirigono sull'RNA messaggero risultato dalla trascrizione dei geni codificanti le *dicer-like target* (DCL441 e DCL331) in peronospora. Queste molecole di mRNA vengono quindi degradate, bloccando la loro traduzione in DCLs e di conseguenza bloccando la possibilità della peronospora di produrre i suoi small RNA che di solito utilizza per silenziare le difese immunitarie della pianta. I costrutti, elaborati da una collaborazione tra il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di

Bologna e il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Sezione Sistemi Arborei, dell'Università Politecnica delle Marche, sono stati realizzati a seguito della pubblicazione di un lavoro svolto presso la Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige in collaborazione con l'Università di Padova, che ha dimostrato che anche *P. viticola*, così come avviene in altri oomiceti, produce piccole molecole di RNA a doppio filamento (sRNAs) come sistema di contrapposizione al meccanismo di difesa della vite che è a sua volta caratterizzato dalla produzione di sRNAs rivolti contro geni di virulenza del patogeno (Brilli, et al., 2018). Il fungo patogeno utilizza gli small RNA per migliorare la propria capacità infettiva, mentre la pianta utilizza il meccanismo di silenziamento per inattivare le molecole infettive prodotte dal patogeno. Attraverso l'utilizzo delle tecnologie omiche è stato possibile caratterizzare il patosistema di un ceppo isolato in Nord Italia di *P. viticola*, il PvitFEM01, di cui è stato sequenziato il genoma (Brilli, et al., 2018). Lo studio rivela un meccanismo bidirezionale che si sviluppa tra il patogeno e l'ospite in prossimità del sito d'infezione basato sugli small RNA, in cui *P. viticola* utilizza queste molecole per invalidare il sistema immunitario dell'ospite, e contemporaneamente la vite utilizza esattamente lo stesso processo per silenziare i geni che sono coinvolti nella patogenicità e controllare l'infezione. Partendo da questa scoperta, i ricercatori dell'Università di Bologna hanno deciso di validare delle sequenze RNAi contro le DCLs di *P. viticola* applicando il sistema HIGS (*host-induced gene silencing*) per cui una pianta modificata che esprime un costrutto genico codificante per un RNA a doppio filamento, in questo caso il costrutto a forcina, è capace di silenziare i geni bersaglio del patogeno e di conseguenza la pianta acquisisce una resistenza rispetto a questo. Si ottiene ugualmente una pianta OGM, anche se diversa dalle PGM tradizionali dato che non esprime proteine/enzimi ma solo molecole di RNA.

Un'ulteriore applicazione del meccanismo di RNA interference è quella del sistema SIGS (*spray-induced gene silencing*), che consiste nell'applicazione esogena su pianta di soluzioni composte da long o small RNA a doppio filamento che possono essere stabilizzate con nanomateriali. Queste sono capaci di penetrare nei tessuti e di sviluppare un meccanismo di silenziamento genico contro i geni di virulenza di patogeni o di replicazione dei parassiti, bloccando di conseguenza l'infezione. È quindi possibile sviluppare formulati efficaci su diversi patogeni e parassiti caratterizzati da un target altamente specifico, dato che agiscono solo su uno o più geni specifici del target, per cui si ridurrebbero i rischi ambientali e la possibilità di sviluppare resistenze. Il sistema SIGS non è considerato OGM, e rappresenta

un'interessante opportunità nello sviluppo di molecole ad azione pesticida caratterizzate da un'elevata efficienza e da un basso impatto ambientale.

Un meccanismo che potrebbe preoccupare nell'uso dell'RNAi è quello dei possibili effetti sugli organismi off-target: nonostante gli sRNAs siano precisi e agiscano solo sulle sequenze bersaglio, in alcuni studi si è visto che questi potrebbero silenziare anche RNA messaggeri che non sono il target principale. La probabilità che si manifesti l'off-targeting aumenta nel caso della sintesi di siRNAs secondari ad opera delle RDRs, portando al silenziamento di geni off-target. L'off-targeting potrebbe essere preoccupante nel caso in cui siano presenti nel genoma della pianta geni omologhi a quelli codificanti per gli mRNA bersaglio del patogeno. Comunque non c'è ancora stata alcuna segnalazione riguardo al fenomeno dell'off-targeting durante l'applicazione dei sistemi HIGS e SIGS sulle piante (Lemgo, et al., 2013).

1.3 Peronospora della vite (*Plasmopara viticola*)

La peronospora della vite è la più grave malattia della vite a cui si devono importanti perdite economiche che in casi estremi possono coinvolgere l'intera produzione. L'agente patogeno che determina tale malattia è il fungo *Plasmopara viticola*.

P. viticola fa parte dell'ordine delle *Peronosporales*, tra le quali si indentificano un insieme di malattie che colpiscono i tessuti fotosintetizzanti, causate da specie molto simili appartenenti al nuovo regno degli *Straminipila* o *Chromista* e appartenenti alla suddivisione *Peronosporomycotina*, classe *Peronosporomycetidae* (Belli, 2011).

Il patogeno è originario dell'America settentrionale ed è stato accidentalmente introdotto in Europa alla fine del 1800 (1878 prima segnalazione in Francia) con le viti importate per essere usate come portinnesti resistenti alla fillossera: *V. vinifera* si mostrò estremamente suscettibile alla peronospora e la diffusione sul territorio europeo fu molto veloce, avendo un impatto maggiore soprattutto nelle zone ad alta piovosità primaverile estiva. Si tratta di un parassita obbligato che forma all'interno dell'ospite un micelio intercellulare, asettato, localizzato nelle foglie in particolare a livello del tessuto lacunoso (Bottura, 2011). Gli austori, che si sviluppano dal micelio, invadono le cellule ospiti e sono le strutture utili a formare il rapporto biotrofico con la vite per acquisire le sostanze nutritive necessarie allo sviluppo. La riproduzione asessuata avviene tramite la formazione di sporangi che si differenziano all'estremità di rami sporangiofori, separati da un setto di callosio. Questi rami emergono dagli stomi e producono rami laterali ad angolo retto rispetto all'asse principale, presentano tre corte appendici denominati sterigmi che portano all'estremità gli sporangi piriformi. Gli sporangi germinando liberano da 3 a 17 zoospore, prive di parete e dotate di due flagelli di diversa

lunghezza e struttura, uno a forma di frusta e l'altro a forma di piuma, che permettono lo spostamento in acqua. Le zoospore si muovono rispondendo a una serie di segnali chemiotattici prodotti a livello delle aperture stomatiche. Terminata la fase mobile, le zoospore si arrestano in prossimità degli stomi e perdono i flagelli. Successivamente, nella fase di incistamento, si forma la parete cellulare e poi avverrà la germinazione, con sviluppo del tubo germinativo che penetra per via stomatica. La riproduzione sessuata avviene con lo sviluppo dell'anteridio, organo sessuale maschile, sottile e allungato, e dell'oogonio, il femminile, di forma globosa. Si forma un tubetto di fertilizzazione che mette in contatto oogonio e anteridio e che porta alla differenziazione dell'oospora, la forma svernante di *P. viticola*. L'oospora ha bisogno di una serie di modifiche strutturali per essere capace di germinare, quali la fusione dei due nuclei di diversa provenienza, l'ispessimento della parete e la formazione dell'ooplasto, il vacuolo centrale che contiene sostanze di riserva. Tale periodo di maturazione finisce verso fine novembre-inizio dicembre. La germinazione dell'oospora forma il macrosporangio in cui si differenziano le zoospore. La germinabilità delle oospore tende gradualmente ad aumentare e raggiunge il valore massimo tra fine gennaio e fine aprile. Le oospore svernanti nei residui di foglie nel terreno germinano quando si presentano condizioni climatiche favorevoli, cioè circa 10 mm di pioggia nel giro di 24-48 ore e temperatura di almeno 10°C, e quando i tralci hanno una lunghezza di almeno 10 cm, e formano il macrosporangio che, disperso dalla pioggia, germina nel velo d'acqua presente sulla superficie degli organi ricettivi della vite su cui si liberano le zoospore che causano l'infezione primaria. Trascorso un periodo d'incubazione, variabile in funzione di temperatura e umidità ambientale, compare una macchia clorotico-giallastra tipicamente traslucida detta "macchia d'olio" sulla pagina superiore della foglia che indica la presenza del patogeno. Dopo la comparsa della macchia, il patogeno emette i propri organi di propagazione nella fase detta di evasione, al verificarsi di almeno 4 ore di buio, temperature non inferiori ai 13°C e umidità relativa al 98%. Sulla pagina inferiore della foglia si forma un'efflorescenza muffosa biancastra, formata da sporangi e sporangiofori. La macchia d'olio di solito necrotizza e sottrae superficie fotosintetizzante alla pianta. Nel caso di gravi attacchi si manifesta defogliazione della pianta. Sulle foglie vecchie la peronospora assume la forma a mosaico, con macchie giallastre piccole a contorni poligonali confinate tra tessuti lignificati delle nervature. Sui giovani tralci si possono verificare lievi sintomi di clorosi, raramente seguita dalla comparsa di sporulazione. Si possono verificare deformazioni del tralcio che assume una forma ad esse o ad uncino. Le cellule invase necrotizzano e sviluppano una colorazione bruno-nerastra. Anche sulle giovani infiorescenze i sintomi iniziali sono lievi, per cui si nota un leggero

viraggio di colore. Invece la sporulazione su fiori e rachide è abbastanza evidente e determina la necrosi dell'intera infiorescenza e in alcuni casi l'incurvamento ad esse del grappolo. Le foglie possono essere infettate dalla raggiunta recettività alla filloptosi, mentre i grappoli rimangono recettivi solo fino a quando gli stomi degenerano, cioè quando inizia l'ingrossamento dell'acino. La degenerazione degli stomi impedisce che fuoriescano i rami sporangiofori dalle zone infette, con la comparsa della cosiddetta peronospora larvata, che consiste in una colonizzazione indiretta degli acini con totale assenza delle fruttificazioni fungine.

In presenza di sporulazione e di ulteriori piogge si sviluppano le infezioni secondarie, responsabili dei maggiori danni alla produzione. *P. viticola* è un patogeno policiclico, quindi in realtà si possono sviluppare più cicli di infezione durante un'unica stagione vegetativa.

1.3.1 Strategie di difesa

È necessario per il viticoltore sviluppare una serie di strategie che possano aiutarlo nel controllo del patogeno in modo efficace, dato che tutti i vitigni di *V. vinifera* sono suscettibili alla peronospora. Purtroppo il seguire semplicemente determinate pratiche agronomiche non basta, dato che anche da poche infezioni primarie si possono sviluppare elevati danni. La corretta gestione del vigneto orientata al raggiungimento dell'equilibrio vegeto produttivo, evitando forzature ed eccessivo vigore, risulta importante per il controllo della malattia (Bottura, 2011). Si può puntare sul fornire un adeguato arieggiamento della chioma attraverso la scelta di certe forme di allevamento e portinnesti non vigorosi e non eccedendo con le concimazioni azotate. Si devono evitare l'impianto in zone caratterizzate da frequenti ristagni idrici e non usare l'irrigazione sovrachioma che può essere mezzo di diffusione degli sporangi. È comunque necessario utilizzare prodotti fitosanitari ad attività antiperonosporica. Tradizionalmente si utilizza il rame, che rientra nella formulazione della poltiglia bordolese, degli ossicloruri e degli idrossidi. Si utilizza solitamente nella seconda parte della stagione vegetativa della vite, dato che può risultare fitotossico per i tessuti giovani. A causa dell'impatto ambientale che può avere un uso eccessivo di rame, ci sono dei limiti da rispettare pari a un massimo di 30 kg/ha nel quinquennio. Quindi è stato necessario sviluppare dei prodotti a basso dosaggio di rame che consentono un miglior rilascio dello ione e una maggiore efficacia.

La difesa da *P. viticola* consiste nell'esecuzione di trattamenti preventivi mirati, con la scelta adeguata del miglior prodotto che si adatta anche alla fase fenologica e che può essere strategico rispetto a determinati eventi infettanti quali consistenti piogge e prolungate bagnature. Infatti, uno dei principi che il viticoltore deve seguire è quello di tenersi

continuamente aggiornato rispetto alle previsioni meteo per effettuare in modo razionale i trattamenti corretti al momento giusto. Secondo la fase fenologica in cui vengono eseguiti, i trattamenti antiperonosporici possono essere differenziati per modalità di esecuzione e per tipologia di principio attivo applicato. Di solito si fanno tre trattamenti cautelativi distinti in base allo stadio fenologico, cioè quello dei grappolini separati, quello della prefioritura e quello dell'allegagione. In particolare:

- la difesa inizia applicando prodotti di contatto a base di rame a basso dosaggio, effettuando il trattamento su viti asciutte e in presenza di temperature superiori a 10°C. Il trattamento si fa con una cadenza di circa 6-8 giorni e tiene conto del periodo di incubazione del patogeno. I prodotti vengono dilavati dopo circa 30-40 mm di pioggia, essendo fungicidi di superficie. Tra questi ci sono i ditiocarbammati, quali Mancozeb, Mentiram e Propineb, e le tioftalammidi Tolfet e Dithianon;
- la difesa dalla prefioritura a fine fioritura deve essere fatta in modo oculato dal viticoltore, essendo una fase molto delicata per le infezioni. Il periodo è caratterizzato da una forte crescita vegetativa e si usano di solito formulati sistemici, come il Fosetyl-Al che agisce stimolando le difese della pianta ed esercita un'azione diretta sul patogeno, e il Fluopicolide, utilizzati ogni 10-12 giorni circa;
- la difesa in allegagione e post allegagione, fase caratterizzata da un rapido accrescimento dell'acino che mostra ancora una certa sensibilità, si effettua usando prodotti a penetrazione rapida come il Dimetomorph, che ha anche azione anti sporulante, il Mandipropamid, e l'Iprovalicarb, o lo Zoxamide, fungicida di superficie unisito, usati ogni 8-10 giorni circa in miscela con rame.

Per ridurre i fenomeni di resistenza è importante alternare il più possibile i vari prodotti, utilizzandoli in blocchi di 2-3 trattamenti per massimizzarne l'efficacia. Ad eccezione del rame, è importante che ogni principio attivo venga utilizzato per un massimo di 3-4 interventi all'anno (Bottura, 2011).

1.3.2 Caratterizzazione genomica

Uno studio realizzato da Gobbin et al. nel 2006 intende analizzare la variabilità genetica delle diverse popolazioni di *P. viticola* presenti nel territorio europeo, ben 125 anni dopo l'introduzione del patogeno in Europa. Sono state valutate differenti popolazioni (in totale 32) prese da vigneti posizionati in località caratterizzate da differenti condizioni climatiche individuati nei principali paesi viticoltori europei, quali Germania, Francia, Italia, Svizzera e Grecia. I risultati ottenuti hanno dimostrato un elevato livello di diversità genetica tra le diverse popolazioni, ipotizzando che differenti genotipi di *P. viticola* siano stati introdotti in Europa a più riprese tramite materiale di propagazione fin dai primi anni dell'800. Le analisi effettuate mostrano che la maggior parte della diversità genetica presente nelle popolazioni europee di *P. viticola* si riscontra all'interno delle stesse popolazioni e che solo il 2% circa della variazione

genetica nella popolazione europea totale può essere dovuto da differenze tra le diverse popolazioni, comportando quindi che la maggior parte delle variazioni genetiche all'interno delle popolazioni è presente all'interno di piccole scale spaziali rappresentate dai vigneti (Gobbin, et al., 2006). Si conclude dicendo che le popolazioni di *P. viticola* sono spesso il risultato di accoppiamenti casuali e possono essere definite panmatiche. Una popolazione panmatica è quella in cui tutti gli individui sono potenziali parentali, non essendoci di conseguenza alcun tipo di restrizioni di accoppiamento, né genetiche né comportamentali. Considerando che il potenziale evolutivo di un patogeno è strettamente legato alla struttura genetica delle popolazioni, *P. viticola* avendo una moderata capacità di migrazione e un sistema di riproduzione misto ha un elevato potenziale evolutivo, elemento a suo vantaggio nella diffusione geografica in zone caratterizzate da condizioni climatiche differenti e nella capacità di sviluppare velocemente nuove resistenze.

Nel 2016 un gruppo di ricercatori francesi ha presentato la prima sequenza genomica di *P. viticola* (Dussert, et al., 2016). Il ceppo sequenziato è stato l'INRA-PV221, proveniente da un vigneto della regione di Bordeaux. Gli studi genomici risultano essere utili per conoscere i meccanismi molecolari che caratterizzano l'interazione tra la peronospora e la pianta ospite, al fine di individuare le molecole effettrici che scatenano l'infezione, e per capire come il patogeno si adatta tanto velocemente ai nuovi fungicidi e alle cultivar di vite resistenti. Differenti lavori hanno rilevato due principali classi di effettori secreti dagli oomiceti, quali gli RxLR e i CNR (*crinkling and necrosis-inducing*), entrambi di tipo citoplasmatico, il cui studio è un utile strumento per accelerare e migliorare l'identificazione, la caratterizzazione e la distribuzione dei geni di resistenza (Yin, et al., 2017). Un altro lavoro interessante è quello del gruppo cinese che ha sequenziato il ceppo JL-7-2, prelevato da un vigneto "Beta" (*V. riparia* x *V. labrusca*) del Nordest della Cina. Il sequenziamento ha dato la possibilità di approfondire i meccanismi patogenetici e il ruolo delle molecole effettrici, e sono state identificate, in aggiunta all'elevato numero di effettori codificati RxLR (circa 100) e CRN (90), un totale di 261 proteine codificate coinvolte nella determinazione della virulenza e della patogenicità di *P. viticola* (proteasi, idrolasi glicosidiche, elicatine, enzimi degradanti della parete cellulare, quali esteri pectinici, pectine liasi e fosfolipasi) (Yin, et al., 2017). Le analisi effettuate hanno dimostrato che la maggior parte di queste proteine secrete mostrano attività associate all'idrolisi e alla proteolisi: infatti, la degradazione della parete delle cellule vegetali è una delle fasi principali che determina il successo nella colonizzazione dell'ospite da parte del patogeno.

Capitolo 2

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del lavoro di tesi, inserito all'interno di un più ampio progetto di Dottorato di ricerca che si svolge presso il laboratorio sperimentale del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali dell'Università Politecnica delle Marche, Sezione Sistemi Arborei, in collaborazione con l'azienda Vitroplant di Cesena e con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna, è stato quello di sviluppare nuove strategie di difesa a *Plasmopara viticola* in vite mediante la creazione di portinnesti e varietà resistenti con la tecnologia del silenziamento genico (RNAi). A questo fine sono stati realizzati i seguenti esperimenti:

- prove di trasformazione genetica mediate da due differenti specie di agrobatterio, *Agrobacterium tumefaciens* ceppo EHA101 e un ceppo di tipo wild di *Agrobacterium rhizogenes*, per valutare quale delle due specie batteriche avesse una migliore efficienza di trasformazione sui genotipi di vite trattati, cioè Lambrusco Salamino, Kober 5BB e Thompson Seedless, utilizzando come materiale vegetale gli ammassi/bulk meristemati ottenuti per organogenesi;
- prove di trasformazione genetica su ammassi/bulk meristemati del genotipo modello Thompson Seedless, utilizzando il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens*, con l'obiettivo principale di ottenere linee putativamente transgeniche portanti il costrutto genico d'interesse;
- prove di rigenerazione per embriogenesi somatica da fiore intero sui genotipi delle cultivar Lambrusco Salamino e Ancellotta, col fine di valutare l'efficacia del protocollo di rigenerazione applicato e l'efficienza del fiore a sviluppare calli pre-embriogenici dai quali ottenere embrioni somatici, e successiva applicazione dello specifico protocollo di trasformazione genetica sugli embrioni somatici ottenuti.

In tutte le prove di trasformazione genetica realizzate, l'agrobatterio conteneva il plasmide pK7GWIWG2-7F2,1 portante uno dei due costrutti genici codificanti per due costrutti a forcina:

- il costrutto Pv-DCL441 hpRNA detto 441, che ha come geni target le sequenze di *P. viticola* codificante per la dicer-like DCL441;
- il costrutto Pv-DCL441+DCL331 hpRNA detto chimera, che ha come geni target le sequenze di *P. viticola* codificanti per le dicer-like DCL441 e DCL331.

Si ipotizza che le molecole di RNA messaggero (mRNA) prodotte da *P. viticola* per la traduzione delle DCLs vengano degradate e così venga annullato il processo di silenziamento

genico che solitamente *P. viticola* utilizza per silenziare le difese immunitarie della pianta. Il costrutto chimera è definito anche multi-target perché gli short-interfering RNA (siRNAs), che sono il risultato del processamento del costrutto a forcina ad opera della ribonucleasi Dicer, sono in grado di silenziare due sequenze diverse di mRNA di *P. viticola*. Entrambi i costrutti contengono anche il gene marcatore *nptII* codificante per la neomicina fosfotransferasi II e il gene reporter *eGFP* codificante per la green fluorescent protein, utili nella fase di selezione e rigenerazione dei tessuti trasformati. Infatti, la selezione delle linee putativamente transgeniche è stata effettuata utilizzando come agente selettivo l'antibiotico kanamicina e valutando l'espressione del gene reporter *eGFP* attraverso l'emissione di fluorescenza.

Le prove condotte hanno dato risultati differenti che permettono di affermare che l'efficienza di trasformazione e l'efficienza di rigenerazione dipendono fortemente dal tipo di agrobatterio utilizzato per la trasformazione, dalla qualità dei substrati di coltura utilizzati nella fase di selezione e rigenerazione, dal genotipo e dal tipo di espianto sottoposti al protocollo. Inoltre, per la cultivar Thompson seedless sono stati ottenuti dei germogli transgenici, alcuni contenenti il costrutto 441 e alcuni il costrutto chimera, su cui si potrà successivamente valutare e comparare l'efficacia nel dare resistenza a *P. viticola* in seguito all'integrazione nelle cellule trasformate del costrutto genico a forcina che attiva il meccanismo di silenziamento genico sulla peronospora.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

3.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale utilizzato in tesi per le prove di trasformazione appartiene al genere *Vitis* e consiste nei seguenti genotipi:

- le cultivar di *Vitis vinifera* subsp. *sativa* Lambrusco Salamino, Thompson Seedless e Ancellotta;
- il portinnesto Kober 5BB (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*).

Il materiale vegetale su cui sono state fatte le prove di trasformazione è stato ottenuto tramite le tecniche di organogenesi ed embriogenesi, che hanno portato alla formazione di calli meristemati ed embrioni somatici. Per le prove di organogenesi ed embriogenesi, il materiale vegetale utilizzato come espianto di partenza è stato fornito dall'azienda Vitroplant Italia S.r.l. di Cesena.

3.1.1 Genotipi di vite utilizzati nella sperimentazione

Si elencano di seguito le caratteristiche dei genotipi utilizzati nella sperimentazione, così come sono indicate nel Registro Nazionale delle varietà di Vite del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (Mipaaf, 2020).

LAMBRUSCO SALAMINO

Detta anche Lambrusco di S. Croce, dal nome della frazione di S. Croce (Carpi), in provincia di Modena, da cui si sarebbe diffusa. Il nome Lambrusco Salamino deriva invece dalla forma del grappolo cilindrica e serrata, tale da ricordare un piccolo salame. È attualmente diffuso nei territori dell'Emilia-Romagna e della Lombardia. Nelle zone di coltura si distinguono due tipi di Lambrusco Salamino: quello che ha foglia verde e quello che alla vendemmia presenta foglia rossa. Quello a foglia verde è più rustico e produttivo, però dà un prodotto qualitativamente inferiore. In qualche località si distingue pure un "Lambrusco Salamino a raspo verde" ed uno "a raspo rosso". Quest'ultimo è meno diffuso, essendo meno produttivo. Di seguito le caratteristiche ampelografiche:

- il germoglio è lungo 10-20 cm, porta un apice di media espansione, cotonoso, verde-biancastro, talvolta con sfumature rosa;
- il tralcio erbaceo ha sezione trasversale rotondeggiante, con superficie liscia, glabra, di colore verde e rosso vinoso da un lato;
- l'infiorescenza è piccola, lunga 8-10 cm, e compatta;
- il fiore è normale, autofertile;
- la foglia è di grandezza media, pentagonale-trilobata, con pagina superiore di colore verde intenso, opaca e bollosa, e pagina inferiore grigio verde. Le nervature sono poco appariscenti, verdi con la base rossa, i denti poco pronunciati, mucronati, con margini convessi da un lato. Il picciolo è corto, glabro e rosato;
- il grappolo a maturità industriale si presenta piuttosto piccolo, lungo 10-12 cm, cilindrico o cilindro-conico, talvolta un po' curvo, sottile e compatto. Il peduncolo è corto, erbaceo, rosato da un lato, sottile, e i pedicelli sono corti, sottili e verdi;
- l'acino è generalmente medio (la grandezza è molto incostante sullo stesso grappolo), e di forma sferoide, ha buccia pruinosa, blu-nera e un po' spessa, con polpa succosa, molle, e sapore un po' acidulo. Contiene circa 2-3 vinaccioli, piccoli e globosi;
- il tralcio legnoso è caratterizzato da notevole lunghezza e normale robustezza, di sezione rotonda e un po' sottile. Il colore è grigio brunastro-nocciola e le gemme sono un po' piccole;
- il tronco è di media robustezza.

È una varietà utilizzata esclusivamente per la vinificazione, matura generalmente verso la prima quindicina di ottobre. La produzione è abbondante e costante, presenta 1-2 infiorescenze per germoglio.

THOMPSON SEEDLESS

È una particolare selezione della Sultanina Bianca, diffusa in California, caratterizzata dall'assenza di semi. È originaria del territorio della Persia in Asia Minore, la cui coltivazione si è espansa nel Mediterraneo, nell'Africa settentrionale, in Europa, in America, in Sudafrica e in Australia. Attualmente è la varietà di uva da tavola più diffusa in California.

Di seguito le caratteristiche ampelografiche:

- il germoglio è lungo 10-20 cm, avente un apice mediamente espanso, di color giallastro chiaro;
- il tralcio erbaceo ha sezione trasversale ellittica, con superficie glabra, di colore verde con striature bronzate o rosso carminato;
- l'infiorescenza è grande, cilindro-piramidale;
- il fiore è ermafrodita;
- la foglia è di grandezza media, pentagonale, quasi intera o leggermente trilobata, con pagina superiore e inferiore glabre. Il picciolo è lungo, di media grossezza, glabro e di colore verde-rosato;
- il grappolo ha grandezza media, a volte raggiunge la lunghezza di 20 cm, conico e serrato, con peduncolo semi-legnoso;
- l'acino è piccolo, regolare e di forma ovoido-ellissoide, ha buccia poco pruinosa, sottile, resistente, di colore giallo-dorato chiaro, e polpa leggermente carnosa, di sapore dolce. Vinaccioli assenti (varietà apirena);

- il tralcio legnoso è lungo, robusto, elastico, poco ramificato, a sezione trasversale ellittica e superficie liscia. Il colore è nocciola chiaro con striature di colore rossastro e le gemme sono sporgenti e un po' appuntite;
- il tronco è di aspetto robusto.

È utilizzata per il consumo fresco ma soprattutto come uva passa, matura verso la metà di settembre. La produzione è abbondante, presenta 2-3 infiorescenze per germoglio. Risulta leggermente suscettibile all'attacco di oidio sul tralcio erbaceo.

ANCELOTTA

Varietà diffusa in Sicilia, Sardegna, Campania, Lazio, Toscana, Marche, Emilia-Romagna, Lombardia, Veneto e Friuli Venezia-Giulia, detta anche Lancellotta e Ancellotta di Massenzatico (Reggio-Emilia) dal nome della località dove si è particolarmente diffusa.

Di seguito le caratteristiche ampelografiche:

- il germoglio è lungo 10-20 cm, porta un apice un po' espanso, pubescente, biancastro con leggere sfumature rosso-violacee;
- il tralcio erbaceo ha sezione trasversale circolare, glabro, di colore verde con leggere sfumature marroni;
- l'infiorescenza è allungata, lunga 10-15 cm, cilindrico-piramidale;
- il fiore è normale, autofertile;
- la foglia è di grandezza media, pentalobata, con pagina superiore di colore verde chiaro opaco e pagina inferiore verde oliva, pubescente e con tomento a ragnatela sulle nervature poco appariscenti e verdi. Il picciolo è medio, sottile, rosato, con un po' di tomento;
- il grappolo a maturità industriale si presenta di grandezza media, lungo 15-20 cm, piramidale, spargolo. Il peduncolo è sottile ed erbaceo, e i pedicelli sono corti e verdi;
- l'acino è piccolo, di forma sferoide e regolare, ha buccia pruinosa, blu-nera, di medio spessore, con polpa sciolta, di sapore neutro. Contiene 2 vinaccioli, piccoli e con becco appuntito;
- il tralcio legnoso è caratterizzato da media lunghezza, un po' sottile e non ramificato, di sezione rotonda con superficie liscia e di colore mattone. Le gemme sono normali;
- il tronco non è molto robusto.

È una varietà utilizzata esclusivamente per la vinificazione, matura tra la fine di settembre e l'inizio di ottobre. La produzione è abbondante e costante, presenta 1-2 infiorescenze per germoglio. In certe annate risulta essere sensibile alla colatura.

KOBER 5BB

Il Kober 5BB è un portinnesto che è stato ottenuto dall'incrocio tra *V. berlandieri* e *V. riparia*. È stato selezionato a Nüssberg presso Vienna (Austria) all'inizio del '900 dall'Ispettore per la viticoltura Franz Kober dalla popolazione di biotipi che costituivano il "Teleki 5A". Il breeder ungherese Teleki, volendo ottenere un portinnesto adatto ai Paesi dell' Europa centrale e non potendo importare delle talee o delle barbatelle di vite (essendo proibito per evitare

l'introduzione del Black-rot), si fece inviare dalla Francia dei vinaccioli di *V. berlandieri* provenienti da libere fecondazioni. Dalle piantine nate da questi semi isolò vari gruppi di portinnesti, che distinse in base ai caratteri che presentavano. Divise le selezioni in 2 sezioni, A e B, in base all' assenza o presenza di tomento. Successivamente, aiutato dal figlio Andrea, diffuse i tipi 5A e 8B, considerati i migliori, che però non tardarono a dimostrarsi rappresentati da più biotipi anziché da un biotipo ciascuno. Questo fatto rese necessaria un'ulteriore selezione, fatta in Austria dal Kober, che isolò il Kober 5BB. Kober isolò poi in Germania ad Oppenheim anche il tipo S.O.4.

Di seguito le caratteristiche ampelografiche:

- il germoglio alla fioritura porta un apice mediamente espanso, lanuginoso, verde-rosato-bronzato;
- il tralcio erbaceo ha sezione trasversale poligonale con cortissime setole, di colore rosso-violaceo;
- il fiore è di tipo femminile;
- la foglia è molto grande, quasi intera, rotondeggiante, con pagina superiore di colore verde, glabra, e pagina inferiore verde chiaro, con leggero velluto. Il picciolo è corto o medio, vellutato;
- il tralcio legnoso è lungo, di media grossezza e sezione rotondeggiante o leggermente ellittica, con superficie liscia, glabra e di colore grigio-nocciola con strisce brune. Le gemme sono piccole e appuntite.

È un portinnesto molto vigoroso, resistente alla fillossera, alle malattie crittogamiche e ai nematodi galligeni del genere *Meloidogyne*. Radica facilmente ed imprime notevole vigore alla marza. Viene usato solitamente come portinnesto per le varietà da vino. Preferisce i terreni profondi, di buona fertilità, piuttosto freschi.

3.1.2 Organogenesi

La tecnica di organogenesi applicata in questa tesi è quella basata sull'ottenimento degli ammassi meristemati, detti anche bulk meristemati. I bulk sono tessuti con un'elevata capacità rigenerativa e sono ottenuti partendo da germogli avventizi (Sabbadini, et al., 2019). Questi sono sottoposti a quattro subcolture in vitro, durante la quale la concentrazione delle citochinine aggiunte ai substrati aumenta gradualmente ad ogni passaggio. Le citochinine hanno un ruolo fondamentale grazie all'azione stimolante di divisione e differenziamento cellulare. Un esempio pratico di protocollo di rigenerazione per organogenesi applicato alla cv. Thompson Seedless, in cui si utilizza la citochinina 6-benziladenina, è il seguente (Mezzetti, et al., 2002):

1. nella prima fase si elimina la gemma apicale (cimatura) dei germogli e si mantiene la parte basale per 30 giorni in subcoltura con un quantitativo di BA pari a 1 mg/L;

2. nella seconda fase si elimina nuovamente l'apice e si passa ad una seconda subcoltura con 2 mg/L di BA, che ha una durata di 30 giorni;
3. nella terza e quarta fase si elimina nuovamente l'apice rispettivamente dopo 60 e 90 giorni di subcoltura, in cui la concentrazione di BA è aumentata a 3 mg/L.

L'asportazione della gemma apicale e l'aumento della concentrazione di citochinine permettono di eliminare la dominanza apicale a favore della proliferazione dei germogli ascellari. Seguendo il protocollo si forma il bulk meristemato, che risulta essere formato da tessuto meristemato e callo organogenetico (costituito da cellule parenchimatice già differenziate), ed essere capace di differenziare e rigenerare nuovi germogli avventizi sulla superficie (Sabbadini, et al., 2015). La propagazione dei calli meristemati avviene tramite frammentazione: ogni frammento è capace di generare nuovo bulk meristemato dopo 3-4 settimane di coltura. I bulk si mantengono ad una temperatura di 24 °C, con 16 ore di luce e 8 ore di buio al giorno, in vasi di vetro contenenti dai 150 ai 200 ml di terreno MS arricchito con citochinine o auxine ad una determinata concentrazione dipendente dal tipo di genotipo, come indicato nella tabella 3.1.

Tabella 3.1 Specifiche concentrazioni di fitoregolatori per genotipo in substrato MS

	<i>6-benziladenina (BA)</i>	<i>Thidiazuron (TDZ)</i>	<i>Acido alfa- naftalenacetico (NAA)</i>
Lambrusco Salamino	2 mg/L	0,05 mg/L	-
Kober 5BB	2 mg/L	0,44 mg/L	-
Thompson seedless	3 mg/L	-	0,02 mg/L
Ancellotta	2 mg/L	0,05 mg/L	-

Ogni 3 settimane i bulk si trasferiscono su terreno fresco, asportando di volta in volta eventuali porzioni necrotiche, radici e germogli ascellari, al fine di mantenere un'intensa attività di proliferazione ed un'alta competenza rigenerativa. Le sezioni di bulk (1 cm², circa 2 mm di spessore) sono ottimali come materiale di partenza sia ai fini della propagazione che della trasformazione genetica.

3.1.3 *Embriogenesi somatica*

L'embriogenesi somatica è stata applicata soltanto sulle cv. Lambrusco Salamino e Ancellotta. Negli anni sono state sviluppate differenti tecniche di embriogenesi per ottenere embrioni somatici di vite, utilizzando come materiale di partenza embrioni zigotici (Scorza, et al., 1995), foglie e antere (Stamp & Meredith, 1988), ovari (Motoike, et al., 2001), stami e pistilli (Dhekney, et al., 2016), segmenti nodali (Maillot, et al., 2006). In questo lavoro di tesi

si è utilizzato come materiale di partenza il fiore intero per valutarne l'efficienza a sviluppare calli pre-embriogenici dai quali ottenere successivamente embrioni somatici.

Il protocollo applicato presenta le seguenti fasi:

1. i fiori sono prelevati da talee legnose dormienti, lunghe circa 20-30 cm, mantenute in 250 mL di acqua di rubinetto, in camera di crescita con 16 ore di fotoperiodo a 24 °C. Le infiorescenze si sviluppano dopo circa 3-5 settimane e si prelevano quando hanno un diametro di circa 1,5-2 mm;
2. si prepara una soluzione a base di candeggina al 25%, a cui si aggiunge un surfattante tra il Tween 20 o il Triton X-100;
3. si seziona l'infiorescenza in piccole ramificazioni, avendo cura di rimuovere il più possibile lo stelo per evitare eventuali contaminazioni;
4. si immergono per circa 1 minuto in una soluzione di alcol al 70%;
5. si sciacquano in acqua sterile microfiltrata;
6. si immergono nella soluzione preparata al punto 2 per circa 5 minuti, mantenendo un'agitazione continua;
7. si immergono in acqua distillata circa 3-5 volte fino a che non si elimina tutta la mucillagine;
8. si mantengono in piastre Petri con un filo di acqua sterile che mantenga le ramificazioni umide mentre si esportano i fiori;
9. i fiori prelevati si dispongono singolarmente su piastre Petri contenente il terreno d'induzione di callo pre-embriogenico MS1 arricchito con 1 mg/L della citochinina BA e 1 mg/L dell'auxina 2,4-D, che ha un pH pari a 6. Ogni piastra dovrebbe contenere circa 20 fiori;
10. si conservano le piastre al buio in camera di crescita per 4 settimane, e successivamente si passano alla luce. Si svilupperanno così dei calli pre-embriogenici;
11. una volta formati i calli pre-embriogenici (figura 3.1), questi si trasferiscono sul substrato di proliferazione X6, che non contiene fitoregolatori, rinnovando la subcoltura ogni 6-8 settimane, in base alla capacità di proliferazione del genotipo;
12. gli embrioni somatici si rigenerano direttamente dal callo pre-embriogenico, passando per gli stadi tipici di sviluppo di un embrione: globulare, a cuore, a torpedo e cotiledonare. Sul substrato X6, che deve essere rinnovato ogni 2 settimane, si ha una proliferazione continua di embrioni somatici dai tessuti superficiali del callo pre-embriogenico.

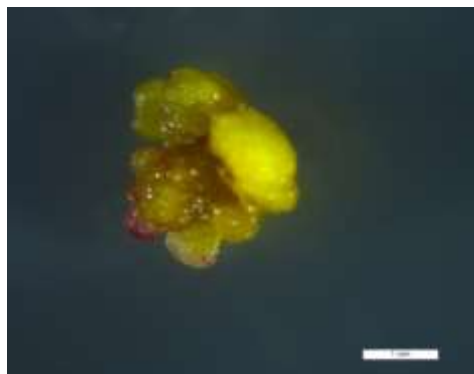


Figura 3.1 Callo pre-embriogenico ottenuto su substrato MS1 da fiore intero di *Lambrusco Salamino*

3.2 Locali e attrezzature di laboratorio

Le prove sono state effettuate presso il laboratorio didattico-sperimentale del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali dell'Università Politecnica delle Marche, Sezione Sistemi Arborei. Le attrezzature presenti sono: cappe a flusso laminare orizzontale, siti di lavaggio, banconi di lavoro, autoclave, purificatore dell'acqua Milli-Q system water, agitatori magnetici, pH-metro, fornelli sterilizzatori, vetreria, pipette e puntali, magenta, microbox in plastica, pinze, bisturi, anse, siringhe con filtro, piastre Petri, tubi Falcon ed Eppendorf, carta da filtro, parafilm, centrifuga, spettrofotometro, stereoscopio Leica MZ10F con filtro GFP e strumentazione fotomicrografica, tutti strumenti utili per le colture in vitro e i programmi di trasformazione genetica. È inoltre presente una camera di crescita caratterizzata da un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio e da una temperatura costante di 24 °C.

3.2.1 Sterilizzazione

Tutte le operazioni sono state svolte in condizioni asettiche, in modo tale da preservare il materiale vegetale da eventuali contaminazioni che potessero comprometterne la qualità e la durata. Per ottenere tali condizioni, la strumentazione è stata sottoposta ad opportuni processi di sterilizzazione, inoltre tutte le operazioni sono state svolte sotto cappa a flusso laminare orizzontale che ha assicurato la protezione del campione da eventuali contaminazioni. Il flusso continuo di aria permette di creare al suo interno un'ambiente sterile grazie al processo di filtrazione particellare a carico dei filtri HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) composti da foglietti filtranti di microfibre di vetro assemblati in più strati, separati da setti in alluminio. L'efficienza filtrante dei filtri HEPA è rappresentata dalla capacità di trattenere particelle di 0,3 μ con un'efficacia pari al 99,97-99,99% (Sturchio & Ballacci, 2011).

L'autoclave è stata utilizzata come strumento per la sterilizzazione tramite calore di vetreria, terreni di coltura, microbox, acqua, dischetti filtranti, ecc. Il programma di sterilizzazione dell'autoclave si basa sul raggiungimento della temperatura interna di 121 °C per 20 minuti alla pressione di 1 bar, capace di eliminare qualsiasi tipo di microrganismo presente.

Bisturi, pinze, e qualsiasi altro strumento utile alla manipolazione del materiale vegetale e non, sono stati posti a sterilizzazione tramite calore usando gli specifici fornelli, dotati di una resistenza elettrica che fa raggiungere temperature incompatibili con la vita microbica.

3.3 Substrati di coltura

La preparazione dei substrati di coltura utilizzati per vari fini rispetto al materiale vegetale utilizzato e all'applicazione dei protocolli di trasformazione ha avuto un ruolo fondamentale

nello svolgimento del lavoro di tesi. La scelta del substrato più adatto è legata al genotipo e alla fase del protocollo da seguire.

Il terreno di coltura maggiormente utilizzato nel lavoro di tesi applicato ai genotipi di vite è il Murashige & Skoog (Murashige & Skoog, 1962), a cui, a seconda del genotipo e della fase di sviluppo e di crescita in vitro, sono stati aggiunti diversi fitoregolatori (auxine e citochinine) a determinate concentrazioni. Inoltre, ai fini del processo di trasformazione genetica, a tali substrati sono state aggiunte sostanze antibiotiche, quali kanamicina, cefotaxime e carbenicillina. Tali sostanze sono termolabili, quindi si aggiungono al terreno di coltura successivamente al processo di sterilizzazione.

Il terreno MS è a base di sali e vitamine, in particolare la formulazione base è la seguente:

- macroelementi 50 ml/L (20x);
- microelementi 10 ml/L (100x);
- vitamine 5 ml/L (100x);

a cui sono addizionati acqua deionizzata e microfiltrata tramite il sistema di purificazione Milli-Q system water, 30 g/L di saccarosio e 7 g/L di plant agar. Prima della sterilizzazione in autoclave il pH deve essere portato su a valori compresi tra 5,7 e 5,8, regolato tramite l'aggiunta di KOH per alcalinizzare o di HCl per acidificare in soluzioni diluite.

3.3.1 *Stock di ormoni e agenti selettivi utilizzati*

6-benziladenina (BA, 1 mg/mL): la soluzione stock è preparata partendo da 50 mg di BA in polvere in una Falcon da 50 mL a cui si aggiungono poche gocce di NaOH 1 M fino a che il BA si scioglie. Si porta a volume con acqua deionizzata e microfiltrata. Conservare a -20 °C per massimo 6 mesi.

Thidiazuron (TDZ) (1 mg/mL): la soluzione stock è preparata partendo da 100 mg di TDZ in polvere in un becher a cui si aggiunge una goccia di dimethyl sulfossido (DMSO). Si porta a volume con 100 mL di acqua deionizzata e microfiltrata, lasciando poi sciogliere per agitazione. Ripartire e conservare in Falcon a -20 °C.

Acido 1-naftalenacetico (NAA) (1 mg/mL): la soluzione stock è preparata sciogliendo 50 mg di NAA in polvere in una Falcon da 50 mL con poche gocce di NaOH 1M. Successivamente si porta a volume con acqua deionizzata e microfiltrata. Conservare a -20 °C per massimo 6 mesi.

Acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) (1 mg/mL): la soluzione stock è preparata sciogliendo 100 mg di polvere di 2,4-D con una goccia di etanolo o di NaOH 1 M e 100 mL di acqua deionizzata e microfiltrata. Conservare in frigorifero ad una temperatura compresa tra 2 e 8° C per massimo 6 mesi.

Acido 2-naftossiacetico (NOA) (1 mg/mL): la soluzione stock è preparata sciogliendo 100 mg di polvere di NOA con una goccia di etanolo o di NaOH 1 M e 100 mL di acqua deionizzata e microfiltrata. Conservare in frigorifero ad una temperatura compresa tra 2 e 8° C per massimo 6 mesi.

Rifampicina (RIF) (33,3 mg/mL): si sciolgono 330 mg di RIF in polvere in 10 mL di dimethyl sulfoxide (DMSO) mescolando. Si filtra la soluzione con filtro sterile (con maglie di 0,45 µm) in Eppendorf da 1,5 mL. Conservare a -20 °C per massimo 6 mesi.

Spectinomicina (SPEC) (100 mg/mL): si scioglie 1 g di SPEC in polvere in 10 mL di acqua deionizzata e microfiltrata, mescolando. Si filtra la soluzione con filtro sterile e si ripartisce in Eppendorf da 1,5 mL. Conservare a -20 °C per massimo 6 mesi.

Cefotaxime (CEF) (100 mg/mL): si scioglie 1 g di CEF in polvere in 10 mL di acqua deionizzata e microfiltrata. Si filtra la soluzione con filtro sterile e si conserva in Falcon da 10 mL, a -20 °C per massimo 6 mesi.

Carbenicillina (CARB) (100 mg/mL): si scioglie 1 g di CARB in polvere in 10 mL di acqua deionizzata e microfiltrata. Si filtra la soluzione con filtro sterile e si conserva in Falcon da 10 mL, a -20 °C per massimo 6 mesi.

Kanamicina (KAN) (50 mg/mL): si sciolgono 500 mg di KAN in polvere in 10 mL di acqua deionizzata e microfiltrata. Si filtra e si conserva in Eppendorf da 1,5 mL a -20°C per massimo 6 mesi.

Acetosiringone (20 mg/mL): la soluzione stock è preparata sciogliendo 100 mg di acetosiringone in 5 mL di etanolo puro. Si filtra e si ripartisce in Eppendorf da 1,5 mL. Conservare a -20° C per massimo 6 mesi.

3.4 Trasformazione genetica

3.4.1 Ceppi di *Agrobacterium spp.* e costrutti genici

Le prove di trasformazione sono state mediate da due diverse specie di *Agrobacterium*, quali *Agrobacterium tumefaciens* ceppo EHA101, e un ceppo di tipo wild di *Agrobacterium rhizogenes*. I ceppi di *Agrobacterium spp.* contengono il plasmide pK7GWIWG2-7F2,1 (figura 3.2) che può portare due differenti costrutti il cui fine è sviluppare resistenza a *Peronospora* nella pianta grazie al processo di silenziamento genico:

- il costrutto Pv-DCL441 hpRNA (260 bp), denominato costrutto 441;
- il costrutto Pv-DCL441+DCL331 hpRNA (500 bp), denominato costrutto chimera.

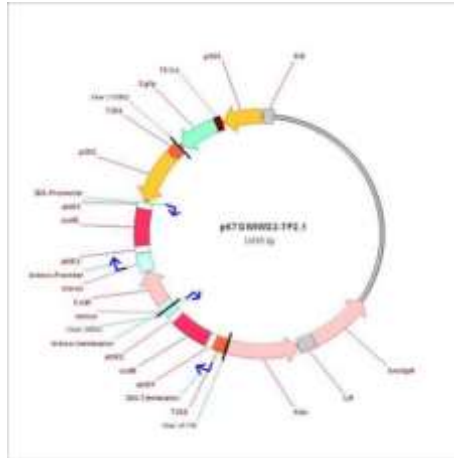


Figura 3.2 Il plasmide pK7GWIWG2-7F2,1

All'interno di un progetto di Dottorato di ricerca sono stati disegnati e preparati i due costrutti genici, inseriti nei ceppi batterici sopra descritti, in collaborazione con i colleghi del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna, che hanno basato il proprio lavoro sui dati ottenuti dallo studio pubblicato sulla rivista scientifica Scientific Reports "A multi-omics study of the grapevine-downy mildew pathosystem unveils a complex protein coding- and noncoding-based arms race during infection" (Brilli, et al., 2018).

In collaborazione con i colleghi dell'Università di Bologna sono stati disegnati e prodotti i due costrutti a forcina (figura 3.3), entrambi esprimenti sequenze isolate da un ceppo locale di *P. viticola*, codificanti per due costrutti a forcina che hanno come geni target le sequenze di *P. viticola* codificanti per una (costrutto 441) o entrambe (costrutto chimera) le DCLs. Entrambi i costrutti codificano inoltre per la proteina GFP (gene reporter *eGFP*), e per l'enzima neomicin fosfotransferasi II (gene marcatore di selezione *nptII*), che conferisce la resistenza alla kanamicina alle cellule vegetali che lo esprimono, necessari per il processo di selezione delle cellule effettivamente trasformate. Le sequenze sono sotto il controllo del promotore 35S, isolato dal virus del mosaico del cavolfiore (CaMV), detto anche promotore costitutivo, che induce l'espressione costante della sequenza che sta a valle in tutti gli organi della pianta.

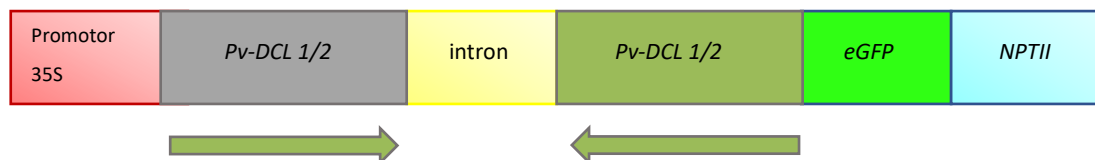


Figura 3.3 I costrutti Pv-DCL441+DCL331 hpRNA/Pv-DCL441 hpRNA

3.4.2 Substrati per la trasformazione

Si elencano di seguito i substrati utilizzati per le prove di trasformazione applicate ai bulk meristematici e agli embrioni somatici. Tutti i substrati hanno subito un processo di sterilizzazione in autoclave, e sono stati in seguito colati negli appositi contenitori.

PER TESSUTO MERISTEMATICO

1. LB liquido e solido (*Agrobacterium culture medium*): è il substrato di crescita dell'agrobatterio, la cui formulazione base è composta da 10 g/L di triptone, 5 g/L di estratto di lievito, 10 g/L di NaCl e 7 g/L di bacto agar, aggiunto solo nel caso dell'LB solido. Il pH del substrato è pari a 7,2 (tamponato con NaOH, e non con KOH perché gli ioni potassio risultano essere tossici per i batteri). Sono stati poi aggiunti al substrato, successivamente alla sterilizzazione essendo sostanze termolabili, gli antibiotici rifampicina (50 mg/L) e spectinomycin (50 mg/L).

2. MS20 liquido (medium meristematic bulk infection solution): si tratta del substrato utilizzato per risospendere l'agrobatterio e per la successiva infezione delle sezioni di bulk meristematici. La formulazione è 4,4 g/L di sali MS, vitamine già incluse, 20 g/L di saccarosio, ed ha un pH pari a 5,2 (tamponato con KOH). Ai fini dell'attivazione del processo infettivo, a tale substrato si aggiunge l'acetosiringone (100 µM).

3. MSH0 solido (*Agrobacterium-plant co-culturing medium*): si tratta del substrato impiegato per la co-coltura delle sezioni di tessuto meristematico appena infettate. La formulazione è 4,4 g/L di sali MS, vitamine già incluse, 30 g/L di saccarosio, 7 g/L di plant agar ed un pH pari a 5,7 (tamponato con KOH).

4. Terreno per la selezione e rigenerazione delle cellule trasformate: tale substrato è costituito da 4,4 g/L di sali MS, vitamine già incluse, 30 g/L di saccarosio e 7 g/L di plant agar, in più sono aggiunti gli ormoni Thidiazuron, 6-Benziladenina e Acido alfa-naftilacetico, a determinate concentrazioni variabili in base al genotipo, che sono già state indicate nella Tabella 3.1 Specifiche concentrazioni di fitoregolatori per genotipo in substrato MS. Il terreno deve avere un pH compreso tra 5,7 e 5,8 (tamponato con KOH). Successivamente al processo di sterilizzazione, sono stati aggiunti 200 mg/L di cefotaxime e 200 mg/L di carbenicillina, e la kanamicina (solitamente in concentrazioni pari a 50 mg/L, anche se in una prova la dose è stata aumentata a 70 mg/L).

PER EMBRIONI SOMATICI

1. LB liquido e solido (*Agrobacterium culture medium*)

2. X2 liquido (*Agrobacterium liquid transfer medium*): si tratta del substrato utilizzato per risospendere l'agrobatterio e per la successiva infezione degli embrioni somatici. La

formulazione è a base di 4,4 g/L di sali MS modificati a livello di macroelementi e vitamine, e 20 g/L di saccarosio. Il pH è pari a 5,8 (tamponato con KOH). Per attivare l'infezione, si aggiunge l'acetosiringone (100 µM) (Dhekney, et al., 2016).

3. DM liquido (liquid cocultivation medium) e solido (callus induction medium): si tratta del substrato impiegato in forma liquida per la co-coltura, per il lavaggio degli embrioni e in forma solida per l'induzione di callo embriogenico. La formulazione è a base di sali DKW, a cui si aggiungono 1 g/L di myo-inositolo, 30 g/L di saccarosio, 7 g/L di plant agar solo nel caso del DM solido, 5 µM (1,125 mg/L) di BAP, 2,5 µM (0,505 mg/L) di NOA e 2,5 µM (0,5525 mg/L) di 2,4-D. Il pH è pari a 5,7 (tamponato con KOH). Successivamente alla sterilizzazione in autoclave, si aggiungono 200 mg/L di cefotaxime e 200 mg/L di carbenicillina, mentre per la kanamicina le concentrazioni sono variabili in base al genotipo nel DM solido utilizzato come terreno per l'induzione di callo pre-embriogenico (in questa prova 70 mg/L), e 15 mg/L nel DM liquido utilizzato per il lavaggio degli embrioni (Dhekney, et al., 2016).

4. E96 solido (callus induction medium): è un altro tipo di substrato utilizzato per l'induzione di callo embriogenico in alternativa al DM solido. La formulazione è 2,2 g/L di sali MS, 60 g/L di saccarosio, 7 g/L di plant agar e 9 µM (2,025 mg/L) di BAP. Il pH è pari a 5,7 (tamponato con KOH). Successivamente alla sterilizzazione, sono stati aggiunti 200 mg/L di carbenicillina, 200 mg/L di cefotaxime e 70 mg/L di kanamicina (Maillot, et al., 2006).

5. X6 solido (secondary embryo development and maintenance medium): si tratta del substrato che induce la formazione di embrioni dai tessuti superficiali del callo embriogenico. La formulazione è 4,4 g/L di sali MS modificati a livello di macroelementi e vitamine, 1 g/L di myo-inositolo, 60 g/L di saccarosio, 7 g/L di plant agar e 0,5 g/L di carbonio attivo. Il pH è pari a 5,8 (tamponato con KOH). Ai fini della selezione e della rigenerazione degli embrioni somatici effettivamente trasformati, si aggiungono 200 mg/L di cefotaxime, 200 mg/L di carbenicillina e 50 mg/L di kanamicina (Dhekney, et al., 2016).

6. A (secondary embryo development and maintenance medium): è un altro tipo di substrato che induce la formazione di embrioni dal tessuto superficiale del callo embriogenico. La formulazione è 4,4 g/L di sali MS, 60 g/L di saccarosio, 7 g/L di plant agar, 2,5 g/L di carbone attivo, 3,5 mg/L di IAA (termosensibile), 2 mg/L di NOA e 0,25 mg/L di BA. Il pH è pari a 5,8 (tamponato con KOH). Ai fini della selezione e della rigenerazione degli embrioni somatici effettivamente trasformati, si aggiungono 200 mg/L di cefotaxime, 200 mg/L di carbenicillina e 50 mg/L di kanamicina (Maillot, et al., 2006).

3.4.3 Protocollo di trasformazione genetica da tessuto meristematico

Il protocollo di trasformazione da tessuti ottenuti via organogenesi, applicato in questo lavoro di tesi, è quello descritto nel paper “*Comparison of regeneration capacity and Agrobacterium-mediated cell transformation efficiency of different cultivars and rootstocks of Vitis spp. via organogenesis*” di Sabbadini et al. (2019).

PREPARAZIONE DELL'AGROBATTERIO

L'agrobatterio, crioconservato a -80°C in una soluzione contenente LB liquido e glicerolo, è stato piastrato sul substrato di crescita batterica LB solido, precedentemente colato in piastre Petri sterili di 9 cm di diametro, nel quale sono presenti gli antibiotici rifampicina (50 mg/L) e spectinomicina (50 mg/L) che servono per selezionare soltanto l'agrobatterio che contiene il costrutto d'interesse. La crescita batterica è indotta ponendo poi le Petri nell'incubatore, capovolte in modo tale da evitare la formazione della condensa, alla temperatura di 28°C per 48 ore.



Figura 3.4 Colonie batteriche sviluppate sul substrato di crescita batterica LB solido dopo 48 ore di incubazione

Alla fine del periodo di incubazione, le singole colonie batteriche sviluppate (figura 3.4) si prelevano utilizzando un'ansa sterilizzata e si inoculano in tubi Falcon da 50 mL contenenti 10 mL di LB liquido, nel quale sono presenti 50 mg/L di rifampicina e 50 mg/L di spectinomicina. Le Falcon vengono poi poste in agitatore per una notte, ad una temperatura di 28°C e con una rotazione di 170 rpm. A tali condizioni le colonie di agrobatterio continuano a crescere.

Il mattino seguente è possibile quantificare la crescita batterica attraverso il parametro optical density (OD) o assorbanza, rilevato attraverso lo spettrofotometro con lettura a 600 nm. Tale parametro dovrebbe avere un valore ottimale compreso tra 1 e 1,3. Se il valore di OD è adeguato, si procede con la centrifuga del contenuto delle Falcon per separare le cellule batteriche dal terreno liquido: l'inoculo batterico viene messo in centrifuga per 15 minuti a 2500 rpm. Si forma il pellet batterico, che si deposita in fondo alla Falcon grazie all'azione centrifuga. Quindi si elimina velocemente il surnatante (LB liquido) e si risospende il pellet in 40 mL di MS20 liquido a cui si aggiunge l'acetosiringone (100 µM), assicurandosi che il pellet si risospenda bene. Infine, si termina la preparazione dell'agrobatterio mettendo i tubi di infezione (figura 3.5) in incubazione in camera di crescita per 2 ore, su agitatore a 100-120 rpm, in modo tale da attivare e preparare i batteri all'infezione.

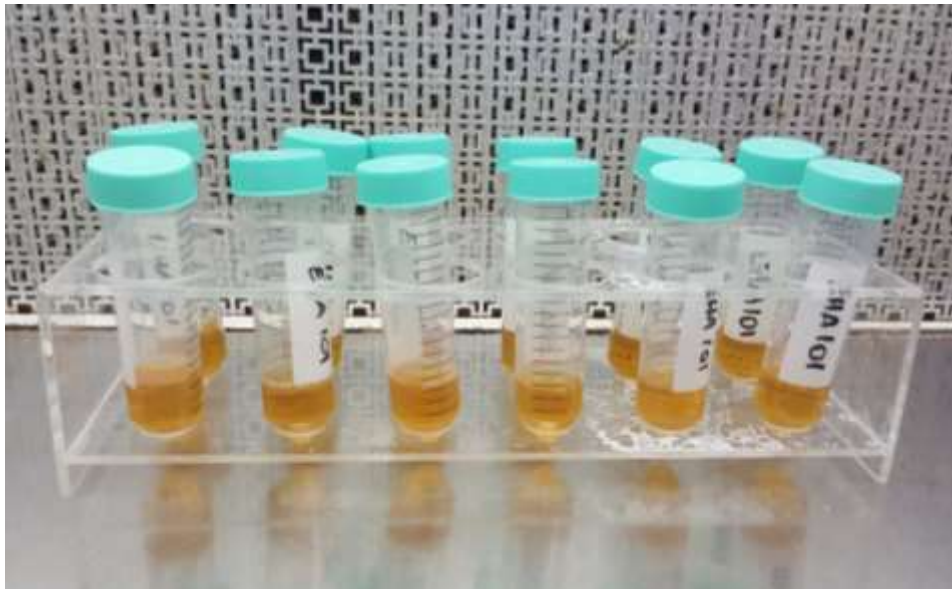


Figura 3.5 Tubi di infezione in preparazione

INFEZIONE DEL TESSUTO VEGETALE

Mentre i tubi di infezione sono mantenuti per 2 ore in rotazione in camera di crescita, si procede alla preparazione delle sezioni di tessuto meristemico, che devono essere di circa 1 cm² e 2 mm di spessore. Queste si collocano su piastre Petri contenenti MSH0 solido (solitamente 20 sezioni per Petri).

Passate le 2 ore, si procede all'infezione del tessuto vegetale. Le sezioni di bulk meristemico si inseriscono nelle Falcon contenenti la soluzione batterica (solitamente 20 sezioni per Falcon). Le Falcon si coprono con alluminio per avere la condizione di buio, che assicura una maggiore capacità infettiva alle cellule batteriche, e si mettono in camera di crescita su agitatore a 100-120 rpm per 15 minuti. Successivamente, le singole sezioni vengono messe ad

asciugare su dischi di carta da filtro posti in vaschette di alluminio (tutto precedentemente sterilizzato in autoclave), e poi si passa alla preparazione della co-coltura agrobatterio-pianta (figura 3.6), disponendo le sezioni in piastre Petri contenenti il substrato MSH0 solido sopra il quale è stato posto un disco di carta da filtro sterile impregnato di 500 μ l di acetosiringone (100 μ M) + MS20 liquido (solitamente 15 sezioni per Petri). La co-coltura viene mantenuta al buio in camera di crescita per 48 ore.

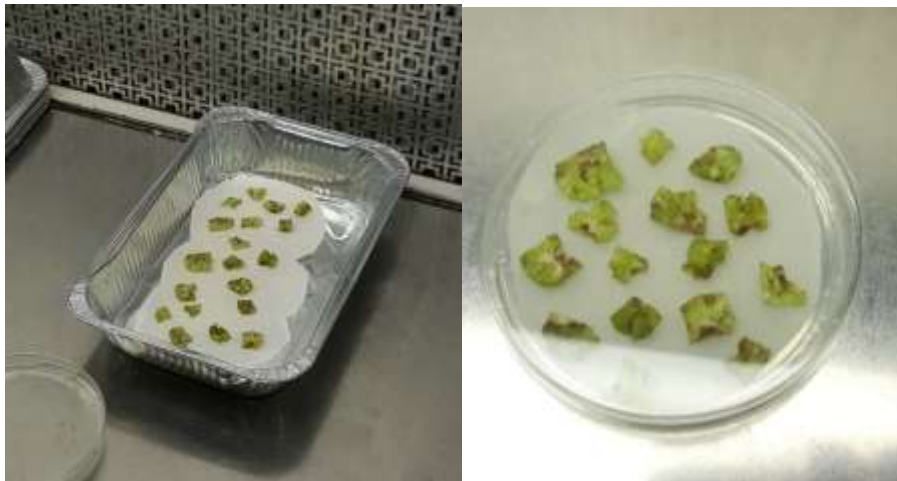


Figura 3.6 Preparazione della co-coltura

SELEZIONE E RIGENERAZIONE DELLE LINEE PUTATIVAMENTE TRASFORMATE

Successivamente alla fase di co-coltura, passate le 48 ore, il materiale vegetale viene trasferito nelle microbox (piccoli contenitori in materiale plastico), contenenti circa 50 mL del terreno per la selezione e rigenerazione delle cellule trasformate, il cui contenuto di citochinine e auxine dipende dal genotipo (solitamente 5 sezioni per microbox). A tale substrato sono stati aggiunti 200 mg/L di cefotaxime e 200 mg/L di carbenicillina, antibiotici necessari ad inibire lo sviluppo e la crescita dell'agrobatterio, che viene ormai considerato come contaminante delle cellule vegetali, avendo già svolto nella fase di co-coltura la sua azione infettiva utile ai fini della trasformazione. Altro antibiotico aggiunto è la kanamicina, in dosi variabili in base ai test di tossicità eseguiti in fase di ottimizzazione del protocollo (solitamente in concentrazioni pari a 50 mg/L, anche se in una prova la dose è stata aumentata a 70 mg/L).. Le microbox, etichettate e ben sigillate, sono state trasferite in camera di crescita, mantenute a 24°C e con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. Ogni 21 giorni si fa un controllo, con screening delle sezioni allo stereoscopio, raccolta dati e trasferimento su substrato fresco, così da assicurare al materiale vegetale l'apporto di nutrienti adeguato allo sviluppo e l'azione degli antibiotici utili a prevenire eventuali contaminazioni (cefotaxime e carbenicillina) e a

favorire lo sviluppo soltanto delle cellule in cui la trasformazione genetica è andata a buon fine (kanamicina).

Lo stereoscopico (Leica MZ10F) con luce UV è dotato di filtro GFP specifico per individuare la fluorescenza emessa dalla proteina codificata dal gene reporter *eGFP*, introdotto nelle cellule trasformate con il costrutto presente nel plasmide dell'agrobatterio. Questa permette di individuare gli eventi di trasformazione a livello cellulare, con segnali inizialmente puntiformi che poi si distribuiscono in maniera più o meno omogenea nelle sezioni con la proliferazione e lo sviluppo dei tessuti, potendo così distinguere in quali cellule la trasformazione ha avuto esito positivo e in quali no. Associati allo stereoscopio, la strumentazione fotomicrografica Leica DFC 450 C e il programma informatico Leica Application Suite V.4.5 sono stati utili per ottenere le immagini dei tessuti e dei germogli che si presume siano formati da cellule trasformate.

Se presenti, i germogli putativamente trasformati sono prima isolati e mantenuti ancora per un po' sullo stesso substrato MS con le stesse concentrazioni di fitoregolatori e antibiotici, per favorire la proliferazione dei germogli avventizi, e poi successivamente si trasferiscono in tubi su substrato MS contenente una bassa concentrazione di citochinine (1 mg/L), così da avviare anche il processo di allungamento dei germogli oltre alla proliferazione. Seguono diverse subculture, caratterizzate da una continua riduzione delle concentrazioni di citochinine (1-0.5-0.25-0 mg/L), necessarie per ottenere il graduale allungamento del germoglio e infine la radicazione.

3.4.4 Protocollo di trasformazione genetica da embrioni somatici

Il protocollo di trasformazione genetica da embrioni somatici, applicato in questo lavoro di tesi, è quello descritto nel paper "*Somatic Embryogenesis and Genetic Modification of Vitis*" di Dhekney et al. (2016).

PREPARAZIONE DELL'AGROBATTERIO

La procedura per la preparazione dell'agrobatterio è la stessa vista nel precedente protocollo di trasformazione genetica applicato ai tessuti meristemati. L'unica differenza è che il pellet ottenuto successivamente alla centrifugazione viene risospeso in 20 mL di X2 liquido a cui si aggiunge l'acetosiringone (100 μ M). Si termina la preparazione dell'agrobatterio mettendolo in incubazione in camera di crescita per 3 ore, su agitatore a 100-120 rpm, in modo tale da attivare e preparare i batteri all'infezione.

INFEZIONE DEL TESSUTO VEGETALE

Mentre la coltura batterica è mantenuta per 3 ore in camera di crescita, si procede alla selezione degli embrioni somatici da sottoporre al processo infettivo. Questi devono essere allo stadio

di sviluppo cotiledonare (figura 3.4). In attesa che i tubi di infezione siano pronti, gli embrioni selezionati si collocano su piastre Petri contenenti X6 solido.



Figura 3.7 Embrioni somatici allo stadio cotiledonare di Lambrusco Salamino

Passate le 3 ore, si procede all'infezione degli embrioni somatici. In una Petri si posizionano 25 embrioni accumulandoli al centro, e si bagnano con 5 mL di coltura batterica. Si procede con un movimento oscillatorio della piastra, mantenendo così in agitazione per 7-10 minuti in modo tale da favorire il processo infettivo. Successivamente si aspira la coltura batterica utilizzando una pipetta e si prepara la co-coltura trasferendo gli embrioni somatici in piastre Petri contenenti due dischi di carta da filtro sterili impregnati di DM liquido senza acetosiringone (solitamente 25 embrioni per Petri). La co-coltura (figura 3.8) viene mantenuta al buio in camera di crescita per 72 ore.



Figura 3.8 Co-coltura embrioni somatici-agrobatterio

SELEZIONE E RIGENERAZIONE DELLE LINEE PUTATIVAMENTE TRASFORMATE

Successivamente alla fase di co-coltura, passate le 72 ore, utilizzando lo stereoscopio si valuta il livello di trasformazione transiente degli embrioni somatici infettati. Poi si trasferiscono in una beuta contenente DM liquido con 200 mg/L di cefotaxime, 200 mg/L di carbenicillina e 15 mg/L di kanamicina. Questa fase è detta lavaggio degli embrioni, serve per inibire la crescita batterica, dura 72 ore, e si mantengono gli embrioni al buio in incubazione a 28°C su agitatore impostato sui 110 rpm.

Passate le 72 ore, gli embrioni si trasferiscono nelle Petri contenenti i substrati per l'induzione del callo embriogenico che possono essere il DM solido o l'E96 solido. Questi contengono 200 mg/L di cefotaxime e 200 mg/L di carbenicillina, necessari per inibire lo sviluppo dell'agrobatterio, e la kanamicina, in dosi variabili in base al genotipo, per la selezione dei soli embrioni che hanno ultimato positivamente il processo di trasformazione. Le Petri si mantengono quindi al buio in camera di crescita a 26°C per 4 settimane, per permettere lo sviluppo e la proliferazione del callo.

Dopo 4 settimane, gli embrioni somatici dovrebbero aver sviluppato il callo embriogenico, e si trasferiscono in nuove Petri contenenti dei substrati che promuovono la germinazione degli embrioni transgenici a partire dal callo embriogenico trasformato, in particolare trasferendo su substrato X6 gli embrioni che stavano su substrato DM, e su substrato A quelli che stavano su E96. Sia il substrato X6 che il substrato A contengono 200 mg/L di cefotaxime e 200 mg/L di carbenicillina, per bloccare lo sviluppo dell'agrobatterio, e 50 mg/L di kanamicina, utile alla selezione. Le Petri si mantengono al buio in camera di crescita. Il substrato viene rinnovato dopo 6 settimane. Dalle cellule superficiali del callo embriogenico dovrebbero svilupparsi direttamente gli embrioni transgenici secondari.

Nel caso in cui si sviluppino e si individuino embrioni secondari putativamente transgenici, questi si trasferiscono in nuove Petri su substrato X6 soltanto, avendo però raggiunto lo stadio cotiledonare. Le Petri si mantengono in camera di crescita a 24°C per favorire la germinazione degli embrioni, e il substrato si rinnova ogni 2 settimane.

3.5 Prove di rigenerazione e trasformazione applicate a *Vitis*

Si elencano di seguito le prove di rigenerazione e trasformazione genetica realizzate in questo lavoro di tesi utilizzando il materiale vegetale, i ceppi di *Agrobacterium* e i protocolli descritti nei precedenti paragrafi.

3.5.1 Prova di trasformazione genetica per organogenesi mediata da *A. tumefaciens* EHA101 e *A. rhizogenes* per la valutazione dell'effetto di diverse specie di *Agrobacterium* sull'efficienza di trasformazione

La prima prova di trasformazione genetica è stata realizzata applicando il protocollo descritto al paragrafo 3.4.3 su sezioni di tessuto meristematico dei seguenti genotipi, utilizzando il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* e il ceppo di tipo wild di *A. rhizogenes* contenenti il costrutto Pv-DCL441 hpRNA, come indicato dalla tabella 3.2.

Tabella 3.2 Numero sezioni infettate con *A. tumefaciens* EHA101 e *A. rhizogenes* wild

	n° sezioni infettate con <i>A. tumefaciens</i> EHA101	n° sezioni infettate con <i>A. rhizogenes</i> wild
Lambrusco Salamino	100	100
Kober 5BB	100	100

Quindi, in totale sono stata infettate 200 sezioni di Lambrusco Salamino e 200 sezioni di Kober 5BB, utilizzando come substrati per la selezione e la rigenerazione rispettivamente l'MS BA2 TDZ 0,05 e l'MS BA2 TDZ 0,44, a cui sono stati addizionati 200 mg/L di carbenicillina e 200 mg/L di cefotaxime, per inibire lo sviluppo dell'agrobatterio, e 50 mg/L di kanamicina, per promuovere lo sviluppo e la rigenerazione soltanto delle cellule in cui la trasformazione ha avuto esito positivo.

Riguardo al parametro OD rilevato in fase di preparazione dell'agrobatterio allo spettrofotometro con lettura a 600 nm, per il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* questo aveva un valore di 1,6, mentre per il ceppo di *A. rhizogenes* il valore era compreso tra 1,3 e 1,4.

3.5.2 Prima prova di trasformazione genetica per organogenesi mediata da *A. tumefaciens* EHA101 sul genotipo modello Thompson Seedless

La seconda prova di trasformazione genetica è stata realizzata applicando il protocollo descritto al paragrafo 3.4.3 su sezioni di tessuto meristematico del genotipo Thompson Seedless, utilizzando il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* e infettando 155 sezioni con il costrutto Pv-DCL441 hpRNA. Il substrato utilizzato per la selezione e la rigenerazione è stato l'MS BA3 NAA 0,02, contenente 200 mg/L di carbenicillina, 200 mg/L di cefotaxime e 50 mg/L di kanamicina.

Il parametro OD rilevato allo spettrofotometro a 600 nm dell' *A. tumefaciens* EHA101 era pari a 1,3.

3.5.3 *Seconda prova di trasformazione genetica per organogenesi mediata da A. tumefaciens EHA101 sul genotipo modello Thompson Seedless*

La terza prova di trasformazione genetica è stata realizzata applicando il protocollo descritto al paragrafo 3.4.3 per la seconda volta su sezioni di tessuto meristematico del genotipo Thompson Seedless, utilizzando il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* e infettando 100 sezioni con il costrutto Pv-DCL441 hpRNA e 100 sezioni con il costrutto chimera Pv-DCL441+DCL331 hpRNA.

In questa prova la dose di kanamicina contenuta nel substrato per la selezione e la rigenerazione di Thompson Seedless, l'MS BA3 NAA 0,02, è stata aumentata a 70 mg/L, in modo tale da avere una selezione più vigorosa fin dalle prime settimane.

Il parametro OD rilevato allo spettrofotometro a 600 nm dell'*A. tumefaciens* EHA101 era compreso tra 1,2 e 1,3.

3.5.4 *Prova di rigenerazione per embriogenesi somatica da fiore intero*

La prova di rigenerazione tramite embriogenesi somatica è stata realizzata applicando il protocollo descritto al paragrafo 3.1.2 su 400 fiori di Lambrusco Salamino e 180 fiori di Ancellotta.

Nel dettaglio, i substrati utilizzati sono stati l'MS1 per l'induzione del callo pre-embriogenico e l'X6 per la proliferazione degli embrioni somatici.

3.5.5 *Prova di trasformazione genetica per embriogenesi somatica mediata da A. tumefaciens EHA101 su Ancellotta*

La quarta prova di trasformazione genetica è stata realizzata applicando il protocollo descritto al paragrafo 3.4.4 su 100 embrioni somatici del genotipo Ancellotta, utilizzando il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* contenente il costrutto chimera Pv-DCL441+DCL331 hpRNA. I substrati utilizzati per la realizzazione della prova sono quelli descritti al paragrafo 3.4.2

Il parametro OD rilevato allo spettrofotometro a 600 nm dell'*A. tumefaciens* EHA101 era compreso tra 1,2 e 1,3.

3.6 **Raccolta e analisi dei dati**

Il materiale vegetale sottoposto alle prove di rigenerazione e trasformazione genetica è stato osservato allo stereoscopico dotato di filtro GFP utilizzando diversi ingrandimenti, per rilevare i dati utili alla valutazione dei risultati ottenuti.

In particolare, per le sezioni meristematiche sottoposte alle prove di trasformazione la raccolta dei dati è stata effettuata ad intervalli regolari di 3 settimane fino alla dodicesima settimana, andando a individuare:

- la presenza/assenza di possibili contaminazioni di natura batterica o fungina (eliminando poi le sezioni che risultavano contaminate);
- il numero di sezioni necrotiche (eliminando poi le sezioni completamente necrotiche);
- il numero di sezioni fluorescenti esprimenti GFP, in cui si presume quindi che l'evento di trasformazione abbia avuto esito positivo;
- la presenza/assenza di possibili germogli fluorescenti.

Raccolti questi dati, si è calcolata l'efficienza di trasformazione espressa come il rapporto percentuale tra il numero di sezioni esprimenti GFP su numero totale delle sezioni infettate, e come il numero di germogli transgenici su numero totale di espianti infettati.

Gli embrioni somatici sottoposti alla trasformazione genetica sono stati osservati allo stereoscopio durante le varie fasi del protocollo di trasformazione applicato. In particolare, è stato rilevato come dato il numero di embrioni che mostravano fluorescenza, per valutare il livello di trasformazione transiente che è dato dal rapporto tra il numero di embrioni con GFP su numero totale di embrioni infettati.

Infine, per valutare l'efficienza di rigenerazione per embriogenesi somatica da fiore intero è stato raccolto come dato il numero di fiori interi per Petri in cui si è formato il callo pre-embriogenico.

3.6.1 *Test statistici impiegati*

I dati raccolti per le prove di trasformazione genetica per organogenesi sono stati analizzati a livello statistico utilizzando il test ANOVA ad una via, considerando un'unica fonte di variabilità tra i dati.

L'analisi della varianza è un modello statistico che permette di confrontare simultaneamente più medie, partendo da un'ipotesi nulla secondo la quale le medie sono tra loro uguali, e di valutare come incidono le diverse fonti di variabilità sulle differenze entro e tra i gruppi (Barcaccia & Falcinelli, 2011). Ciascun gruppo è formato da una serie di unità sperimentali a cui è stato applicato il trattamento: in questo lavoro di tesi l'unità sperimentale è rappresentata dal singolo espianto che ha subito la prova di trasformazione (il trattamento). L'ipotesi nulla prevede che i dati di tutti i gruppi abbiano la stessa distribuzione, e che le differenze osservate siano imputabili al solo effetto del caso (Barcaccia & Falcinelli, 2011). Se l'ipotesi nulla viene rigettata, in base ai risultati del Test F (rapporto tra varianze tra ed entro i trattamenti), ne consegue che almeno una delle medie considerate è significativamente diversa dalle altre. Inoltre, la varianza entro i trattamenti corrisponde all'errore, dato dal rapporto tra la deviazione

standard e la radice quadrata del numero totale delle unità sperimentali (n° espianti), e permette di stimare la variazione a cui è soggetta l'unità sperimentale, di solito dovuta ad una non perfetta omogeneità di esecuzione delle prove sperimentali.

Il test ANOVA ad una via permette di valutare come una variabile dipendente varia in funzione di una variabile indipendente. La variabile dipendente corrisponde al numero di sezioni fluorescenti con GFP, e la variabile indipendente corrisponde alla tipologia di trattamento effettuato. Attraverso l'uso del programma di statistica Statistica7 sono state riscontrate delle differenze tra le medie non imputabili al caso e che la varianza è significativa, per cui si rifiuta l'ipotesi nulla. L'impiego dei Test Post Hoc permette di individuare le differenze significative dell'ANOVA, verificando effettivamente quali sono le medie diverse tra loro. In questo lavoro di tesi, è stato impiegato nello specifico il Test Student-Newman-Keuls (Test SNK) che permette di analizzare i dati separatamente per gruppi a varianza omogenea, e quindi individuare quali medie differiscono le une dalle altre, ordinandole dalla più alta alla più bassa e distinguendole in base al livello di significatività.

Le differenze espresse con probabilità minore o uguale a 0,05 sono state considerate statisticamente significative.

Capitolo 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Prova di trasformazione genetica per organogenesi mediata da *A. tumefaciens* EHA101 e *A. rhizogenes* per la valutazione dell'effetto di diverse specie di *Agrobacterium* sull'efficienza di trasformazione

Nella prima prova di trasformazione sono state infettate con il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* 100 sezioni di tessuto meristematico di Lambrusco Salamino e 100 sezioni di Kober 5BB, e con un ceppo di tipo *wild* di *A. rhizogenes* 100 sezioni di Lambrusco Salamino e 100 sezioni di Kober 5BB, per un totale di 400 sezioni. Il costrutto genico impiegato nella trasformazione è stato il costrutto 441 (Pv-DCL441 hpRNA), per entrambe le specie di *Agrobacterium* utilizzate. Per la rigenerazione degli espianti infettati di Kober 5BB è stato utilizzato il substrato MS BA2 TDZ 0,05 e per Lambrusco Salamino il substrato MS BA2 TDZ 0,44, entrambi contenenti 200 mg/L di carbenicillina, 200 mg/L di cefotaxime e 50 mg/L di kanamicina. Le sezioni sono state seguite per un periodo di 12 settimane dal momento dell'agroinfezione, rinnovando il terreno di coltura di cui si è mantenuta sempre la stessa composizione chimica, monitorandone lo sviluppo e valutando l'efficienza di trasformazione e di rigenerazione attraverso la raccolta di dati effettuata ogni 3 settimane andando a visualizzare le sezioni allo stereoscopio dotato di filtro GFP. Ad ogni controllo sono stati rilevati i parametri dell'espressione qualitativa della GFP nel tessuto meristematico (presenza/assenza) e di presenza di germogli rigenerati per organogenesi che manifestavano costitutivamente la fluorescenza verde. Si è valutata anche la presenza di possibili contaminazioni e di tessuti necrotici, eliminando di conseguenza le sezioni contaminate o necrotiche.

Visualizzando le sezioni allo stereoscopio con filtro GFP, le cellule in cui l'evento di trasformazione si presume si sia concluso positivamente appaiono fluorescenti, poiché si presume che nei loro genomi sia stato integrato il costrutto genico che contiene anche il gene *eGFP* responsabile della sintesi della proteina GFP. I tessuti clorofilliani presentano di per sé un certo grado di fluorescenza perché la stessa clorofilla è un composto fluorescente, per cui con il filtro GFP è possibile individuare questi tessuti di tipo *wildtype* e distinguerli rispetto ai tessuti trasformati poiché assumono una colorazione rossa omogenea (figura 4.1).

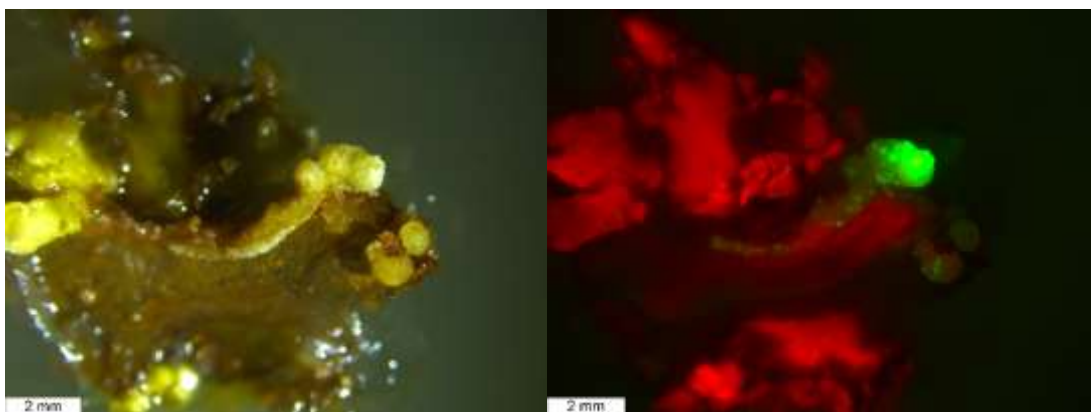


Figura 4.1 Petri 2 bulk 1 di Lambrusco Salamino infettato con EHA101 *A. tumefaciens* al controllo di 3 settimane: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 0,8 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 0,8 x. I tessuti non trasformati appaiono al filtro GFP di colorazione rosso omogenea, al contrario l'espressione del gene eGFP appare con l'emissione di fluorescenza verde.

Non è detto che tutta la fluorescenza osservata sia attribuibile a tessuti trasformati, poiché ad esempio nelle porzioni necrotiche del callo la fluorescenza potrebbe essere attribuita a infezioni latenti dell'agrobatterio. Spesso si hanno poi dei falsi positivi detti *escapes*, cioè cellule che non risentono del fattore di selezione e riescono a crescere in presenza di kanamicina pur non avendo subito alcun evento di trasformazione, e che quindi non appaiono del tutto necrotiche. Tuttavia, si è in grado di identificarle per l'assenza di fluorescenza legata all'espressione della proteina GFP, che in questi tessuti non trasformati è assente.

I dati raccolti dopo 3 e 12 settimane dalla co-coltura sono stati analizzati tramite il test ANOVA, che ha mostrato un livello di varianza significativa tra il valore percentuale dato dal rapporto tra il numero di espianti esprimenti fluorescenza e il numero di espianti totali (tabella 4.1).

Tabella 4.1 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti infettati per singola combinazione genotipo-agrobatterio a 3 e a 12 settimane dalla co-coltura

Combinazione genotipo-agrobatterio	% espianti esprimenti GFP/espianti totali	
	3 settimane	12 settimane
Kober 5BB <i>A. rhizogenes</i>	92	25
Kober 5BB EHA101	42,2	8
Lambrusco Salamino <i>A. rhizogenes</i>	83,7	53
Lambrusco Salamino EHA101	60	7

Successivamente si è utilizzato il test statistico Student-Newman-Keuls (SNK) per analizzare le differenze significative esistenti tra i valori ottenuti rispetto ai quattro trattamenti effettuati, considerando come singolo trattamento la combinazione genotipo-agrobatterio, riportate nel grafico 4.1.

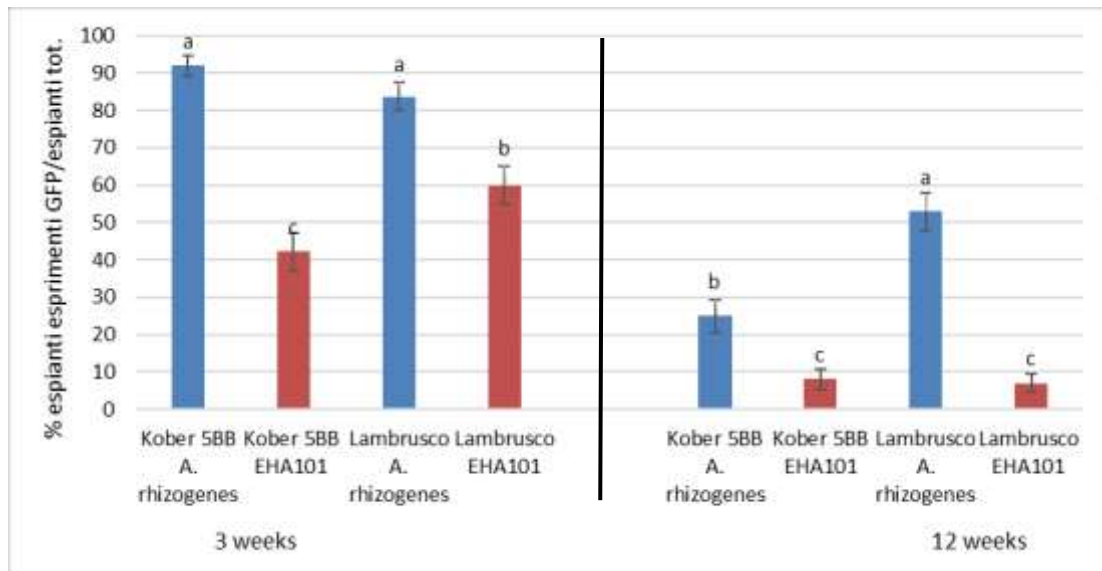


Grafico 4.1 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti infettati delle diverse combinazioni agrobatterio-genotipo, dopo 3 e 12 settimane dalla co-coltura con *A. rhizogenes* (in blu) e *A. tumefaciens EHA101* (in rosso). Si valutano le differenze significative tra i trattamenti.

Dal grafico è possibile vedere l'evoluzione nel tempo della percentuale di espianti esprimenti GFP sul totale di espianti infettati, per ogni singolo trattamento, confrontata a 3 e a 12 settimane. La statistica SNK, che mostra il livello di significatività delle differenze tra i trattamenti, è mostrata nel grafico con le lettere dell'alfabeto in minuscolo, per cui si nota che a 3 settimane tra i trattamenti effettuati con *A. rhizogenes* non esistono differenze statisticamente significative, invece presenti tra questi trattamenti e quelli in cui il ceppo di agrobatterio utilizzato è stato *EHA101 A. tumefaciens*, mentre a 12 settimane non esistono differenze statisticamente significative tra i trattamenti effettuati con *EHA101 A. tumefaciens*, presenti invece tra questi e quelli in cui è stato utilizzato *A. rhizogenes*. I valori indicati con lettere diverse differiscono statisticamente per $p \leq 0,05$.

Alla terza settimana dalla co-coltura non si rilevano differenze significative nell'interazione genotipo-agrobatterio sul valore percentuale per quanto riguarda il ceppo *wild* di *A. rhizogenes*. Inoltre, quest'ultimo è caratterizzato da un'efficienza maggiore nella produzione di espianti esprimenti GFP rispetto al ceppo *EHA101* di *A. tumefaciens*, pari rispettivamente al 92% di espianti esprimenti GFP nel caso di Kober 5BB e al 83,7% per Lambrusco Salamino,

presumendo quindi una maggiore capacità infettiva e di trasformazione rispetto all'altro ceppo. Inoltre, dallo screening effettuato allo stereoscopio le sezioni infettate con *A. rhizogenes* mostravano calli parenchimatici esprimenti GFP più consistenti (figura 4.2) che nel caso delle sezioni infettate con il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens*, in cui solo piccole porzioni del tessuto meristemático presentavano fluorescenza significativa.

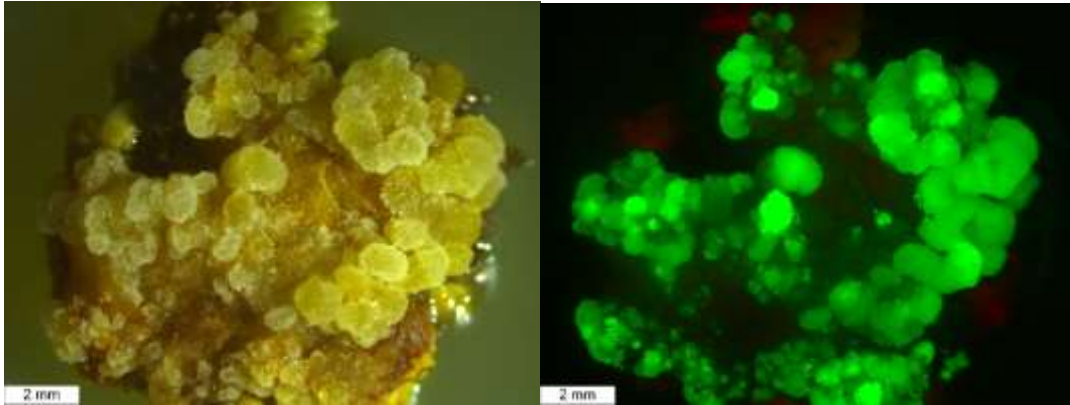


Figura 4.2 Petri 6 bulk 1 di Lambrusco Salamino infettato con *A. rhizogenes* al controllo di 3 settimane: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 0,8 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 0,8 x. Si notano consistenti calli esprimenti GFP.

Fin dall'inizio *A. rhizogenes* ha mostrato una maggiore capacità infettiva: nello screening effettuato alla fine della co-coltura le sezioni di entrambi i genotipi infettate con *A. rhizogenes* mostravano fluorescenza, mentre nel caso del ceppo EHA101 soltanto le sezioni di Lambrusco Salamino mostravano fluorescenza, presumendo una possibile influenza nell'interazione genotipo-agrobatterio, vista anche a 3 settimane dalla co-coltura con il dato relativo al valore percentuale di espianti esprimenti GFP pari al 42,2% per Kober 5BB e al 60% per Lambrusco Salamino. Si ipotizza quindi che questo vitigno abbia una maggiore suscettibilità all'infezione del ceppo EHA101 di *A. tumefaciens*.

Alla dodicesima settimana dalla co-coltura si rileva una riduzione della % di espianti esprimenti GFP per entrambi i ceppi, ma in modo particolare per il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* di cui si registrano valori del 8% per Kober 5BB e del 7% per Lambrusco Salamino. Rispetto all'interazione genotipo-agrobatterio, i risultati migliori si riscontrano nella combinazione Lambrusco Salamino infettato con il ceppo *wild* di *A. rhizogenes* (figura 4.3), che si conferma ulteriormente il ceppo predisposto meglio alla trasformazione genetica dei genotipi in esame. Bisogna considerare però che alla nona settimana si è diffusa una cospicua contaminazione batterica nelle sezioni infettate con entrambi i ceppi, portando a necrosi diffuse (figura 4.4) e a una maggiore perdita soprattutto delle sezioni infettate con il

ceppo EHA101 di *A. tumefaciens*, ormai inutilizzabili, portando a una riduzione significativa dell'efficienza di trasformazione.

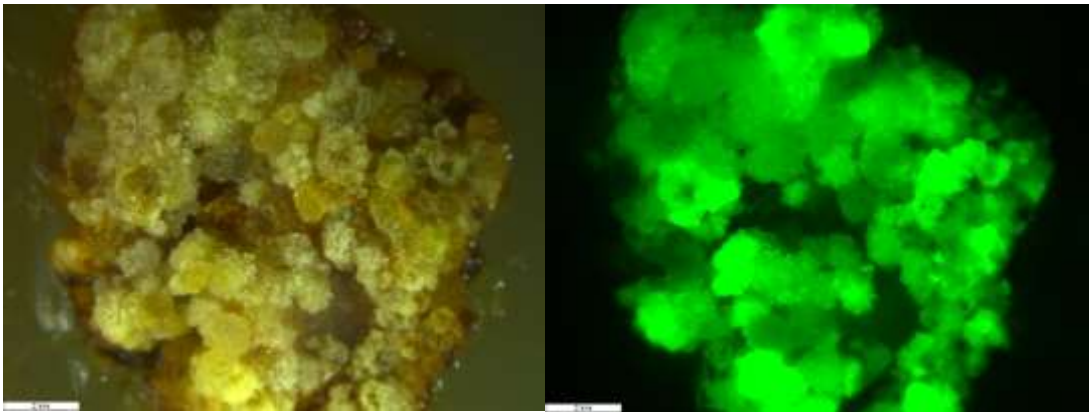


Figura 4.3 Petri 6 bulk 1 di Lambrusco Salamino infettato con *A. rhizogenes* al controllo di 12 settimane: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 0,8 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 0,8 x. Si rilevano ancora buoni consistenti calli esperimenti GFP.

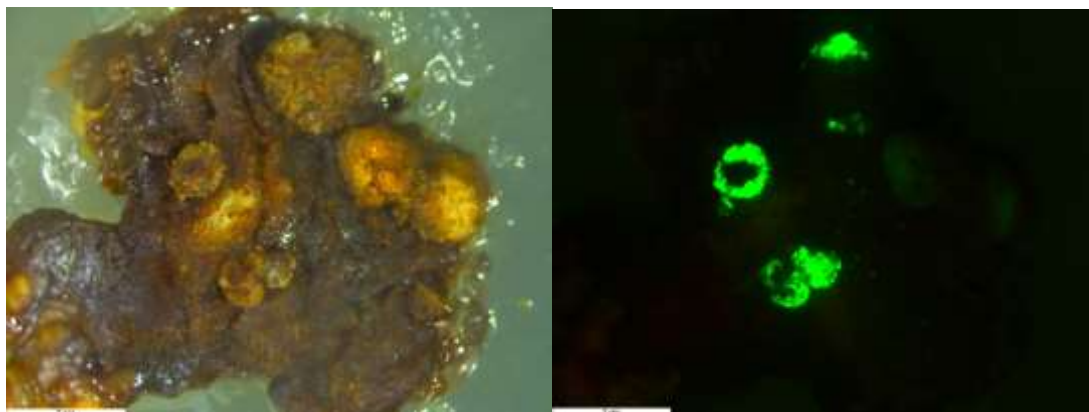


Figura 4.4 Petri 12 bulk 1 di Kober 5BB infettato con EHA101 *A. tumefaciens* al controllo di 12 settimane: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 1 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 1 x. Si rilevano varie aree necrotiche.

Per quanto riguarda l'efficienza di rigenerazione di germogli putativamente fluorescenti e quindi trasformati, questa è stata completamente nulla per tutte e quattro le combinazioni genotipo-agrobatterio. Non è stato ottenuto alcun germoglio avventizio che mostrasse fluorescenza, ma solo importanti masse di callo che si sono mostrate più consistenti nel caso degli espianti infettati con il ceppo *wild* di *A. rhizogenes*. È vero che in certi casi, sottoponendo il callo a determinati trattamenti ormonali, è possibile la rigenerazione dal tessuto calloso di

germogli per morfogenesi indiretta, però questa proprietà si perde con l'invecchiamento del tessuto, che diventa friabile e perde la capacità di differenziare tessuti vegetativi sviluppando solo grandi cellule parenchimatiche. Il ceppo di *A. rhizogenes* 'wild type' mostra avere quindi anche una maggiore influenza sul processo di rigenerazione dei tessuti vegetali, rispetto al ceppo EHA101 di *A. tumefaciens*. Un risultato interessante è stato quello della comparsa di 3 radici alla sesta settimana dalla co-coltura, tutte esprimenti fluorescenza (figure 4.5 e 4.6).

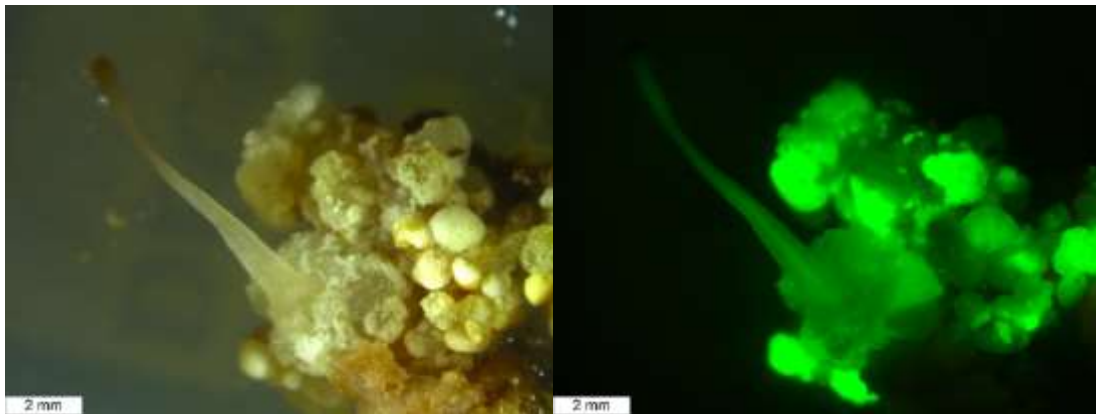


Figura 4.5 Petri 4 bulk 3 di Kober 5BB infettato con *A. rhizogenes* al controllo di 6 settimane: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 1 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 1 x. Si nota la radice esprimente GFP sviluppatasi dai tessuti meristemati.

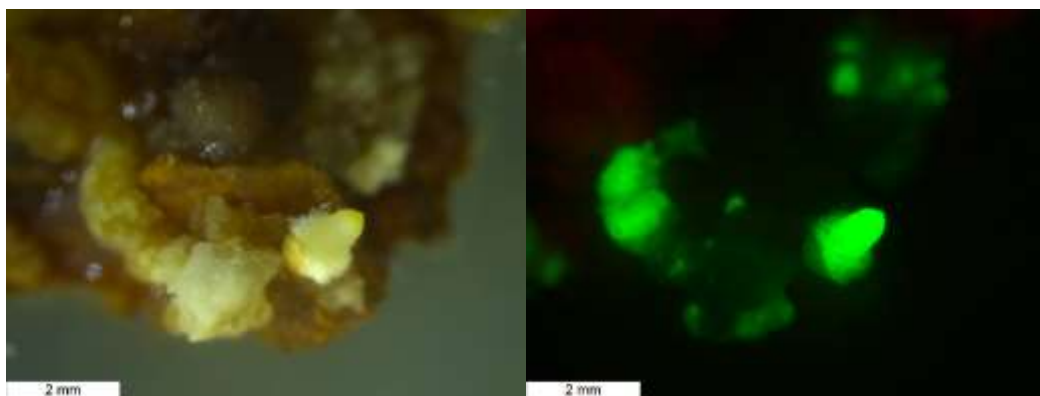


Figura 4.6 Petri 19 bulk 5 di Kober 5BB infettato con *A. rhizogenes* al controllo di 6 settimane: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 1,25 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 1,25 x. Si nota la piccola radice esprimente fluorescenza.

Per comprendere il comportamento di questo ceppo bisogna conoscere le caratteristiche che contraddistinguono *A. rhizogenes*. Si tratta di un batterio gram-negativo che infetta le piante seguendo lo stesso meccanismo infettivo di *A. tumefaciens* con la sostanziale differenza che

infetta l'apparato radicale e porta alla formazione e alla crescita incontrollata di radici sottili e filamentose, denominate *hairy roots*. Il gruppo di *A. rhizogenes* comprende due tipologie di ceppi che sono distinti in base al tipo di opine che sintetizzano, i cui geni sono portati dal T-DNA del plasmide Ri: i ceppi che producono l'agrocinopina e tutte le tipologie di agropine, chiamati ceppi di tipo agropinico, e i ceppi che producono l'agrocinopina e tutte le agropine esclusa l'agropina stessa, chiamati ceppi di tipo mannopinico. Mentre il plasmide Ri dei ceppi di tipo mannopinico presenta un unico T-DNA omologo a quello del plasmide Ti, quello dei ceppi di tipo agropinico presenta due T-DNA, il TR-DNA (right T-DNA) e il TL-DNA (left T-DNA), separati da una regione di 15 kb che non viene integrato al momento dell'infezione. Il TR-DNA è omologo al T-DNA del plasmide Ti e contiene i geni *ags* coinvolti nella sintesi delle opine e i geni *tms1*, *tms2* e *tmr* coinvolti nella tumorigenesi, che stimolano la produzione di auxine e citochinine (White, et al., 1985). Il TL-DNA contiene i geni *rol A*, *B*, *C* e *D* e i geni per la sintesi di citochinine che contribuiscono ad alterare il metabolismo ormonale delle cellule infettate. L'espressione congiunta dei geni *rol A*, *B* e *C* promuove lo sviluppo delle radici e di altre alterazioni fenotipiche e causa un importante sbilancio ormonale. Alcuni studi hanno dimostrato che il gene *rol B* anche da solo riesce ad indurre la rizogenesi, a differenza dei geni *rol A* e *rol C* che combinati con il gene *rol B* potenziano il processo (Schmulling, et al., 1988). Tra le alterazioni fenotipiche possibili, riscontrate in piante rigenerate contenenti il T-DNA del plasmide Ri, è possibile rilevare lo sviluppo di foglie rugose, accorciamento degli internodi, perdita della dominanza apicale, maggiore sviluppo di radici laterali ed eterostilia (Sinkar, et al., 1987).

Considerando le caratteristiche del plasmide Ri, lo sviluppo dai tessuti meristemati delle 3 radici transgeniche, di cui 2 nel genotipo Kober 5BB e 1 nel genotipo Lambrusco Salamino, conferma che il ceppo di *A. rhizogenes* utilizzato sia di tipo 'wild type' e non disarmato. Rispetto all'efficienza di rigenerazione, bisogna considerare che solitamente le piante rigenerate da tessuti trasformati con *A. rhizogenes* mostrano un fenotipo anormale, associato all'espressione dei geni *rol* del T-DNA che causano un forte squilibrio ormonale a favore delle auxine, tale da sviluppare consistenti calli GFP ma non lo sviluppo di germogli (Sinkar, et al., 1987). Inoltre, attualmente non è ancora stato sviluppato un protocollo di rigenerazione su vite partendo da una radice, per cui le 3 radici transgeniche ottenute risultano essere inutili per raggiungere lo scopo di questo lavoro di tesi. Però sicuramente questo ceppo di *A. rhizogenes* ha un potenziale interessante da sfruttare per l'ottenimento di piante di vite transgeniche seguendo il protocollo utilizzato, soprattutto nel caso di genotipi che si mostrano recalcitranti quando trasformati con *A. tumefaciens*. Si dovrebbe quindi intervenire sul plasmide Ri per

disarmarlo correttamente, così da eliminare i geni coinvolti nello squilibrio ormonale e nello sviluppo delle radici, e verificare se l'efficienza di trasformazione osservata su Kober 5BB e su Lambrusco Salamino rimanga inalterata e superiore rispetto al ceppo EHA101 di *A. tumefaciens*. Infatti, nella trasformazione genetica mediata dal ceppo EHA101 sia Kober 5BB che Lambrusco Salamino si sono dimostrati abbastanza recalcitranti: la combinazione genotipo-agrobatterio non ha dato risultati interessanti, rilevando per entrambi i genotipi un discreto sviluppo di espianti esprimenti fluorescenza e quindi trasformati e una rigenerazione che si è fermata alla produzione dei soli calli esprimenti GFP ma non allo sviluppo di germogli che potrebbero rappresentare linee putativamente transgeniche. La conferma della maggiore efficienza di trasformazione di *A. rhizogenes* per questi e altri vitigni risulterebbe di notevole importanza per facilitare l'applicazione delle tecniche di DNA ricombinante (transgenesi, cisgenesi, gene editing) in vite per il trasferimento/silenziamento/delezione di geni di interesse per migliorare importanti caratteristiche agronomiche in questa specie.

4.2 Prima prova di trasformazione genetica per organogenesi mediata da *A. tumefaciens* EHA101 sul genotipo modello Thompson Seedless

Nella precedente prova si è visto che il ceppo di tipo *wild* di *A. rhizogenes* ha una maggiore efficienza di trasformazione rispetto al ceppo EHA101 di *A. tumefaciens*, però non essendo stato opportunamente disarmato non si è riuscito ad isolare germogli putativamente trasformati. La stessa prova utilizzando il ceppo di *A. rhizogenes* è stata realizzata come anche sul genotipo Thompson Seedless, considerato come genotipo modello dati gli ottimi risultati raggiunti in precedenti sperimentazioni, in cui ha mostrato di avere tra i vari genotipi di vite la migliore risposta alla trasformazione genetica e un'ottima capacità rigenerativa (Stamp, et al., 1990; Franks, et al., 1998; Mezzetti, et al., 2002; Capriotti, 2017; Sabbadini, et al., 2019). Sono stati ottenuti alcuni germogli transgenici da cui però non si è riuscito a sviluppare alcuna pianta a causa della forte alterazione pleiotropica probabilmente indotta dallo scompenso ormonale determinato dagli effetti dei geni *rol* presenti nel plasmide '*wild type*' di questo ceppo (dati non riportati). Di conseguenza, con l'intento di validare la capacità del costrutto Pv-DCL441 hpRNA, caricato sul EHA101 di *A. tumefaciens*, di conferire in vite la resistenza a *P. viticola* attraverso il meccanismo di silenziamento genico, si è applicato il protocollo di trasformazione utilizzando come genotipo Thompson Seedless. È stato utilizzato il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* perché già disponibile caricato con il costrutto 441 e la cultivar Thompson seedless perché già nota per una maggiore suscettibilità anche a questo ceppo. L'obiettivo è stato quello di avere subito una pianta modificata con questo costrutto così da

verificare subito l'efficacia dell'espressione in pianta di dsRNAs target per geni *DCL* di *P. viticola* nel controllo stabile del patogeno. Da questo risultato poi dipenderà il trasferimento dello stesso costrutto anche nel ceppo di *A. rhizogenes* così da conferire resistenza a *P. viticola* anche in altri vitigni di elevato interesse per la viticoltura nazionale.

Quindi, nella seconda prova di trasformazione sono state infettate con il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* 155 sezioni di tessuto meristemato di Thompson Seedless, utilizzando lo stesso costrutto genico della precedente prova e lo stesso procedimento. Il substrato di rigenerazione e selezione utilizzato è stato l'MS BA3 NAA 0,02 contenente 200 mg/L di carbenicillina, 200 mg/L di cefotaxime e 50 mg/L di kanamicina. In questo caso si è valutata l'evoluzione nel tempo della percentuale di espianti esprimenti fluorescenza sul totale degli espianti infettati, con la valutazione dei dati raccolti a 3, 6, 9 e 12 settimane, ottenendo i valori riportati nella tabella 4.2.

Tabella 4.2 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti infettati del genotipo Thompson Seedless con il ceppo EHA101, rilevata a diverse settimane dalla co-coltura

Thompson Seedless-EHA101-Pv-DCL441 hpRNA	
N° settimane post co-coltura	% espianti esprimenti GFP/espianti totali
3	72
6	64
9	21
12	17

Attraverso il test statistico Student-Newman-Keuls (SNK) si è rilevata una differenza statisticamente significativa tra il valore percentuale di espianti esprimenti GFP sul totale degli espianti infettati di Thompson Seedless alla terza settimana e quello alla dodicesima settimana, come indicato nel grafico 4.2.

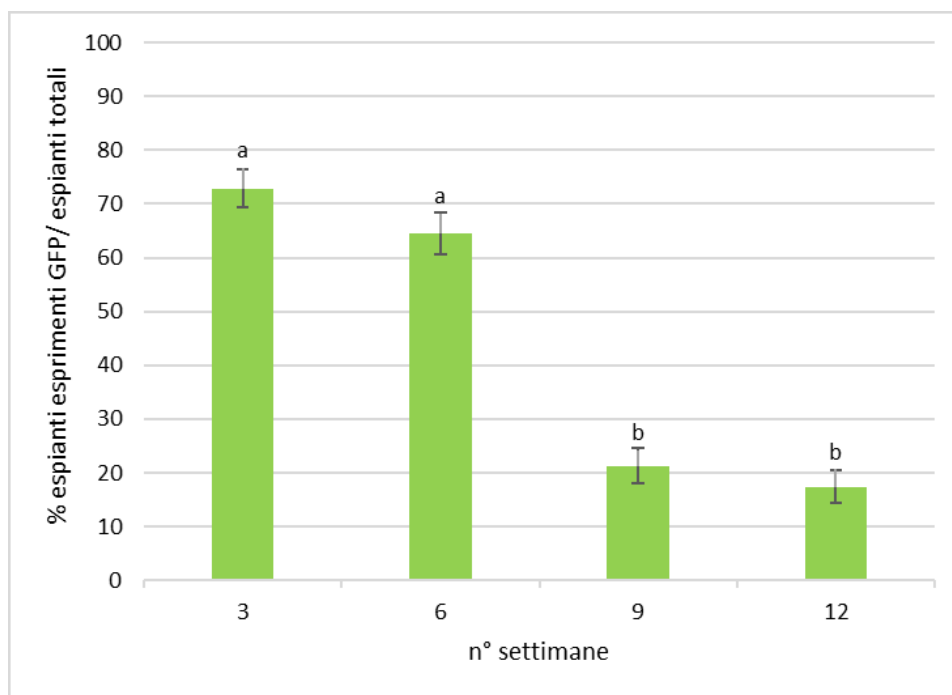


Grafico 4.2 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti di Thompson Seedless infettati con il ceppo EHA101. Si rilevano differenze significative tra i valori ottenuti alla terza e alla dodicesima settimana.

È ovviamente normale riscontrare un calo della percentuale di espianti esprimenti GFP, considerando anche l'azione selettiva della kanamicina. In post co-coltura si nota una buona suscettibilità al batterio utilizzato nella prova di trasformazione (figura 4.7), confermata con lo screening degli espianti esprimenti GFP alla terza settimana. In aggiunta si riscontra un'ottima capacità rigenerativa del genotipo, con la formazione di differenti calli esprimenti fluorescenza e la comparsa dei primi germogli putativamente trasformati già dopo 3 settimane dall'agroinfezione, di cui uno putativamente transgenico, ottenuto dalla Petri 9 bulk 2 (figura 4.8), e 2 espianti chimerici, ottenuti dalle Petri 2 bulk 1 e Petri 23 bulk 3 (figura 4.9). Lo sviluppo dei germogli chimerici è dovuto al fatto che solitamente gli eventi di rigenerazione nel caso dell'organogenesi non hanno origine da una singola cellula ma da un certo numero di cellule iniziali, per cui è normale lo sviluppo di germogli avventizi chimerici, da cui difficilmente si riescono ad ottenere linee transgeniche stabili ed omogenee (Sabbadini, et al., 2015).

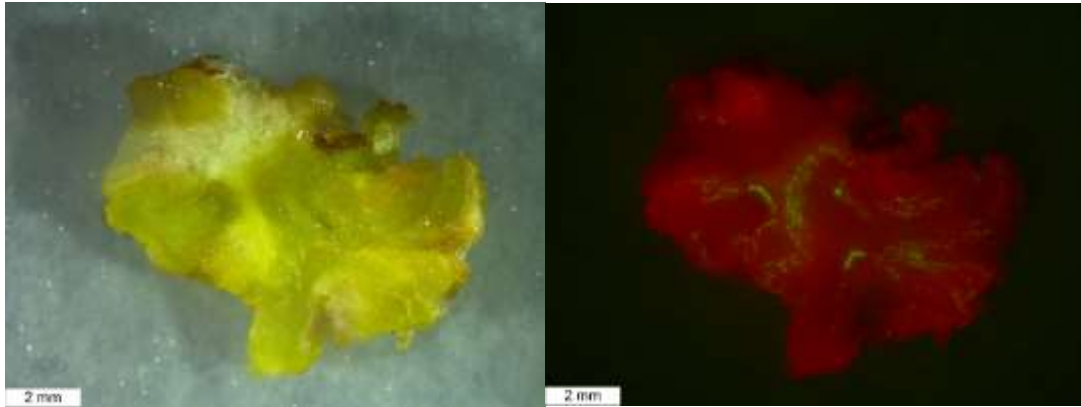


Figura 4.7 Sezione meristemica di Thompson Seedless infettata con il ceppo EHA101 A. tumefaciens visualizzata allo stereoscopio ad un ingrandimento di 0,8 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra), in post co-cultura. Si nota una buona suscettibilità al batterio utilizzato nella prova di trasformazione.

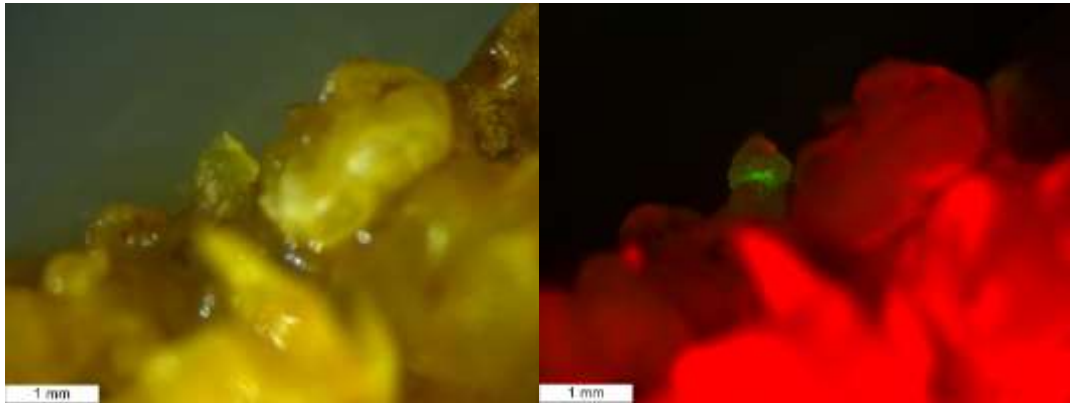


Figura 4.8 Germoglio putativamente transgenico di Thompson Seedless ottenuto dalla Petri 9 bulk 2, visualizzato alla terza settimana dalla co-cultura ad un ingrandimento di 2 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra).

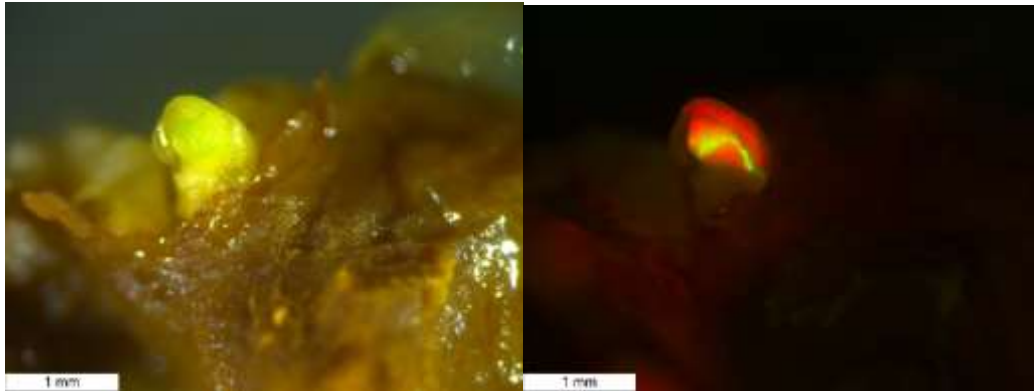


Figura 4.9 Espianto chimerico di Thompson Seedless individuato nella Petri 23 bulk 3 alla terza settimana dalla co-coltura: a sinistra foto ottenuta sotto luce bianca ad un ingrandimento di 2 x; a destra foto ottenuta applicando il filtro GFP sotto luce UV ad un ingrandimento di 2 x.

Alla sesta settimana il germoglio chimerico 2.1 è degenerato per l'incapacità di svilupparsi in modo completo in presenza dell'agente selettivo. Il germoglio identificato come 9.2 si è leggermente ingrossato ma mostra necrosi (figura 4.10) mentre il 23.3 che era stato considerato precedentemente chimerico ha selezionato cellule più competenti alla divisione e al differenziamento mostrando quindi un fenotipo GFP più marcato. Si è rilevato poi un nuovo germoglio, identificato nella Petri 3 bulk 1, anche questo con un accrescimento a fenotipo GFP molto marcato. Questo lavoro alla sesta settimana ha portato all'identificazione di 3 linee indipendenti putativamente modificate con il costrutto Pv-DCL441 hpRNA.



Figura 4.10 Il germoglio putativamente transgenico 9.2 di Thompson Seedless, visualizzato alla sesta settimana dalla co-coltura ad un ingrandimento di 2 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra), mostra necrosi.

Alla nona settimana la presenza di fenotipi GFP chimerici ha subito una forte riduzione determinata dalla forte pressione selettiva determinata dalla continua selezione in presenza di

elevate concentrazioni dell'agente selettivo (kanamicina 50 mg/L). Ciò ha determinato l'aumento della necrosi dei tessuti e anche la perdita dei germogli identificati nel rilievo precedente come putativi transgenici, questo per la loro sicura origine chimerica non ancora in grado di stabilizzarsi in favore delle linee cellulari modificate (resistenti al fattore selettivo) rispetto a quelle non modificate. Da altri tessuti (Petri 25 bulk 5) è però emerso un nuovo germoglietto che è stato selezionato e isolato in una nuova subcoltura utilizzando lo stesso substrato per favorire la proliferazione e lo sviluppo delle sole cellule trasformate non chimeriche.

Alla dodicesima settimana gli espianti rimasti hanno mostrato ancora consistenti calli fluorescenti, confermando la capacità di Thompson Seedless di produrre linee cellulari trasformate ma non sempre facili da rigenerare. Il germoglio chimerico 25.5 ha mantenuto la fluorescenza e mostrato un lieve sviluppo (figura 4.11).

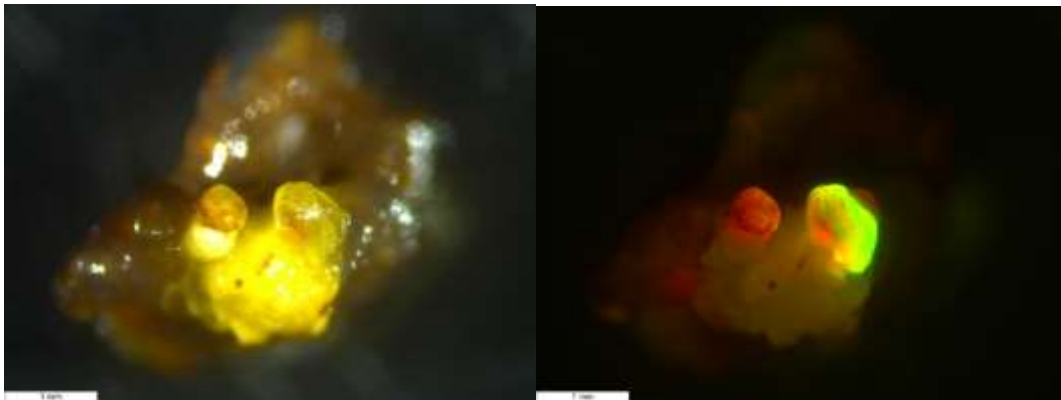


Figura 4.11 Germoglio putativamente transgenico di Thompson Seedless ottenuto dalla Petri 25 bulk 5, in selezione su substrato MS BA3 NAA 0,02 CEF-CARB 200 KAN 50, visualizzato allo stereoscopio alla dodicesima settimana ad un ingrandimento di 2 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra).

Il germoglio chimerico 25.5 è stato poi trasferito in una nuova subcoltura contenente il substrato MS BA 0,25 mg/L, privo di antibiotici, per favorire il processo di allungamento e continuare la proliferazione. Purtroppo il germoglio non è riuscito a svilupparsi, probabilmente a causa del chimerismo, mostrando già alla settimana successiva necrosi nella parte basale (figura 4.12).

Al termine di questa prova sono stati ottenuti solo alcuni calli fluorescenti che non hanno rigenerato e non si è riusciti a selezionare e stabilizzare tutti i germogli identificati come chimerici.

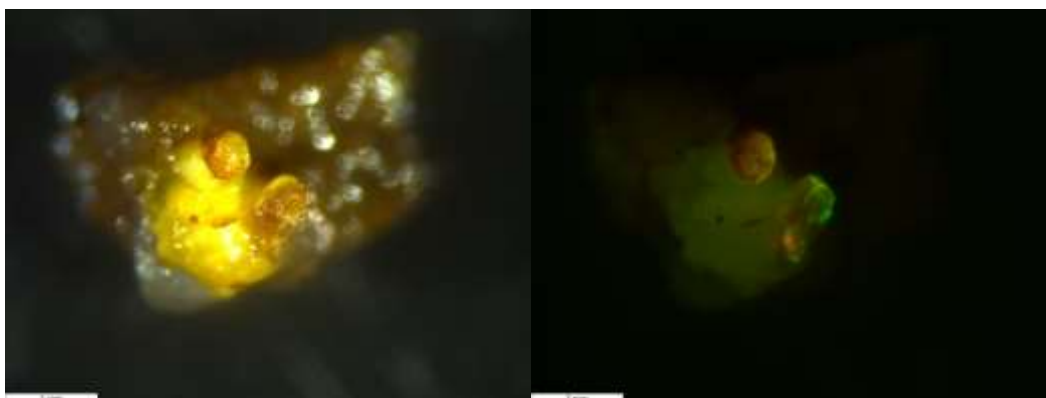


Figura 4.12 Il germoglio putativamente transgenico 25.5 di *Thompson Seedless* su substrato MS BA 0,25 mg/L per la proliferazione, visualizzato ad un ingrandimento di 2 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra), ha sviluppato necrosi nella parte basale.

4.3 Seconda prova di trasformazione genetica per organogenesi mediata da *A. tumefaciens* EHA101 sul genotipo modello *Thompson Seedless*

La seconda prova di trasformazione effettuata con *Thompson Seedless* è stata impostata come la precedente, utilizzando stavolta entrambi i costrutti genici disponibili, entrambi caricati sul ceppo EHA101 di *A. tumefaciens*, per indurre resistenza a *P. viticola* in vite mediante il meccanismo di silenziamento genico. I ceppi di EHA101 di *A. tumefaciens* caricati con il costrutto 441 (Pv-DCL441 hpRNA) e con il costrutto chimera (Pv-DCL441+DCL331 hpRNA) sono stati utilizzati per infettare 200 sezioni di tessuto meristemato di *Thompson Seedless*, 100 per ciascun ceppo. Con l'obiettivo di aumentare l'efficienza di trasformazione è stato modificato il protocollo di selezione aumentando la concentrazione dell'agente selettivo, la kanamicina, a 70 mg/L fin dalla prima subcoltura.

Da questo esperimento sono stati ottenuti risultati interessanti evidenziati già a 3 e confermati a 12 settimane degli espianti in selezione (tabella 4.3).

Tabella 4.3 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti infettati del genotipo *Thompson Seedless* con il ceppo EHA101, distinti secondo il costrutto integrato, rilevata a 3 e a 12 settimane dalla co-coltura.

Costrutto genico integrato	% espianti esprimenti GFP/espianti totali	
	3 settimane	12 settimane
Costrutto 441 – EHA101	98	46
Costrutto chimera – EHA101	100	44

In questa prova di trasformazione si rileva alla terza settimana un'elevata frequenza di espianti esprimenti GFP dai tessuti delle sezioni infettate con il ceppo batterico EHA101 di *A. tumefaciens* contenente il plasmide pK7GWIWG2-7F2,1 modificato con i due costrutti di silenziamento genico. Tale valore percentuale si riduce normalmente nel tempo, mantenendo comunque valori ottimali anche alla dodicesima settimana. Il test statistico Student-Newman-Keuls (SNK) mostra anche in questo caso una differenza statisticamente significativa alla terza settimana e quella alla dodicesima settimana, come indicato nel grafico 4.3.

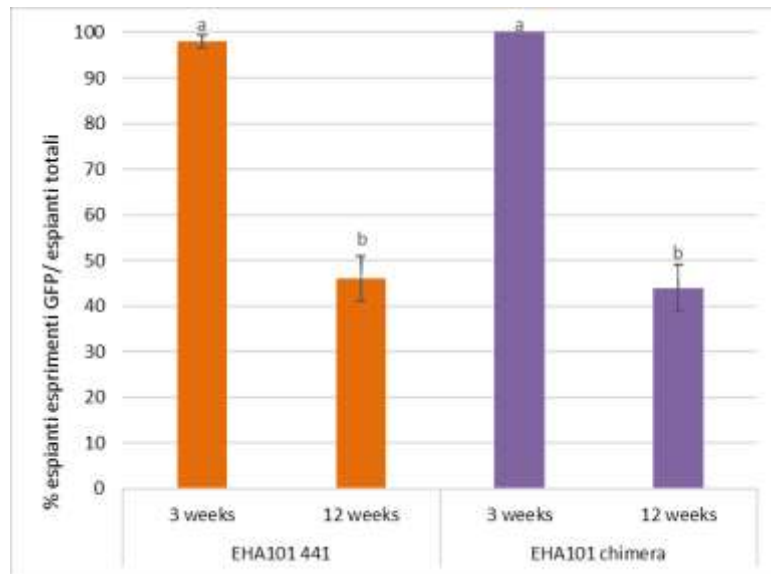


Grafico 4.3 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti di Thompson Seedless infettati con il ceppo EHA101. Si rilevano differenze significative tra i valori ottenuti alla terza e alla dodicesima settimana sia nel caso in cui sia stato integrato il costrutto 441 (in arancione) sia nel caso in cui sia stato integrato il costrutto chimera (in viola).

Considerando sempre la percentuale di espianti esprimenti GFP, non si osservano differenze significative nei risultati ottenuti utilizzando i due diversi costrutti genici, per cui è possibile affermare che il tipo di costrutto genico introdotto nel plasmide non influenza in alcun modo la risposta di trasformazione (grafico 4.4).

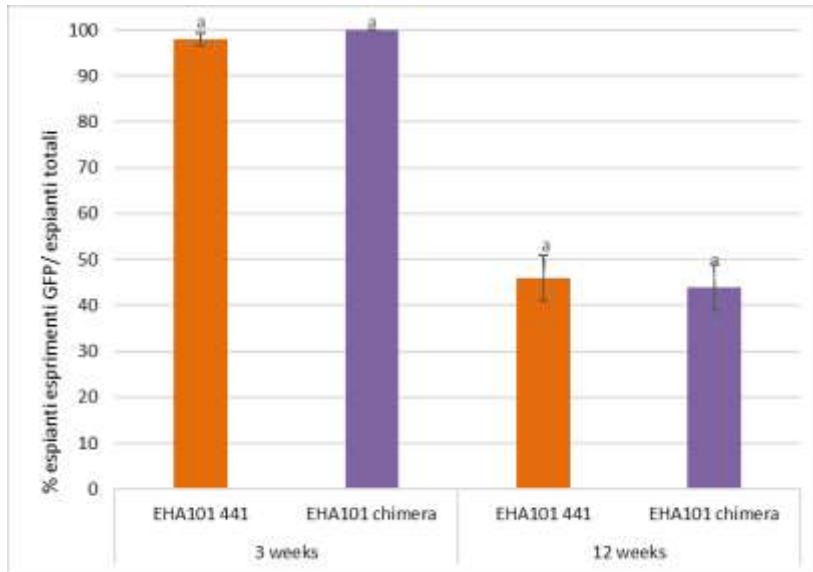


Grafico 4.4 Percentuale espianti esprimenti GFP su totale espianti di Thompson Seedless infettati con il ceppo EHA101. Non si rilevano differenze significative rispetto ai due costrutti genici utilizzati (441 in arancione, chimera in viola).

Rispetto alla capacità rigenerativa, si conferma l'ottima attitudine che caratterizza il genotipo Thompson Seedless fin dalla fase successiva alla co-coltura, in cui si rileva già la presenza di alcuni germoglietti però non ancora esprimenti fluorescenza.

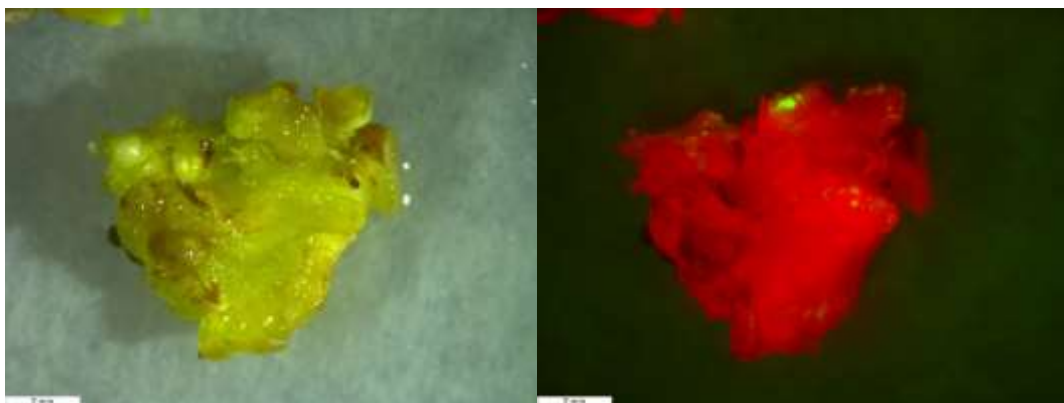


Figura 4.13 Sezione meristemica di Thompson Seedless infettata con il ceppo EHA101 caricato con il costrutto chimera, visualizzata allo stereoscopio ad un ingrandimento di 0,8 x in post co-coltura, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra). Si notano alcuni germoglietti non ancora fluorescenti.

I primi germogli esprimenti GFP trasformati sono stati selezionati e isolati alla sesta settimana dall'agroinfezione. In particolare ne sono comparsi 3 nelle sezioni infettate con l'agrobatterio

contenente il costrutto 441, ottenuti dalle Petri 16 bulk 1 (figura 4.14), Petri 6 bulk 4 e Petri 20 bulk 4 (figura 4.16), e altri 3 dalle sezioni infettate con il ceppo batterico in cui è stato integrato il costrutto chimera, ottenuti dalle Petri 12 bulk 2 (figura 4.15), Petri 14 bulk 3 e Petri 18 bulk 2, trasferiti sullo stesso substrato per favorirne la proliferazione.

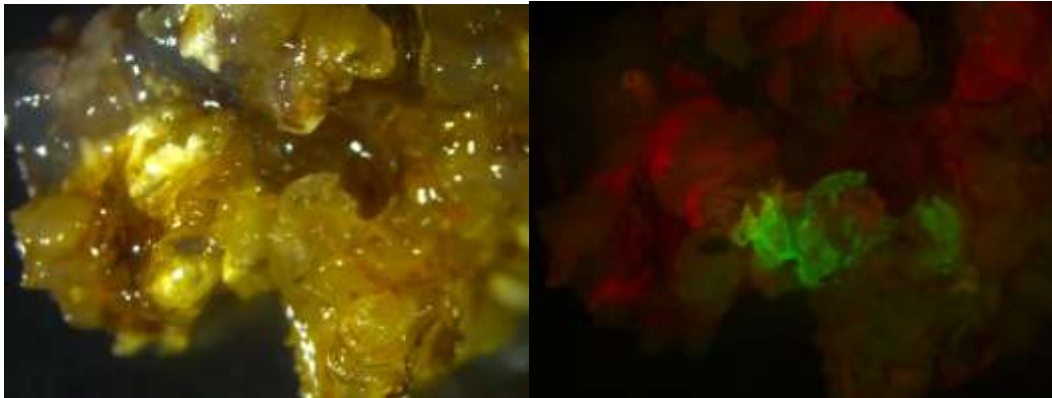


Figura 4.14 Germoglio putativamente transgenico di Thompson Seedless contenente il costrutto 441 ottenuto dalla Petri 16 bulk 1, visualizzato alla sesta settimana dalla co-coltura ad un ingrandimento di 0,8 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra).

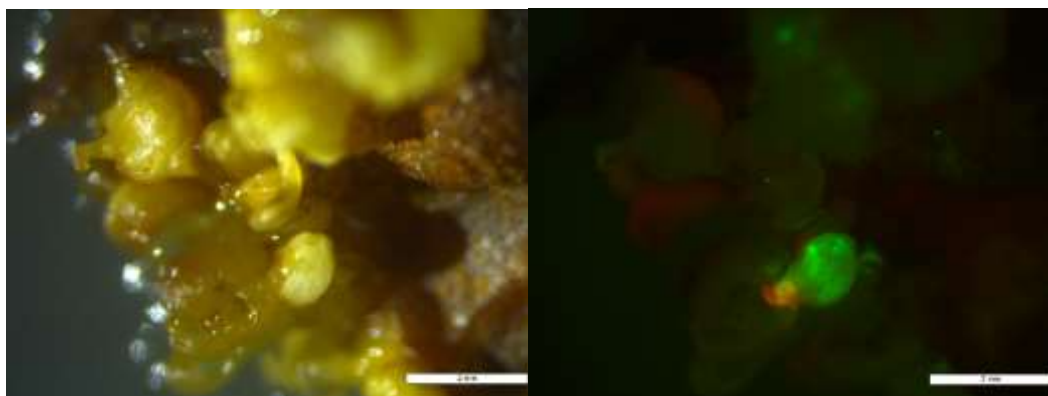


Figura 4.15 Germoglio putativamente transgenico di Thompson Seedless contenente il costrutto chimera ottenuto dalla Petri 12 bulk 2, visualizzato alla nona settimana dalla co-coltura ad un ingrandimento di 1 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra).

Sono state quindi ottenute sei linee putativamente transgeniche, di cui 3 portanti il costrutto 441 e 3 il costrutto chimera, confermando la qualità del genotipo Thompson seedless rispetto alla predisposizione alla trasformazione e alla rigenerazione.

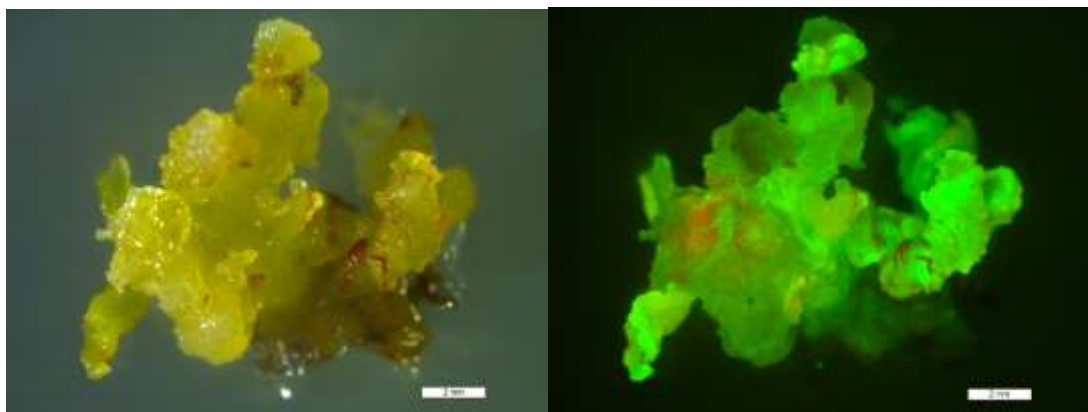


Figura 4.16 Germoglio putativamente transgenico di Thompson Seedless contenente il costrutto 441 ottenuto dalla Petri 20 bulk 4, visualizzato alla quindicesima settimana dalla co-coltura ad un ingrandimento di 0,8 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra).

4.4 Prova di rigenerazione per embriogenesi somatica da fiore intero

L'embriogenesi somatica è potenzialmente il metodo di clonazione in vitro più rapido ed efficiente (Barcaccia & Falcinelli, 2011). Diversi sono i protocolli di rigenerazione per embriogenesi somatica applicati a genotipi di vite in cui sono stati utilizzati organi vegetali differenti come materiale di partenza, come embrioni zigotici, foglie, antere, ovari, segmenti nodali, stami e pistilli. Solitamente si è visto che la maggior parte dei genotipi risponde meglio all'embriogenesi somatica quando si usano come materiale di partenza antere e pistilli (Dhekney, et al., 2016). In questo lavoro di tesi si è deciso di verificare l'efficienza di un protocollo in cui si utilizza come espianto di partenza il fiore intero realizzando una prova di rigenerazione per embriogenesi somatica applicata a due genotipi di vite, le cultivar Lambrusco Salamino e Ancellotta.

Il protocollo è stato applicato su 400 fiori interi di Lambrusco Salamino e 180 fiori interi di Ancellotta, valutando l'efficienza del singolo fiore a sviluppare calli pre-embriogenici da cui si svilupperanno gli embrioni somatici.

I fiori interi, trasferiti e mantenuti per 4 settimane sul substrato MS1 contenente 1 mg/L di BA e 1 mg/L di 2,4-D, hanno sviluppato calli pre-embriogenici (figura 4.17) sia in Lambrusco Salamino che in Ancellotta (tabella 4.4).

Tabella 4.4 Efficienza per calli pre-embriogenici ottenuti da fiori interi di Lambrusco Salamino e Ancellotta

Embriogenesi somatica da fiore intero di Lambrusco Salamino e Ancellotta			
Genotipo	N° totale espianti (fiore intero)	N° calli pre-embriogenici	Efficienza per calli pre-embriogenici (%)
Lambrusco Salamino	400	22	5,5
Ancellotta	180	12	6,7

Si rileva una leggera maggiore efficienza da parte del genotipo Ancellotta nel produrre calli pre-embriogenici rispetto a Lambrusco Salamino. Sicuramente si sarebbe dovuto approfondire il tema dell'efficienza di rigenerazione per embriogenesi somatica attraverso ulteriori prove utilizzando altri materiali vegetali come espanti di partenza, ad esempio antere o pistilli, per valutare se l'uso del fiore intero come espanto di partenza sia effettivamente maggiormente vantaggioso rispetto all'uso di antere o pistilli, che come da bibliografia risultano tra i più efficienti per la produzione di embrioni somatici.

I calli pre-embriogenici sono stati poi messi a proliferare sul substrato X6 privo di sostanze ormonali. Qui gli embrioni si sviluppano secondo il modello indicato nel paragrafo 1.2.2 assumendo gli stadi globulare (figura 4.17), a cuore (figura 4.17), a torpedo e cotiledonare (figura 4.18). In realtà, dai tessuti superficiali del callo pre-embriogenico si ha una proliferazione continua di embrioni somatici per cui è possibile rilevare contemporaneamente diverse strutture embrionali in vari stadi di sviluppo.

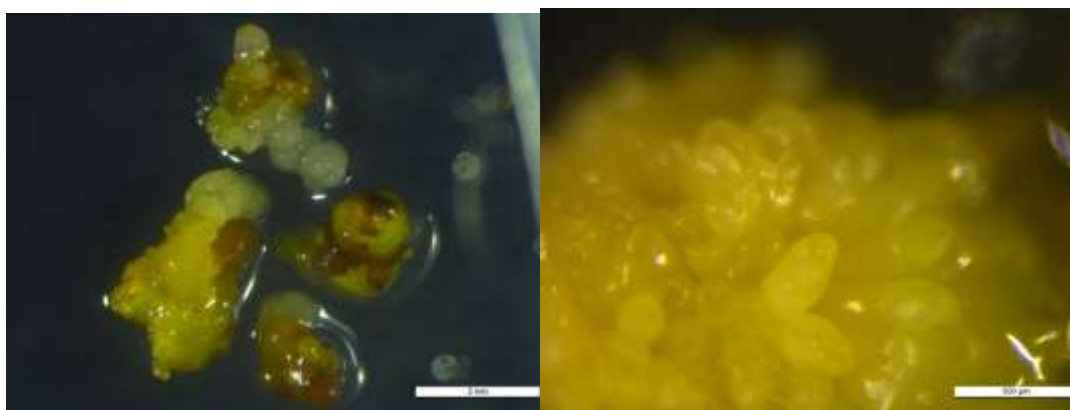


Figura 4.17 A sinistra callo pre-embriogenico e primi embrioni somatici allo stadio globulare, a destra embrioni somatici allo stadio a cuore, ottenuto da fiore intero di Lambrusco Salamino.



Figura 4.18 Embriogenesi somatica da fiore intero di Lambrusco Salamino. Si nota la contemporanea presenza di embrioni somatici allo stadio a torpedo e cotiledonare.

4.5 Prova di trasformazione genetica per embriogenesi somatica mediata da *A. tumefaciens* EHA101 su Ancellotta

Dalla prova di rigenerazione per embriogenesi somatica sono stati ottenuti embrioni somatici sia per Lambrusco Salamino che per Ancellotta, per cui si è deciso di applicare il protocollo di trasformazione genetica per embriogenesi somatica (Dhekney, et al., 2016) su entrambi i genotipi.

Lambrusco Salamino nella precedente prova ha mostrato una buona efficienza per la rigenerazione di embrioni somatici, non correlata però ad una predisposizione alla trasformazione genetica per embriogenesi somatica, almeno quando mediata dal ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* (dati non riportati). Invece, come dimostrato dalla prima prova di trasformazione genetica di questo lavoro di tesi, nel caso in cui si applichi il protocollo di trasformazione genetica per organogenesi, come genotipo ha dimostrato di essere leggermente recalcitrante nel caso in cui si è utilizzato il ceppo EHA101, mentre ha dimostrato una buona predisposizione quando utilizzato il ceppo *wild* di *A. rhizogenes* nell'agroinfezione.

Anche Ancellotta ha mostrato una buona efficienza per la rigenerazione di embrioni somatici, per cui si applica il protocollo con l'intento di ottenere linee transgeniche dagli embrioni somatici ottenuti nella precedente prova di rigenerazione. Rispetto all'organogenesi, è stata effettuata una prova di trasformazione su sezioni meristematiche di Ancellotta in cui però l'efficienza di trasformazione si è mostrata quasi nulla fin dall'inizio, facendo presupporre che Ancellotta possa essere recalcitrante quando si applica quel tipo di protocollo (dati non riportati).

Nella quarta prova di trasformazione genetica sono stati infettati 100 embrioni somatici del genotipo Ancellotta con il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens*, contenente il costrutto chimera (Pv-DCL441+DCL331 hpRNA). A 72 ore dalla co-coltura è stato valutato il livello di trasformazione transiente, considerando quanti embrioni somatici, infettati allo stadio cotiledonare, esprimessero la fluorescenza sotto filtro GFP allo stereoscopio (figura 4.19). Su 100 embrioni somatici, 57 esprimevano fluorescenza, per un valore percentuale che indica l'efficienza di trasformazione transiente pari al 57%.



Figura 4.19 Embrione somatico di Ancellotta infettato con il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* contenente il costrutto chimera, visualizzato a 72 ore dalla co-coltura ad un ingrandimento di 2 x, sotto luce bianca (a sinistra) e sotto luce UV con filtro GFP (a destra). Si rileva un'ottima efficienza di trasformazione transiente.

La fase successiva alla co-coltura è quella del lavaggio degli embrioni per altre 72 ore in una soluzione rappresentata dal substrato DM liquido, contenente 200 mg/L di cefotaxime, 200 mg/L di carbenicillina e 15 mg/L di kanamicina. Superate le 72 ore, gli embrioni somatici sono stati trasferiti nelle Petri (25 per Petri) contenenti i substrati per l'induzione del callo embriogenico addizionati di 200 mg/L di cefotaxime, 200 mg/L di carbenicillina e 70 mg/L di kanamicina, introducendo a questo punto una variante rispetto al protocollo originale: 50

embrioni somatici sono stati trasferiti sul previsto DM solido, mentre i restanti 50 embrioni somatici sono stati trasferiti sul substrato E96 solido, utilizzato in un diverso protocollo di embriogenesi somatica (Maillot, et al., 2006). Le Petri sono state mantenute poi per 4 settimane in camera di crescita al buio per la proliferazione del callo embriogenico. Passate le 4 settimane, si è valutata l'efficienza di trasformazione (tabella 4.5).

Tabella 4.5 Efficienza di trasformazione a 4 settimane dalla co-coltura di embrioni somatici di Ancellotta con il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* contenente il costrutto chimera.

Substrato per la proliferazione di callo embriogenico	N° calli embriogenici esprimenti fluorescenza	Efficienza di trasformazione (%)
DM solido	30/50	60
E96 solido	32/50	64
Totale	62/100	62

L'efficienza di trasformazione rilevata rispetto a quanti calli embriogenici mostrassero fluorescenza mostra un valore leggermente superiore rispetto all'efficienza di trasformazione transiente, con una variazione del 3%. Riguardo l'uso dei due distinti substrati, non si rileva una grande differenza tra i due, assumendo quindi che il tipo di substrato utilizzato non influisca sull'efficienza di trasformazione ma solo sull'attività proliferativa. A tal proposito si è rilevata una maggiore proliferazione di callo embriogenico dagli embrioni somatici in DM solido (figura 4.20), rispetto a quelli in E96 dove la rigenerazione di callo GFP è stata quasi nulla (figura 4.21).

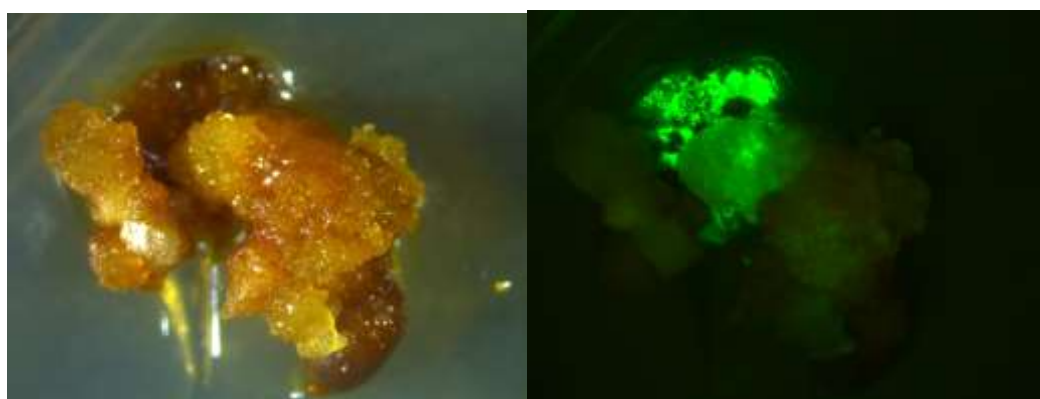
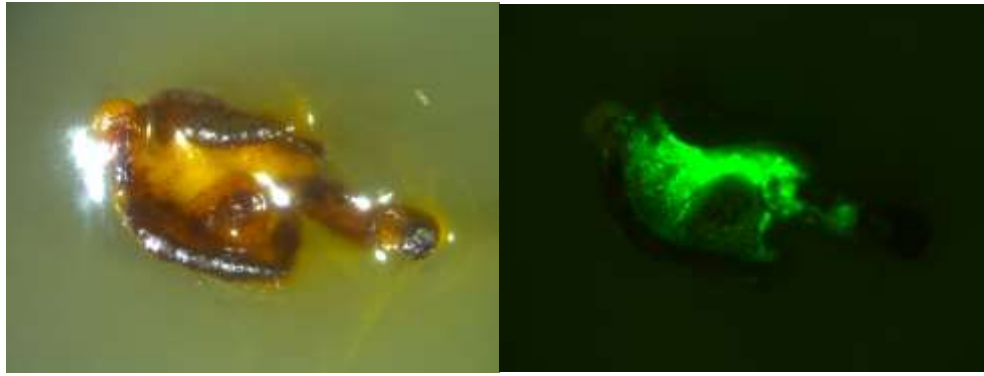


Figura 4.20 Callo embriogenico esprimente GFP su substrato DM solido, sviluppatosi dagli embrioni somatici di Ancellotta infettati con il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* dopo 4 settimane dall'inizio della subcultura. A sinistra visualizzato sotto luce bianca, a destra sotto luce UV con filtro GFP, ad un ingrandimento di 2 x.



*Figura 4.21 Callo embriogenico esprime GFP su substrato E96 solido, sviluppatosi dagli embrioni somatici di Ancellotta infettati con il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* dopo 4 settimane dall'inizio della subcultura. A sinistra visualizzato sotto luce bianca, a destra sotto luce UV con filtro GFP, ad un ingrandimento di 2 x.*

I calli embriogenici ottenuti sono stati poi trasferiti in una nuova subcultura per lo sviluppo dai calli embriogenici degli embrioni secondari. In particolare, su substrato X6 sono stati trasferiti gli embrioni che stavano su DM solido, e su substrato A quelli che stavano su E96. Sia il substrato X6 che il substrato A contenevano 200 mg/L di cefotaxime, 200 mg/L di carbenicillina e 50 mg/L di kanamicina. Le Petri sono state poi mantenute al buio in camera di crescita per 6 settimane. Passate le 6 settimane, lo screening effettuato allo stereoscopio non ha rilevato alcun sviluppo di embrioni secondari. Non si è quindi riusciti ad indurre lo sviluppo di embrioni secondari da cui ottenere linee transgeniche. È sicuramente necessario rivedere e ottimizzare il protocollo seguito e risolvere questa ultima fase dello sviluppo di embrioni somatici secondari dai tessuti esprimenti il fenotipo GFP quindi putativi transgenici.

Capitolo 5

CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi ha avuto come principale obiettivo lo sviluppo di nuove strategie di difesa a *P. viticola* in vite ottenendo portinnesti e varietà resistenti con la tecnologia del silenziamento genico (RNAi). Le prove di rigenerazione e di trasformazione genetica realizzate su vite hanno permesso di giungere alle seguenti conclusioni:

- alla valutazione delle due differenti specie di *Agrobacterium* utilizzate, in particolare il ceppo EHA101 di *A. tumefaciens* e il ceppo 'wild type' di *A. rhizogenes*, segue l'affermazione per cui si considera maggiormente efficiente la specie *A. rhizogenes*, che mostra un potenziale interessante da utilizzare nell'applicazione delle tecniche di DNA ricombinante in vite, soprattutto per quei genotipi che si sono mostrati recalcitranti quando trasformati con *A. tumefaciens*. È quindi necessario intervenire sul plasmide Ri e provare a disarmarlo correttamente, così da eliminare i geni che determinano lo squilibrio ormonale e lo sviluppo delle radici;
- le prove di trasformazione effettuate sui quattro differenti genotipi, Kober 5BB, Lambrusco Salamino, Thompson Seedless e Ancellotta, hanno mostrato come Thompson Seedless si confermi ancora come il genotipo più predisposto alla trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens*, in particolare adottando il protocollo di selezione presentato in tesi che si è dimostrato appropriato per questo genotipo. Da Thompson Seedless sono state ottenute e selezionate 6 linee transgeniche, caratterizzate dall'integrazione dei due costrutti a forcina di silenziamento genico, il Pv-DCL441 hpRNA e il Pv-DCL441-DCL331 hpRNA, ottenendo nello specifico 3 linee per ogni costrutto. Questo rappresenta un notevole risultato che permetterà di verificare successivamente l'efficacia dei due costrutti nell'indurre resistenza stabile a *P. viticola* in vite mediante il metodo di silenziamento genico;
- le prove di embriogenesi somatica su Lambrusco Salamino e Ancellotta hanno dimostrato una buona predisposizione per questi due genotipi nello sviluppare embrioni somatici utilizzando come espianto il fiore intero. Le prove di trasformazione genetica hanno invece delineato la necessità di migliorare il protocollo di trasformazione applicato, soprattutto nelle fasi di formazione e selezione degli embrioni secondari.

In generale l'efficienza di trasformazione genetica dipende da due aspetti, quali la competenza all'integrazione del costrutto genico e la competenza alla rigenerazione (Barcaccia & Falcinelli, 2011), i quali debbono essere entrambi soddisfatti per poter rigenerare da cellule transgeniche una pianta completa. La competenza alla rigenerazione dipende dal genotipo, dal

tipo di organo e dallo stadio ontogenetico della pianta, ed è inoltre influenzata dall'agente selettivo utilizzato nella fase di selezione e di rigenerazione dei tessuti transgenici. Come dimostrato da questo lavoro di tesi, alcuni genotipi sono più predisposti quando si basa il protocollo sulla rigenerazione per organogenesi, come in Lambrusco Salamino e in Thompson Seedless, mentre altri quando si procede per embriogenesi somatica, come in Ancellotta. L'uso degli ammassi meristematici come espianto su cui effettuare la trasformazione genetica offre tutta una serie di vantaggi (Mezzetti, et al., 2002):

- elevata efficienza di rigenerazione dei germogli;
- riduzione delle tempistiche di rigenerazione;
- assenza di variazioni fenotipiche;
- tecnica più semplice rispetto all'embriogenesi somatica;
- produzione di sostanze fenoliche da parte delle cellule danneggiate presenti sulla superficie della sezione.

Invece, l'uso degli embrioni somatici risulta interessante perché gli embrioni somatici di vite sono di tipo unicellulare, per cui, se l'integrazione del costrutto viene ultimata prima dell'inizio dello sviluppo dell'embrione e della rigenerazione della plantula, il risultato sarà una pianta in cui le cellule sono omogeneamente trasformate e si riduce la possibilità di ottenere individui chimerici (Barcaccia & Falcinelli, 2011).

La competenza all'integrazione del costrutto genico dipende invece dalla specie e dal ceppo di *Agrobacterium* utilizzato, dalla predisposizione del genotipo, dalla qualità dell'espianto e dalle condizioni ambientali adottate per indurre la virulenza, mentre sembra che il tipo di costrutto inserito nel plasmide portato dall'agrobatterio non abbia alcuna influenza.

L'utilizzo della trasformazione genetica e della nuova tecnica dell'RNA interference rappresentano un'importante possibilità per il settore vitivinicolo per ottenere genotipi che potrebbero anche far parte del gruppo dei vitigni certificati, senza modificarne le principali caratteristiche che ne influenzano le caratteristiche qualità, resistenti ad uno dei maggiori agenti patogeni causa di consistenti perdite economiche, la *P. viticola*, per cui ancora non esiste una soluzione totalmente efficace se non il ricorrere ai prodotti chimici indicati per la difesa fitosanitaria, che spesso non garantiscono il livello di sostenibilità ambientale ormai sempre più richiesto all'agricoltura e che spesso portano allo sviluppo di resistenze per cui è necessario individuare successivamente nuove molecole. Purtroppo le normative conservatrici attualmente vigenti, che bloccano lo sviluppo e l'uso di queste tecniche lasciando la responsabilità alle sole tecniche tradizionali di incrocio e di selezione clonale di sviluppare nuove cultivar che siano resistenti agli agenti patogeni e che mantengano certi standard produttivi sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, oltre al raggiungimento di altri obiettivi necessari, rappresentano una forte limitazione per apportare innovazioni qualitative

e produttive in viticoltura. Le risorse genetiche del genere *Vitis* e non solo sono vaste e rappresentano un grosso potenziale a disposizione del miglioramento genetico di portinnesti e di vitigni, e questi nuovi approcci basati sulle conoscenze biotecnologiche possono contribuire in maniera efficace al potenziamento del settore viticolo.

BIBLIOGRAFIA

- Barcaccia, G. & Falcinelli, M., 2008. *Genetica e Genomica - Genetica generale Vol. I.* a cura di Napoli: Liguori Editore.
- Barcaccia, G. & Falcinelli, M., 2011. *Genetica e Genomica - Genomica e Biotecnologie genetiche Vol. III.* a cura di Napoli: Liguori Editore.
- Barcaccia, G. & Falcinelli, M., 2011. *Genetica e Genomica - Miglioramento genetico.* II a cura di Napoli: Liguori Editore.
- Barker, C. et al., 2005. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, Run1, using a bacterial artificial chromosome library. *Theor Appl Genet.*, Volume 111, pp. 370-377.
- Barlass, M. & Skene, K. G. M., 1978. In vitro propagation of grapevine (*Vitis vinifera L.*) from fragmented shoot apices. *Vitis*, Volume 17, pp. 335-340.
- Belli, G., 2011. *Elementi di patologia vegetale.* II a cura di s.l.:Piccin - Nuova Libreria.
- Bottura, M., 2011. *Manuale di viticoltura.* San Michele all'Adige: Fondazione Edmund Mach
- Brilli, M. et al., 2018. A multi-omics study of the grapevine-downy mildew (*Plasmopara viticola*) pathosystem unveils a complex protein coding- and noncoding-based arms race during infectio. *Scientific Reports*, Volume 8, pp. 1-12.
- Capriotti, L., 2017. *Ottimizzazione di protocolli di trasformazione cis/trans-genetica su portinnesti e varietà di Vitis, mediante l'uso del gene reporter eGFP*, Ancona.
- Commissione Europea. Direttiva 2001/18/CEE. “Emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati”. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee n. L106 del 17/04/2001.
- Costantini, E. et al., 2007. Auxin Synthesis-Encoding Transgene Enhances. *Plant Physiology*, Volume 143, p. 1689.1694.

- CRIBIS, 2019. Cribis: il panorama completo del settore vitivinicolo italiano aggiornato al 2017. Su *Beverfood.com*. [Online] Available at: <https://www.beverfood.com/cribis-panorama-completo-settore-vitivinicolo-italiano-aggiornato-2017-wd134099/>
- Dhekney, S., Li, Z., Grant, T. & Gray, D., 2016. Somatic Embryogenesis and Genetic Modification of *Vitis*. In: *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in Molecular Biology*, vol. 1359. New York: Springer Science+Business Media, pp. 263-277.
- Dhekney, S., Li, Z. & Gray, D., 2011. Grapevines engineered to express cisgenic *Vitis vinifera* thaumatin-like protein exhibit fungal disease resistance. *In Vitro Cell*, Volume 47, pp. 458-466.
- Dussert, Y. et al., 2016. Draft Genome Sequence of *Plasmopara viticola*, the Grapevine Downy Mildew Pathogen. *Genome Announcements*, 4(5), pp. 1-2.
- Dutt, M., Li, Z., Dhekney, S. & Gray, D., 2008. A co-transformation system to produce transgenic grapevines free of marker genes. *Plant Science*, 175(423-430).
- Dutt, M. et al., 2005. Transgenic Rootstock Protein Transmission in Grapevines. *Acta Horticulturae*, 738(749-753).
- Fan, C. et al., 2008. Agrobacterium-mediated genetic transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) with a novel stilbene synthase gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, Volume 92, pp. 197-206.
- Franks, T., Gang He, D. & Thomas, M., 1998. Regeneration of transgenic *Vitis vinifera* L. Sultana plants: genotypic and phenotypic analysis. *Molecular Breeding*, Volume 4, pp. 321-333.
- Gentile, A. & Mezzetti, B., 2007. Biotecnologie OGM: quali prospettive per le piante arboree da frutto? In: S. Sansavini, a cura di *Nuove frontiere dell'arboricoltura italiana*. Bologna: OASI Alberto Perdisa, pp. 339-353.
- Gobbin, D., Rumbou, A., Linde, C. & Gessler, C., 2006. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards. *Molecular Plant Pathology*, 7(6), pp. 519-531.
- Godwin, I., Todd, G., Ford-Lloyd, B. & Newbury, J., 1991. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Reports*, Volume 9, pp. 671-675.

- Grande, M. S., 2007. Miglioramento genetico. In: R. Angelini, a cura di *La vite e il vino*. s.l.:Script, pp. 474-479.
- Gray, D., Li, Z. & Dhekney, S., 2014. Precision breeding of grapevine for improved traits. *Plant Science*, Volume 228, pp. 3-10.
- Gribaudo, I. & Grando, M., 2005. Caratterizzazione varietale e miglioramento genetico della vite. In: M. Marenghi, a cura di *Manuale di viticoltura: impianto, gestione e difesa del vigneto*. s.l.:Edagricole, pp. 1-14.
- Intrieri, C., 2019. Il nome dei vitigni ibridi resistenti alle malattie fungine: un rischio da non sottovalutare per la viticoltura italiana. *L'Enologo*, Volume 7, pp. 24-27.
- ISMEA Mercati, I., 2020. Dati di dettaglio. Su *ReteVino DOP-IGP*. [Online] Available at: <http://www.ismeamercati.it/flex/FixedPages/IT/VinoCertificato.php/L/IT>
- Kamthan, A., Chaudhuri, A., Makthan, M. & Datta, A., 2015. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Frontier in Plant Science*, 6(208).
- Kandel, R. et al., 2016. Evaluation of a grapevine-derived reporter gene system for precision breeding of *Vitis*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, Volume 124, pp. 599-609.
- Lee, Y., Jin, S., . Sire, W. & Nester, E., 1996. The sensing of plant signal molecules by *Agrobacterium*: genetic evidence for direct recognition of phenolic inducers by the VirA protein. *Gene*, Volume 179, pp. 83-88.
- Legrand, V. et al., 2003. Constitutive expression of *Vr-ERE gene* in transformed grapevines confers enhanced resistance to eutypine, a toxine from *Eutypa lata*. *Plant Science*, Volume 164, pp. 809-814.
- Lemgo, G. et al., 2013. Biosafety considerations of RNAi-mediated virus resistance in fruit-tree cultivars and in rootstock. *Transgenic Resource*, Volume 22, pp. 1073-1088.
- Limera, C., Sabbatini, S., Sweet, J. & Mezzetti, B., 2017. New Biotechnological Tools for the Genetic Improvement of Major Woody Fruit Species. *Frontiers in Plant Science*, 8(1418).
- Maillot, P., Kieffer, F. & Walter, B., 2006. Somatic embryogenesis from stem nodal sections of grapevine. *Vitis*, 45(4), pp. 185-189.
- Malnoy, M. et al., 2016. DNA-Free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins. *Frontiers in Plant Sciences*, 7(1904).

- Marchive, C. et al., 2018. Over-expression of *VvWRKY1* in grapevines induces expression of jasmonic acid pathway-related genes and confers higher tolerance to the downy mildew. *PLoS ONE*, 8(1).
- Martinelli, L., Bragagna, P., Poletti, V. & Scienza, A., 1993. Somatic embryogenesis from leaf- and petiole-derived callus of *Vitis rupestris*. *Plant Cell Reports*, Volume 12, pp. 207-210.
- Mauro, M., Nef, C. & Fallot, J., 1986. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. *Plant Cell Reports*, Volume 5, pp. 377-380.
- Meister, G. & Tuschl, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, Volume 431, pp. 343-349.
- Mezzetti, B., Pandolfini, T., Navacchi, O. & Landi, L., 2002. Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. *BMC Biotechnology*, 2(18).
- Mipaaf, 2020. Registro Nazionale delle varietà di Vite. [Online] Available at: <http://catalogoviti.politicheagricole.it/catalogo.php>
- Mipaaf. D.M. 06/02/2001. “Approvazione del protocollo tecnico di selezione clonale”. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 139 del 18/06/2001.
- Motoike, S. Y., Skirvin, R. M., Norton, M. A. & Otterbacher, A. G., 2001. Somatic embryogenesis and long term maintenance of embryogenic lines from fox grapes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Volume 66, pp. 121-131.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Volume 15, pp. 473-497.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, Volume 15, pp. 473-497.
- Nakajima, I. et al., 2017. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. *PLoS One*.
- OIV, 2019. Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino - Sezione Dati. [Online] Available at: <http://www.oiv.int/it/organizzazione-internazionale-della-vigna-e-del-vino>
- ONU, 2015. Obiettivi per lo sviluppo sostenibile. [Online] Available at: <https://unric.org/it/agenda-2030/>
- Pallioti, A., Silvestroni, O. & Poni, S., 2018. *Manuale di viticoltura*. I a cura di s.l.:Edagricole.

- Rajasekaran, K. & Mullins, M. G., 1979. Embryos and Plantlets from Cultured Anthers of Hybrid Grapevines. *Journal of Experimental Botany*, 30(116), pp. 399-407.
- Sabbadini, S. et al., 2019. Comparison of regeneration capacity and *Agrobacterium*-mediated cell transformation efficiency of different cultivars and rootstocks of *Vitis spp.* via organogenesis. *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1-10.
- Sabbadini, S. et al., 2015. Peach (*Prunus persica L.*). In: *Agrobacterium Protocols: Volume 2, Methods in Molecular Biology*, vol. 1224. New York: Springer Science+Business Media, pp. 205-215.
- Sansavini, S. et al., 2012. *Arboricoltura generale*. Bologna: Pàtron Editore.
- Sarnari, T., 2019. Il settore vino: uno sguardo critico in vista delle nuove sfide *Pianeta PSR*. [Online] Available at: <http://www.pianetapsr.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/2188>
- Schmulling, T., Schell, J. & Spena, A., 1988. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *The EMBO Journal*, 7(9), pp. 2621-2629.
- Scorza, R., Cordts, J. M., Ramming, D. W. & Emershad, R. L., 1995. Transformation of grape (*Vitis vinifera L.*) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, Volume 14, pp. 589-592.
- Sinkar, V., White, F. & Gordon, M., 1987. Molecular biology of Ri-plasmid - A review. *Journal Biosci.*, 11(1-4), pp. 47-57.
- Stamp, J. A., Colby, S. M. & Meredith, C. P., 1990. Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis spp.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Volume 22, pp. 127-133.
- Stamp, J. A. & Meredith, C. P., 1988. Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine. *Scientia Horticulturae*, Volume 35, pp. 235-250.
- Sturchio, E. & Ballacci, G., 2011. *MOGM e sicurezza in laboratorio*. s.l.:INAIL - Ministero della Salute.
- Taiz, L. & Zeiger, E., 1996. *Fisiologia vegetale*. Padova: Piccin.
- Unicredit, 2019. *Industry Book 2019*. s.l.:Unicredit.

- UniCredit, Studio UniCredit sul settore vitivinicolo del Sud: nel Mezzogiorno si produce il 24% del vino italiano e crescono i vini qualità 2020. Su *zeroventiquattro.it*. [Online] Available at: <https://www.zeroventiquattro.it/agroalimentarefood/studio-unicredit-sul-settore-vitivinicolo-del-sud-nel-mezzogiorno-si-produce-il-24-del-vino-italiano-e-crescono-i-vini-qualita/#>
- Velasco, R. et al., 2007. A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. *PLoS ONE*, 12(1326).
- Vidal, J. et al., 2006. Evaluation of transgenic "Chardonnay" containing magainin genes for resistance to crown gall and powdery mildew. *Transgenic Resource*, Volume 15, pp. 69-820.
- White, F., Taylor, B., Huffman, G. & Gordon, M., 1985. Molecular and Genetic Analysis of the Transferred DNA Regions of the Root-Inducing Plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology*, 164(1), pp. 33-34.
- Yamamoto, T. et al., 2000. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports*, Volume 19, pp. 639-646.
- Yin, L. et al., 2017. Genome sequence of *Plasmopara viticola* and insight into the pathogenic mechanism. *Scientific Reports*, Volume 7, pp. 1-12.
- Zimmer, M., 2002. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chemical Reviews*, 102(3), pp. 759-781.
- Zok, A. et al., 2010. Effect of *Medicago sativa* ferritin gene on stress tolerance. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, Volume 100, pp. 339-344.

RINGRAZIAMENTI

Ecco che si conclude una fase importante della mia vita, con un finale dolce amaro che non mi sarei mai aspettata. Due anni fa, il 14 Settembre 2018 prendevo il mio volo per Ancona, piena di paure e insicurezze, ma pronta a vivere una nuova esperienza con cui mettermi alla prova. A distanza di due anni, sono fiera della mia scelta. Vivere e studiare ad Ancona mi ha permesso di comprendere le mie capacità e i miei limiti, di mettermi in gioco in differenti situazioni in cui spesso sono caduta, ma poi alla fine ce l'ho fatta. Ho avuto la possibilità di conoscere il territorio marchigiano e di farmi meravigliare ogni giorno dalle verdi colline e dal cielo variopinto di Ancona, dai tramonti magici e dal suono del mare. Ho vissuto uno dei periodi più pesanti di sempre qui ad Ancona, isolata tra quattro mura durante l'emergenza sanitaria, lontana da casa ma sentendomi ugualmente protetta in questa piccola cittadina che ormai fa parte di me. Quindi prima di tutto ringrazio Ancona, la città che mi ha regalato tanto e in cui lascio un pezzo del mio cuore.

Ringrazio me stessa per non aver mollato, per essere riuscita nella mia sfida personale ed essermi sempre ritrovata, nonostante le difficoltà, i momenti di solitudine, di malinconia e di confusione. Io che mi sono sempre ripetuta “andrà tutto bene” e che ancora ci spero.

Ringrazio il professore Mezzetti, Silvia, Luca e Angela, che mi hanno accompagnato nella realizzazione di questo lavoro di tesi, con tanta tanta pazienza e disponibilità. Mi hanno trasmesso la loro passione, mi hanno fatto capire quanto sia necessario impegnarsi al 100% per ottenere i migliori risultati, mi hanno aiutato nelle mie mancanze e mi hanno insegnato tante nozioni interessanti che spero di poter applicare nel mio futuro lavorativo.

Ringrazio l'Università Politecnica delle Marche, i suoi professori e i suoi collaboratori, sono fiera di averla scelta per concludere il mio percorso magistrale. Mi ha dato la possibilità di formarmi al meglio, di ampliare le mie conoscenze, di confrontarmi con situazioni completamente differenti e nuove per me, di conoscere diverse e interessanti realtà aziendali, e soprattutto mi ha permesso di approfondire la mia curiosità sull'agricoltura sociale.

Ringrazio il mio coinquilino Tomas, il mio fratellino Erasmus capace di sopportarmi e supportarmi ogni giorno durante il primo anno di Università, e le mie coinquiline dello studentato Annaclaudia, Gloria, Lucrezia, Marinelda e Federica, con cui è stato bellissimo vivere la nostra semplicissima routine del secondo anno, tra mensa, Università, fermate dell'autobus e chiacchierate infinite.

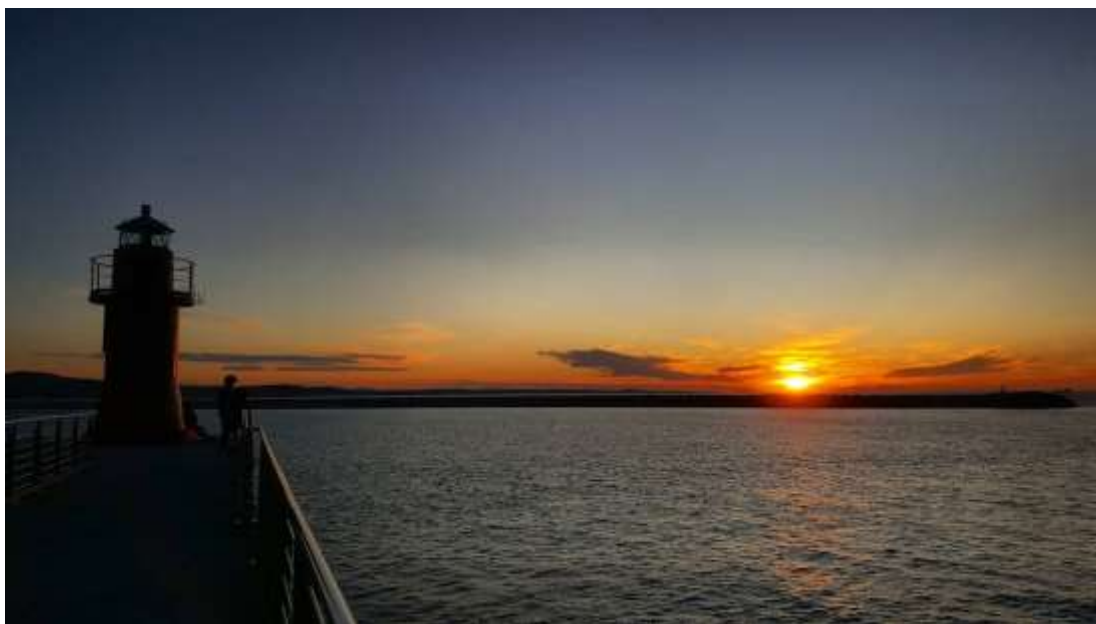
Ringrazio i miei colleghi, tutti così interessanti, brillanti, determinati, a cui auguro di riuscire nelle loro intenzioni e di contribuire al meglio con la loro professionalità nel settore dell'agricoltura. In particolare ringrazio Tato, Alissar, Gaia, Manolo e Francesca, sempre pronti per darmi una parola di incoraggiamento, un consiglio e un supporto nello studio, e non solo.

Ringrazio ESN Ancona e i miei compagni di avventura che con me hanno condiviso una delle realtà più belle ed intriganti che ci siano. ESN per me è stata la mia culla, il mio porto sicuro, a cui ho dato tutta me stessa soprattutto durante il mandato da Presidente. Ho avuto la possibilità di acquisire tantissime skills, sono diventata tutt'fare ed ho vissuto ogni giorno con orgoglio il far parte di quest'associazione. Porterò con me ogni singolo momento con i miei ragazzi, con gli studenti Erasmus ed internazionali, in particolare Nestor, Tomas, Paula, Iranzu e Gonzalo, con i responsabili dell'Università con cui ho collaborato per realizzare al meglio tutte le attività, e soprattutto con tutti i miei cari soci, senza di loro non avrei fatto nulla. In particolare ringrazio i miei compagni di Board, Serena, Andriy, Eleonora, Francesca e Giorgia, i miei amichetti del cuore Michele e Matteo, e il mio Event Manager provetto Gianmarco, che con tanta pazienza e disponibilità hanno contribuito a creare importanti ricordi.

Ringrazio tutta la mia famiglia, in particolare la mia mamma che prima mi teneva stretta stretta a sé per proteggermi e in questi due anni ha sopportato con tanto amore la mia lontananza, la mia fan numero uno la nonna Maria, in continua attesa del mio ritorno con i suoi abbracci forti forti, e il mio fratellino Alessandro, il mio caro complice.

Ringrazio tutte le mie amiche e i miei amici della mia amata Sicilia, in particolare Elga, Giordana, Francesca, Arianna, Giorgia, Antonio, Emanuele, Salvo, Andrea e Giacomo, persone speciali che fanno parte della mia vita da anni e sento che lo saranno ancora per molto, probabilmente per sempre.

Mi tocca concludere ufficialmente il mio percorso dietro ad uno schermo, senza poter abbracciare le mie persone importanti e senza poter salutare per bene la mia cara UNIVPM. È un finale dolce amaro, ma di sicuro non è un addio. Grazie a chi in due anni ha condiviso con me un momento, un sorriso, una parola, un consiglio, un abbraccio, una carezza, un pianto, un ballo, una passeggiata, un tramonto. Grazie.



“Maledetto cuore che ti sciogli ogni volta che dico addio”