



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROALIMENTARI

**CORSO DI LAUREA IN
VITICOLTURA ED ENOLOGIA**

**MIGLIORAMENTO GENETICO DELLA VITE:
METODI TRADIZIONALI
E NUOVE BIOTECNOLOGIE
PER UNA VITICOLTURA SOSTENIBILE**

Tesi di Laurea in Viticoltura generale e vivaismo

Relatore

Prof.ssa Ilaria Filippetti

Correlatori

Dott. Alberto Zanini

Dott.ssa Alice Moffa

Presentata da

Elisabetta Balsamini

Matricola

0000394334

Sessione marzo 2025

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 Patogeni della vite

1.2 L'eccessivo uso di pesticidi e la nuova filosofia dell'ecosostenibilità

2. SCOPO

3. METODI TRADIZIONALI DI MIGLIORAMENTO GENETICO

3.1 Le mutazioni

3.2 Tecniche di miglioramento genetico tradizionale

3.3 Il miglioramento genetico tradizionale nella vite

3.3.1 Selezione clonale

3.3.2 Riproduzione sessuata - incroci interspecifici (ibridazione) e incroci intraspecifici

3.4 Tecniche biotecnologiche di miglioramento genetico

3.4.1 Genetica molecolare

3.4.2 Marker assisted selection

3.4.3 Gene stacking (pyramiding)

3.4.4 Cisgenesi, transgenesi e intragenesi

3.4.5 La trasformazione genetica e l'uso di *Agrobacterium tumefaciens*

3.4.6 Metodo biolistico

3.4.7 Elettroporazione

3.5 La rigenerazione delle piante

4. NUOVE METODOLOGIE BIOTECNOLOGICHE

4.1 Introduzione alle New Breeding Technologies

4.2 La CRISPR/Cas9

4.2.1 Applicazioni della CRISPR/Cas9 nella vite

4.3 Meccanismi a RNAi

4.4 Cell wall-penetrating peptides e Carbon dots

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

6. BIBLIOGRAFIA

7. SITOGRAFIA

RINGRAZIAMENTI

1. INTRODUZIONE

1.1 Patogeni della vite

La coltivazione della vite da parte dell'uomo risale a quasi 8000 anni fa nel corso del tempo ha subito continue evoluzioni. Al giorno d'oggi la viticoltura rappresenta, a livello mondiale, una delle più importanti attività agricole, sia economicamente che sul piano alimentare, ma per rimanere un'attività apprezzata deve rispettare diversi parametri qualitativi e sanitari (Pirello et al., 2023).

Oggi come ieri, infatti, sono diverse le sfide che un viticoltore si trova a dover gestire per poter proteggere il frutto del suo lavoro e poter garantire ai consumatori un prodotto, sia esso uva da tavola o vino, che si possa definire di qualità.

A partire dalla metà del XIX secolo, la viticoltura europea si è trovata a dover affrontare problemi significativi a seguito della comparsa di nuove fitopatologie, causate da specie aliene introdotte accidentalmente dal Nuovo Mondo; all'epoca questo tipo di epidemie in Europa erano relativamente rare, perciò l'assenza di mezzi di prevenzione e controllo, unita a condizioni climatiche favorevoli ai patogeni, ha portato ad una incontrollata espansione di queste fitopatologie causando ingenti danni in molti vigneti europei (C. Gessler et al., 2011).

Oltre alle infezioni fungine, estremamente dannosa fu la fillossera della vite (*Daktulosphaira vitifoliae* F.), questo afide infatti, attacca il sistema radicale altamente suscettibile della vite europea (*Vitis vinifera* L.), provocandone un progressivo deperimento, che culmina nel disseccamento e quindi nella morte della pianta. La lotta a questo insetto rimane però un emblema della vittoria della ricerca scientifica, essendo il primo trionfo delle tecniche di lotta biologica, portando alla diffusione dei portainnesti (Pirello et al., 2023).

Al giorno d'oggi, peronospora (*Plasmopara viticola* B. e D.T.), oidio (*Erysiphe necator* S.) e botrite (*Botrytis cinerea* P.), restano ancora i principali patogeni riscontrati nei vigneti euroasiatici.

Va tenuto in considerazione, infatti, che la vasta area di coltivazione viticola unita alla necessità di una standardizzazione genetica richiesta soprattutto dai disciplinari di produzione, portano ad un fenomeno di ristagno genetico specialmente nelle cultivar d'élite, rendendo la vite molto suscettibile ad attacchi biotici e stress abiotici; inoltre, a causa del cambiamento climatico sono favorite ulteriormente le epidemie e l'insorgere di nuovi ceppi patogeni più aggressivi.

Difatti la maggiore frequenza di eventi climatici estremi, come ondate di calore e piogge intense, intacca la salute della pianta permettendo la proliferazione di diversi patogeni. È stato visto ad

esempio, che la peronospora ha dimostrato un'eccezionale capacità di adattamento alle variazioni climatiche, complicando dunque la sua gestione (Pirello et al., 2023).

1.2 L'eccessivo uso di pesticidi e la nuova filosofia dell'ecosostenibilità

Le problematiche presentate vanno a incidere sia sulla quantità e qualità della vendemmia che sulla durata della vita della pianta, è stato quindi fondamentale per i viticoltori cercare una soluzione (Butiuc-Keul et al., 2023). Durante il XX secolo, la diffusione di queste malattie è stata contrastata principalmente attraverso l'applicazione intensiva di fungicidi chimici, in particolare a base di rame, che hanno garantito una protezione efficace, ma il cui utilizzo ha sollevato nel tempo sempre più perplessità.

I pesticidi chimici impiegati per contenere peronospora e oidio hanno infatti contribuito significativamente alla contaminazione del suolo e delle falde acquifere, riducendo la biodiversità e danneggiando gli ecosistemi in prossimità dei vigneti (Pirello et al., 2023).

A partire dagli anni '80, una crescente consapevolezza dei rischi associati all'uso indiscriminato di queste sostanze ha spinto la comunità scientifica e politica a cercare soluzioni più sostenibili. In risposta a queste problematiche, l'Unione Europea ha introdotto regolamentazioni più stringenti per ridurre l'impiego di pesticidi e promuovere pratiche agricole più rispettose dell'ambiente.

Per evitare l'uso sconsiderato di prodotti chimici, è stato sviluppato l'approccio della lotta integrata (*Integrated Pest Management*, IPM), ossia una pratica che combina metodi biologici, agronomici e chimici, ricorrendo all'utilizzo di pesticidi di sintesi solo come ultima risorsa. La Direttiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, istituisce infatti un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi (Pirello et al., 2023).

Negli anni la ricerca scientifica ha sviluppato diversi approcci con il fine di ottenere varietà resistenti, passando dagli incroci, alla cisgenesi e transgenesi, trasformazioni mediate da agrobatterio (*Agrobacterium tumefaciens* S.&T., 1907), fino ad arrivare alle New Breeding Technologies.

Interessante in quest'ultime l'impiego di nanoparticelle per la veicolazione di molecole bioattive, in particolare quelle a base di carbonio, che si è visto non presentano fitotossicità nei confronti della vite e non ne vanno a impattare la fotosintesi o la crescita. Inoltre, l'uso di sistemi basati su RNAi permette di intervenire selettivamente su determinati patogeni senza alterare significativamente l'ecosistema del vigneto (Campos et al., 2021).

Assieme alla lotta integrata, l'utilizzo di varietà di vite geneticamente migliorate e resistenti alle principali malattie, si prospetta una strategia estremamente interessante per ridurre ulteriormente la necessità di trattamenti chimici. Si inseriscono quindi in un contesto di transizione verso una viticoltura sostenibile, che mira sempre a preservare la qualità e la produttività dei vigneti ma minimizzando l'impatto ambientale e proteggendo la salute sia dei lavoratori che dei consumatori, offrendo dunque nuove prospettive per l'introduzione di resistenze genetiche nelle varietà di vite, riducendo la dipendenza dai trattamenti chimici.

Tuttavia, l'implementazione di tecniche di trasformazione come la cisgenesi e la transgenesi è ostacolata da restrizioni normative e dalla percezione pubblica, soprattutto in Europa dove, le piante ottenute con questi metodi vengono considerati OGM. Di conseguenza, sono soggette a regolamenti particolarmente rigidi, come quelli previsti dalla Direttiva Europea 2001/18/EC (Butiuc-Keul et al., 2023).

La gestione delle malattie nei vigneti continua quindi a rappresentare una sfida complessa, che richiede un equilibrio tra le strategie tradizionali e l'adozione di soluzioni biotecnologiche innovative.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo principale che si propone questa tesi è quello di analizzare le diverse strategie di miglioramento genetico della vite finalizzate ad indurre resistenza ai patogeni, attraverso una loro descrizione precisa ed esaminandone sia i pregi che le limitazioni.

Oltre a fare un confronto tra le varie tecnologie, partendo dai metodi tradizionali per arrivare alle nuove biotecnologie, questa tesi mira ad esplorare come esse possano essere integrate in un modello di viticoltura eco-sostenibile. Questo aspetto risulta particolarmente importante, soprattutto tenendo conto delle attuali problematiche quali il cambiamento climatico, la tutela della biodiversità e la crescente domanda di soluzioni agricole rispettose per l'ambiente.

L'obiettivo finale, dunque, è quello di cercare un approccio che integri vecchie e nuove biotecnologie e che possa essere una risposta efficace alla richiesta di miglioramento di produttività e qualità, rispettando anche le attuali legislazioni che concernono l'uso di organismi geneticamente modificati (OGM).

3. METODI TRADIZIONALI DI MIGLIORAMENTO GENETICO

3.1 Le mutazioni

La diversità genetica in natura è il risultato di diverse mutazioni che aiutano le popolazioni ad adattarsi ai cambiamenti ambientali, portando quindi ad una selezione naturale. Il genoma è infatti costantemente esposto a modifiche che possono verificarsi durante la replicazione del DNA nelle fasi di divisione cellulare e possono andare ad interessare diverse parti; ad esempio, delle mutazioni genomiche possono portare ad una variazione nel numero di cromosomi, oppure possono avvenire mutazioni cromosomiche possono modificarne la struttura, o ancora, delle mutazioni geniche che possono modificare anche singoli geni (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2017).

Un'alterazione genica avviene nel DNA a carico di una singola base e per questo viene anche detta 'puntiforme'. Può avvenire in linea generale in due modi: nel primo caso, quello che si verifica più frequentemente, vengono sostituite delle basi (ad esempio con uno scambio tra una coppia AT con una coppia GC). Alternativamente può avvenire un'alterazione del punto di lettura con l'inserimento o la delezione di una o più coppia di basi, portando così alla perdita di funzione del gene e alla codifica di amminoacidi o proteine diverse da quelle che verrebbero registrate normalmente. Per concludere, le mutazioni geniche sono relativamente rare e dipendono soprattutto da quanto sono state modificate le informazioni codificate. Presentano anche una natura recessiva e spesso danno modifiche limitate, fortunatamente senza avere effetti molto forti, che possono avere conseguenze letali per la pianta (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2017).

In generale questi 'errori' di codifica possono avere diversi effetti e talvolta possono conferire un vantaggio all'organismo mutato rispetto ai suoi simili senza il gene modificato, favorendone la sopravvivenza e la riproduzione. Oltre che a fattori ambientali, come radiazioni UV o stress abiotici, anche le infezioni virali possono innescare mutazioni genetiche e i diversi tratti risultanti da queste variazioni del DNA sono poi espressi negli organismi dal fenotipo.

Da sempre l'uomo ha sfruttato in agricoltura questo processo di mutazioni, selezionando e conservando gli organismi reputati più affini agli scopi ricercati e coltivando una progenie che mantenesse il più possibile le caratteristiche desiderate. Nel XIX secolo, con la scoperta di G. Mendel sulle leggi dell'ereditarietà, sono state ottenute nuove informazioni che hanno accelerato l'opera di selezione umana, precedentemente limitata ad una cernita degli organismi che mostravano caratteristiche migliori, introducendo la riproduzione per incrocio. Infatti, se la mutazione genetica è

avvenuta nel gamete che partecipa alla fecondazione, questa potrà essere passata alla progenie. Questo processo ha comunque dei limiti, poiché si basa su fattori randomici e ristretti al pool genico di organismi sessualmente compatibili (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2017).

3.2 Tecniche di miglioramento genetico tradizionale

La prima tecnica di miglioramento tradizionale è l'incrocio sessuato controllato. La vite, infatti, essendo di natura estremamente eterozigote, ossia dotata di alleli diversi su un singolo locus, difficilmente anche in seguito ad autofecondazione ci darà una progenie simile al genitore. In particolare durante le fecondazioni incrociate, il livello di variabilità aumenta sensibilmente, soprattutto in caratteri per la maggior parte poligenici come quelli che determinano il fenotipo produttivo e qualitativo. Raramente, infatti, questi sono codificati da uno o pochi geni dominanti. Le viti, dunque, hanno bisogno di essere selezionate accuratamente per i caratteri d'interesse prima di poter essere propagate. Se una volta, e talvolta ancora privatamente in aziende, per distinguere le piante più interessanti veniva effettuata una selezione massale - basata principalmente sull'osservazione fenotipica - ora viene applicata la selezione clonale, processo più mirato che tiene conto anche dello stato sanitario del materiale. Dopo che le piante interessanti sono state individuate, si potrà procedere con la propagazione agamica, fondamentale per ottenere piante figlie identiche a quella di partenza, che ha appunto tutte le caratteristiche desiderate. Nel paragrafo successivo verrà dato più spazio alla loro descrizione e funzione (Palliotti et al, 2021).

Con l'avanzare delle conoscenze scientifiche, negli anni '20 si è scoperto che le mutazioni possono essere artificialmente indotte. Applicando ad esempio la mutagenesi alla coltura in vitro di tessuti somatici, che sono già un mezzo di variabilità somaclonale, mediante l'ausilio di mezzi fisici (come i raggi X) o chimici (aggiungendo etilmetano sulfonato o colchicina) la frequenza di mutazioni che avvengono nella fase di rigenerazione può essere aumentata. Operando questi trattamenti, possono essere infatti indotte modifiche che possono riguardare le posizioni di singoli nucleotidi o anche fenomeni più complessi di inversione, traslochi o addirittura l'eliminazione di frammenti di DNA (Palliotti et al., 2021).

Data la natura imprevedibile di queste alterazioni però, sono necessari diversi campioni di piante, in modo da identificare i tratti favorevoli e grazie a re-incroci successivi eliminare eventuali effetti collaterali. Anche l'irraggiamento e le piante 'ponte' sono utilizzati per rimuovere geni indesiderati legati a quelli ricercati. Come alternativa, anche se di rado nel caso di vegetali, può essere applicata

su specie sessualmente incompatibili l'ibridazione somaclonale dove delle cellule somatiche vengono private delle proprie pareti cellulari e i protoplasti ottenuti vengono fatti fondere forzatamente, creando così un ibrido contenente il materiale genetico di entrambi i genitori. Se c'è compatibilità, in seguito alla fusione dei nuclei parentali, si possono ottenere ibridi che hanno i cromosomi di entrambe le piante di partenza; può anche verificarsi la fusione del genoma mitocondriale, creandone uno nuovo. Questo tipo di ibrido viene detto citoplasmatico (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2017).

Negli anni, dunque, sono state diverse le tecniche tradizionali (conventional breeding techniques - CBT) che si sono susseguite e che tutt'ora vengono impiegate. L'European Food Safety Authority (EFSA), per poterle scindere dalle Nuove Biotecnologie di Miglioramento Genetico (New Breeding Technologies, NBT), ha pubblicato un documento dove i diversi metodi appresi fino ad oggi sono descritti e ben distinti, riportando anche quelli utilizzati su animali e microorganismi (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2017).

Facendo una panoramica generale sulle tecniche convenzionali, si ha per prima la propagazione per seme, che è la forma di riproduzione naturale della specie, con la quale si può procedere operando incroci interspecifici (ibridazione) o intraspecifici; questi vengono effettuati accoppiando tra loro varietà di piante già selezionate per i propri tratti, o con parenti selvatici con caratteri simili a quelli ricercati, e ottenendo una progenie migliorata. L'esempio emblematico in cui vengono applicati gli incroci, è quello dei porta-innesti. Successivamente, spesso applicati di seguito agli incroci, sono effettuati anche reintroci (back-crossing), riutilizzando la pianta madre, con lo scopo di introdurre geni di particolare interesse e creare un pool genico di élite, e che in piante autogame ha dato lignaggi puri e non affetti da riduzioni di dimensioni o vigore. Al contrario, soggetti allogami hanno mostrato sintomi da depressione da inbreeding (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2017).

Può capitare talvolta, come già accennato in precedenza, che le piante che si vogliono incrociare, risultino fra loro sessualmente incompatibili, creando quindi un limite all'introduzione di geni favoriti. Sono state però sviluppate metodologie che superano questo problema. Si può ad esempio procedere con un incrocio indiretto, sfruttando un soggetto terzo che sia compatibile con le due specie tra loro incompatibili creando un 'ponte' fra esse; si procede incrociando la pianta 'ponte' prima con uno dei due soggetti principali e successivamente l'ibrido interspecifico ottenuto sarà incrociato al secondo soggetto principale. Una ulteriore problematica che può verificarsi nelle piante allogame in cui è stata però effettuata un'impollinazione incrociata è lo sviluppo di embrioni ibridi che non sono in grado di maturare e dare frutto (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2017).

Questa situazione può essere risolta con un'impollinazione naturale, rimuovendo successivamente l'embrione dall'ovario fecondato e sistemandolo in un terreno di coltura dove potrà completare con successo il suo sviluppo. Nel caso in cui l'obiettivo finale fosse quello di ottenere piante estremamente vigorose e con frutti di dimensioni particolarmente abbondanti, vengono effettuati accoppiamenti tra varietà frutto di diversi incroci di ritorno tra piante 'consanguinee' con altre piante sempre frutto di incroci tra 'consanguinei'. Così facendo si ha un estremo sfruttamento dell'eterosi, ossia la superiorità fenotipica che la progenie derivante da incroci ha rispetto alle piante madri non incrociate (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2017).

3.3 Il miglioramento genetico tradizionale nella vite

Nel precedente paragrafo, sono stati menzionati in maniera sintetica diversi metodi tradizionali di miglioramento genetico applicati alla vite, è quindi opportuno analizzarle più approfonditamente. Nei prossimi paragrafi ciascun metodo verrà esaminato nel dettaglio, mettendo in evidenza i principi su cui si basa e le modalità di applicazione, assieme alle possibili limitazioni.

3.3.1 Selezione clonale

Una parte fondamentale del miglioramento di una specie, è la selezione dei soggetti che presentano caratteristiche migliori. Poiché la vite presenta un alto grado di variabilità genetica ma soltanto genotipi unici vengono coltivati in campi monovarietalì, è fondamentale preservare l'identità varietale. Per questo il materiale da propagare va attentamente selezionato. La selezione massale, basata su osservazioni di tipo morfologico, è il modo più antico che ci permette di fare ciò (Palliotti et al., 2021). La selezione clonale è l'evoluzione della selezione massale, e si occupa di analizzare sia sotto il punto di vista genetico che sanitario i cloni all'interno di una stessa cultivar. Spesso viene usata su cultivar tradizionali, che presentano un alto fattore di eventi mutageni che possono portare a varianti sfavorevoli.

Una cultivar è essenzialmente un complesso di piante che sono tra loro morfologicamente simili, ma che si distinguono da altri gruppi di piante coltivate almeno grazie ad un carattere trasmissibile mediante la propagazione agamica. Le piante afferenti ad una varietà devono essere omogenee e stabili, ossia mantenere ciò che le caratterizza sia nel tempo che nello spazio. Oltretutto, in seguito alla Direttiva CEE n. 68/193 del 1968 (recepita in Italia con Dpr 1164 del 1969), è stato stabilito che

il materiale destinato alla coltivazione sia certificato, ossia sottoposto al protocollo di selezione clonale (Palliotti et al., 2021).

Il protocollo tecnico è stato definito dalla normativa nazionale aggiornato GU n.195 del 21/08/2008 ed è a grandi linee strutturato nei seguenti passaggi: vengono innanzitutto esaminati vecchi vigneti o zone dove potrebbero trovarsi viti relitte, alla ricerca di piante che abbiano subito mutazioni a un singolo o molteplici caratteri. In seguito, dagli individui scelti, verranno prelevati i tralci in quantità sufficiente da poter impiantare almeno un campo di confronto, dove verranno effettuati controlli attitudinali e morfologici. Successivamente, i tralci saranno sottoposti a test immunoenzimatici (ELISA) e biomolecolari (PCR), andando ad eliminare tutti i campioni che possono presentare virosi quali: GFLV (virus dell'arriccimento della vite), ArMV (virus del mosaico), GLRaV 1,2,3 (virus dell'accartocciamento fogliare), virosi trasmesse da cocciniglie, GVA e GVB (legno riccio) e GFkV (agente della maculatura infettiva o fleck). Questi campioni scartati saranno successivamente sottoposti a saggi arborei (indexaggio) e quelli esenti dai virus sopramenzionati, saranno sottoposti ad eventuale risanamento con termoterapia - in celle termoregolate a 38-40°C per 30-60 giorni, coltura meristemica *in vitro* - basata sul principio che il virus segue un gradiente di distribuzione, risultando meno concentrato negli apici radicali e dei germogli - o rigenerazione per embriogenesi somatica (Palliotti et al., 2021). Una volta terminati gli accertamenti, verranno messi a dimora in zone vocate alla viticoltura uno o più campi di confronto clonale, costituiti da almeno ventiquattro elementi, suddivisi in minimo due parcelle distinte, cercando di garantire una produzione di almeno cinquanta chilogrammi. Nel corso degli anni, i campioni verranno osservati e descritti morfologicamente, annotando i periodi delle fasi fenologiche (germogliamento, fioritura, invaiatura e maturazione) e successivamente, eseguendo un confronto con una pianta 'testimone', verranno annotati il peso del legno di potatura, la fertilità reale, la produttività e le dimensioni dei grappoli.

Sono oltretutto necessarie analisi di pH, zuccheri e acidità titolabile del mosto (analizzando anche antociani e polifenoli per i campioni a bacca rossa), che verranno effettuate minimo per tre anni, effettuando sempre test di confronto con mosto da campioni 'testimoni'. Inoltre nell'arco di almeno due anni vanno valutate le potenzialità enologiche dei campioni attraverso microvinificazione e successive analisi chimiche e sensoriali del vino post stabilizzazione e imbottigliamento. Infine per garantire una corretta classificazione, vengono eseguite anche analisi biomolecolari mediante microsatelliti, specialmente nell'eventualità che il soggetto sia clone di una varietà con elevata variabilità genetica o di origine dubbia (Palliotti et al., 2021). Uno step importante è la successiva propagazione agamica del materiale viticolo, mirata a mantenere le caratteristiche varietali e clonali, e che può essere effettuata in diversi modi.

Possono essere utilizzate talee, qualsiasi parte di pianta che in condizioni di crescita sia in grado di dare origine ad una nuova pianta, che daranno poi barbatelle franche che saranno innestate direttamente in campo. Queste sono generalmente ottenute da tralci (distinti in legnosi, semi legnosi o erbacei a seconda del loro stato vegetativo) dotati di una o più gemme. Per favorire la rizogenesi preimpianto, vengono conservate in celle frigorifere, in modo da ridurre la concentrazione di inibitori come l'acido abscissico (ABA) (Palliotti et al., 2021).

3.3.2 Riproduzione sessuata - incroci interspecifici (ibridazione) e incroci intraspecifici

La riproduzione sessuata, o propagazione per seme, si verifica quando due cellule riproduttive aploidi, derivate da processo di meiosi, si uniscono in uno zigote - una cellula diploide - che contiene le informazioni genetiche necessarie allo sviluppo di un nuovo individuo. Dunque, si tratta di un'unione per via gamica di due individui interfertili. Questo processo di incroci spontanei, seguito da una selezione operata dall'uomo, è quello da cui derivano la maggior parte delle cultivar attualmente diffuse ed è anche quello che garantisce più variabilità genetica.

Nel caso della viticoltura, sia nel momento di un nuovo impianto che nel caso sia necessario il rinnovamento di alcuni individui, risulta molto importante garantire omogeneità vegeto-produttiva e qualitativa, poiché è fondamentale ai fini di ottenere prodotti che rispettino determinati requisiti caratteristici e qualificativi. Per questo motivo la propagazione per seme viene principalmente adottata in ambito di miglioramenti genetici e non nella normale coltivazione della vite, evitando dunque in quell'ambito le ricombinazioni casuali che avvengono con questo metodo. Questa tecnologia ha dunque come principale obiettivo quello di creare nuovi genotipi con caratteristiche specifiche e che possano quindi portare un miglioramento; questo viene garantito da una prima selezione dei genitori e successivamente della progenie ottenuta, assicurandosi di scegliere quella che manifesti i geni ricercati (Palliotti et al., 2021).

Gli incroci possono essere fatti tra individui appartenenti a specie o generi diversi, dando vita a ibridi interspecifici, oppure in maniera intraspecifica, ossia facendo accoppiare individui appartenenti alla stessa specie (Pirello et al., 2023).

Il procedimento generale da applicare negli incroci rimane abbastanza semplice e si compone da relativamente pochi passaggi. Per prima cosa vengono identificate le piante genitori; successivamente la varietà padre verrà insacchettata prima della fioritura e la varietà madre demasculata, ossia privata

di calipre e antere, e successivamente insacchettata. Quando la varietà madre raggiunge la fase di fioritura, viene effettuata tramite il polline prelevato dalla pianta padre un'impollinazione artificiale; questo passaggio risulta talvolta complicato nel caso in cui le varietà scelte non abbiano lo stesso periodo di fioritura, soprattutto se la madre risulta precoce. Infine, una volta sviluppatasi e maturate le bacche, vengono prelevati i vinaccioli e messi a germinare ottenendo così plantule semenziali ognuna diversa geneticamente dalle altre, dando quindi vita a varietà potenzialmente diverse (Palliotti et al., 2021).

Degli esempi di varietà derivanti da incroci intraspecifici operati dall'uomo, sono le varietà a bacca bianca Müller-Thurgau (derivante dall'incrocio tra Riesling renano x Madleine Royale) e l'Incrocio Bruni 54 (ibrido tra Sauvignon Blanc x Verdicchio). La maggior parte delle varietà di vite però è frutto di incroci spontanei, come nei casi del Cabernet Sauvignon (Cabernet Franc x Sauvignon Blanc) e il Sangiovese, la cui origine è ancora dibattuta (Palliotti et al., 2021).

Una forma di incrocio intraspecifico, usata raramente come mezzo di miglioramento, è quella dell'autofecondazione. Ha come obiettivo il fissaggio di caratteristiche varietali particolarmente rilevanti, ma considerati i problemi di depressione da inbreeding sofferti dalla vite, non è molto conveniente. Può essere usata come ultima risorsa nel caso in cui una varietà sia estremamente virosata e non sia possibile effettuare un risanamento in vitro.

Gli ibridi interspecifici invece, ossia generati da individui appartenenti a specie o generi diversi, sono stati utilizzati per la prima volta all'inizio del XX secolo come strategia per combattere la fillossera della vite (*Daktulospharia vitifoliae* Fitch, 1856) e con due obiettivi: creare portainnesti resistenti - che tutt'oggi vengono ancora utilizzati- e ibridi che avessero sia la resistenza delle viti americane che produzioni qualitative e quantitative comparabili a quelle della *V. vinifera*, facendo anche attenzione che questi potessero adattarsi ai diversi terreni.

Nella Tabella 1 sono riportati i principali tipi di gruppi di ibridazione dai quali sono derivati i più diffusi portainnesti di vite (Palliotti et al., 2021).

<i>V. riparia x V. rupestris</i>	Couderc 3309 101-14	Scarsa tolleranza a calcare e siccità Vigoria media Buona radicazione per talea Apparato radicale superficiale
<i>V. berlandieri x V. riparia</i>	420 A Kober 5BB SO4	Apparato radicale profondo Media tolleranza a calcare ma scarsa resistenza a siccità Vigoria medio-alta
<i>V. berlandieri x V. rupestris</i>	1103 Paulsen 140 Ruggieri 110 Richter	Tolleranza medio-alta al calcare Alta vigoria Apparato radicale profondo
<i>V. vinifera x V. berlandieri</i>	41 B Fercal	Apparato radicale profondo Molto resistente al calcare Buona tolleranza alla siccità Alta vigoria
<i>V. vinifera</i> (v. Carignan) <i>x V. riparia x V. rupestris</i>	Golia	Buona capacità di radicazione Buona resistenza a calcare Adattabile a terreni asciutti e leggermente clorosanti Alta vigoria

Tabella 1 | *Principali portainnesti resistenti alla fillossera* (Palliotti et al., 2021)

I primi tentativi di ottenere ibridi produttori diretti furono condotti da costitutori privati in Francia, arrivando ad ottenere quelli che furono chiamati ‘ibridi di prima generazione’. I primi risultati ottenuti diedero progenie non del tutto resistenti a fillossera e alle altre crittogame, e avrebbero quindi avuto la necessità di essere innestate, ma davano soprattutto risultati scadenti dal punto di vista enologico. Un esempio di questo tipo di ibrido è la varietà Isabella, detta anche uva fragola, frutto di un incrocio tra *V. vinifera x V. labrusca*. Negli anni, anche grazie all’avvento dell’introggressione dei geni, sono state ibridate varietà di vite portatrici di resistenza (piante donatrici) con varietà commerciali (piante recipienti) con l’obiettivo di ottenere varietà resistenti alle principali avversità biotiche - peronospora, oidio e botrite - e stress abiotici. La progenie ottenuta, pur presentando un’alta

percentuale di genoma di *V. vinifera*, risulterà una nuova varietà non considerata *V. vinifera* (Pirello et al., 2023).

In seguito a questa operazione però la pianta recipiente viene utilizzata per operare numerosi incroci di ritorno con *V. vinifera* effettuando selezioni ricorrenti per preservare i tratti di resistenza ottenuti e cercando di ottenere uve di qualità. Purtroppo, un problema legato all'applicazione di questo metodo, è che si tratta di un processo piuttosto dispendioso e che non garantisce al cento per cento risultati agronomici soddisfacenti (Pirello et al., 2023).

Un ulteriore problema, in questo caso legislativo, è che dal 1965 in Italia e nel resto paesi facenti parte della Comunità Europea furono vietate le vinificazioni con uve che non derivassero dalle cultivar di *Vitis Vinifera* e dal 1975 venne vietato anche solo di piantare vitigni ibridi nei nuovi vigneti. Negli ultimi anni sono stati fatti alcuni aggiustamenti a livello normativo e sono stati ammessi alla vinificazione anche questi ultimi, fatta eccezione per la produzione di vini di qualità prodotti in regioni determinate (VQPRD - categoria che, a seguito del Reg. Ce 479/2008, recepito con il DL n.61 del 2010 in Italia, è stata assorbita dalla categoria DOP). La CE riconosce comunque ad ogni suo stato membro la libertà sulla scelta di autorizzare o meno la messa a dimora di varietà interspecifiche per condurre ricerche o produrre uva (Palliotti et al., 2021).

In questi anni, l'Istituto di Genomica Applicata dell'Università di Udine ha messo assieme i migliori ibridi provenienti dal continente europeo, incrociandoli con vitigni tradizionali di alto pregio, ottenendo centosettanta individui da analizzare. Questi ultimi sono stati poi saggiati in campo, dando diciotto ibridi che sono stati selezionati al termine della ricerca. Nel 2015, Vivai Cooperativi di Rauscedo ha selezionato dieci di questi nuovi vitigni per la loro resistenza peronospora e oidio; successivamente il Ministro delle Politiche Agricole li ha ufficialmente inseriti nel Registro delle varietà, anche se ancora non ne è consentito l'uso per la produzione di vini DOC. Per citare alcune varietà registrate, abbiamo come varietà a bacca bianca il Fleurtaï (Tocai x 20/3), Soreli (Tocai x 20/3), Sauvignon Kretos, Sauvignon Nepis e Sauvignon Rytos (rispettivamente Sauvignon Blanc x 20/3, Sauvignon B. x Bianca e nuovamente Sauvignon x Bianca). Per i vitigni a bacca rossa ricordiamo Cabernet Eidos (Cabernet Sauvignon x Bianca), Cabernet Volos (Cabernet Sauvignon x 20/3), Merlot Kanthus (Merlot x 20/3), Merlot Chorus (Merlot x 20/3) e infine la varietà Julius, ottenuta da un incrocio tra Regent x 20/3 (Palliotti et al., 2021).

Nel 2022, il numero di varietà ottenute da incroci interspecifico registrate ammontava a trentasei, con una superficie coltivata che supera il centinaio di ettari, principalmente incentrata nel Nord Italia, assieme a Marche ed Abruzzo. Il nome con cui sono noti è Pilzwiderstandsfähig (PIWI), ossia “viti resistenti ai funghi” e in seguito al regolamento pubblicato dalla Gazzetta Ufficiale dell'Unione

Europea del 6/12/2021, l'UE ha approvato l'inserimento dei vigneti PIWI nella categoria dei vini a Denominazione di Origine, anche se in realtà l'Italia non accetta tutt'ora questa direttiva (Pirello et al., 2023).

3.4 Tecniche biotecnologiche di miglioramento genetico

3.4.1 Genetica molecolare

Per rendere più veloce la selezione degli ibridi e di conseguenza il miglioramento genetico della vite, possono essere applicate delle metodologie che sfruttano le conoscenze della genetica molecolare.

Nel 2007 l'international grape genome programme (IGGP) ha generato la prima sequenza di genoma da un clone di Pinot Noir (ENTAV 115) utilizzando il metodo Sanger e la shotgun sequencing, permettendo così di comprendere l'organizzazione genomica della *Vitis vinifera*. In contemporanea, furono svolti esperimenti anche sul "clone" PN40024, che essendo frutto di molte autofecondazioni presenta un elevato stato di omozigosi. Questa caratteristica non lo rende una varietà di tipo commerciale, ma è stato fondamentale per semplificare il lavoro di ricostruzione ordinata dei cromosomi della sequenza del DNA, che è estremamente utile per comprendere come funzioni la variabilità che si presenta tra gli individui all'interno della stessa specie.

Con la progressione nello studio della genetica molecolare, sono stati sviluppati approcci genomici per la caratterizzazione genetica di tratti complessi e per la selezione assistita da marcatori, come la Genome-Wide Association Studies (GWAS) e la selezione genomica (GS) (Butieuc-Keul et al., 2023).

La prima tecnica, tradotta come lo studio dell'associazione genomica - o epidemiologia genetica (GWAS) è stata utilizzata per comprendere le basi genetiche dei tratti più importanti e per identificare i marcatori molecolari polimorfici associati ad essi, con l'obiettivo di utilizzarli poi nei programmi di selezione assistita da marcatori.

Diversamente dall'epidemiologia genetica, la selezione genomica consente la previsione di un valore di riproduzione di genotipi testati sulla base di molti set di marcatori. Pertanto, operare una selezione genomica, può ridurre significativamente i costi per la selezione assistita da marcatori, limitando le dimensioni e il numero necessario di esperimenti sul campo.

Purtroppo, va menzionato che basandosi su dati di marcatori genomici per la previsione del fenotipo, queste tecniche sono leggermente difficili da utilizzare in specie altamente eterozigoti come la vite, specialmente lo studio dell'associazione genomica (Butieuc-Keul et al., 2023).

Quindi, il rilevamento di marcatori molecolari associati a tratti poligenici è influenzato anche dalla dimensione del campione e dalla densità del marcatore molecolare utilizzato.

Grazie ai progressi fatti in questo campo di ricerca però, ora è possibile operare a costi nettamente più contenuti, arrivando anche a ri-sequenziare interamente un individuo e ottenere informazioni che saranno alla base della selezione di nuovi incroci. O ancora, è possibile identificare delle sequenze di nucleotidi, analizzando elemento per elemento, individuando quale parte del genoma è responsabile di una determinata caratteristica (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2017).

Le applicazioni della genetica molecolare comprendono anche tecniche che permettono l'inserimento di informazioni genetiche senza che gli organismi siano compatibili sessualmente tra loro, portando ad una espansione del pool genico disponibile. Le tecniche appartenenti a questa categoria più comunemente usate, fanno uso di acidi nucleici ricombinanti.

Il DNA esogeno inserito può contenere uno o anche più geni di tratti interessanti, che vengono accoppiati ad un vettore. Questo complesso, formato da DNA e vettore, prende il nome di 'costrutto' e, per essere stabile ed essere in grado di esprimersi, deve prima integrarsi nel genoma dell'ospite o replicarsi indipendentemente come parte del plasmide (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2017).

A seconda del tipo di vettore e della cellula ospite coinvolta, il processo di alterazione genetica di una cellula tramite l'assorbimento diretto e l'integrazione di DNA esogeno dall'ambiente esterno attraverso la membrana cellulare viene definito trasformazione o trasfezione. Con 'trasformazione' si intende l'introduzione di materiale genetico non virale, come plasmidi o DNA cromosomico, all'interno di batteri e cellule eucariotiche non animali. Con 'trasfezione' si intendono approcci non virali come l'elettroporazione e l'uso di liposomi, con cui vengono veicolati acidi nucleici purificati o privi di rivestimento, in cellule animali.

Infine, si può parlare di 'trasduzione' nel caso del meccanismo che utilizzano i batteriofagi per trasferire i geni nei batteri; con questo termine può essere indicato anche il trasferimento genico in cellule eucariote mediato da virus (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2017).

Tra le diverse metodologie di genetica molecolare, applicate alla vite, troviamo ad esempio tecniche di trasformazione genetica come cisgenesi, transgenesi, metodi biolistici (gene gun), elettroporazione e trasformazioni mediate da *Agrobacterium tumefaciens* S. e T. (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), 2017).

3.4.2 Marker assisted selection

I marcatori molecolari sono stati tra i primi metodi di genetica molecolare sfruttati per permettere l'identificazione delle cultivar di vite. Essi possono essere analizzati per determinare il genotipo, sfruttando l'associazione fisica tra un marker presente nel cromosoma e il gene che determina un certo carattere. Per questo si tratta di un processo di selezione inversa, poiché si concentra sul marker (sia esso morfologico, biochimico o basato su una modifica del DNA o dell'RNA) piuttosto che sul gene stesso. La comodità sta anche nel fatto che, qualora si disponesse di più marker associati, è possibile sfruttare la MAS anche per più caratteri, specialmente se - come nel caso della induzione alla resistenza ad un patogeno - si vogliono unire più geni che codificano lo stesso carattere nello stesso genotipo (Palliotti et al., 2021).

Inoltre, i marcatori sono sfruttati per operazioni di identificazione varietale (fingerprinting), per individuare i parentali di una specifica varietà e realizzare mappe genetiche. Nei primi anni 2000 infatti, è stata sviluppata una grande collezione di marcatori molecolari associati ai vari caratteri quantitativi - o in inglese, QTL, quantitative trait loci - permettendo dunque di mapparli (Butieuc-Keul et al., 2023).

Il primo tipo di marcatore ad essere stato usato è l'SSRs (simple sequence repeat), che grazie alla sua stabilità e co-dominanza viene considerato tra i migliori marcatori selettivi. Questi vengono anche chiamati microsatelliti. Negli anni sono stati poi scoperti e sfruttati altri marcatori altamente polimorfici, come ad esempio il RAPD (random amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified length polymorphism) e SCARs (sequence characterized amplified regions). Inoltre, come strumento integrativo, per creare mappe genetiche più dense, sono stati affiancati all'SSRs dei marcatori di tipo SNPs (single nucleotide polymorphism), che però si sono rivelati più efficaci nella caratterizzazione varietale, piuttosto che quella clonale. Di conseguenza, con lo sviluppo e l'applicazione dei marcatori molecolari, sono stati individuati sempre più tratti di resistenza (R loci) contro le principali infezioni fungine (Pirello et al., 2023).

I microsatelliti presentano un alto livello di polimorfismo ed hanno co-dominanza ed ereditabilità mendeliana. Inoltre, sono altamente ripetibili e danno la possibilità di attribuire ad un singolo allele un valore assoluto in maniera precisa, permettendo di creare delle banche dati sui profili genetici di ogni cultivar (Palliotti et al., 2021).

La stabilità dei marcatori li rende affidabili, rendendo possibile una previsione precisa di quali piante della progenie ottenuta portino effettivamente il gene che si voleva trasferire. Oltre a questo, presentano diverse caratteristiche a loro favore, come il fatto di essere abbondanti nel genoma e che non siano influenzabili né dall'ambiente, né dallo stadio di sviluppo in cui si trova la pianta.

La marker-assisted selection (MAS) può quindi accelerare, semplificandolo, il processo di selezione di semenzali resistenti tra quelli ottenuti, tracciando l'introggressione dei loci d'interesse e permettendo di capire, a seguito di molti meno incroci di ritorno, quali individui hanno accumulato più porzioni cromosomiche dalla pianta madre usata per eliminare dalla linea tratti indesiderati e lasciando così solo i geni utili (Directorate-General for Research and Innovation (European Commission)).

3.4.3 Gene stacking (piramidazione)

Il “gene stacking” è un protocollo spesso proposto per migliorare le cultivar d'élite esistenti, poiché sfrutta la conoscenza dei loci (QTLs) di resistenza a peronospora e oidio. Grazie al gene stacking, che prevede l'assemblaggio di più geni di resistenza in un solo genotipo, la resistenza risulta più persistente, poiché i patogeni dovrebbero mutare molte più volte per poter superare le difese della pianta ospite. Inoltre, anche la resistenza a stress abiotici ha più possibilità di sviluppare una durata a lungo termine.

In sintesi, si tratta di un processo mediante il quale vengono combinati diversi geni di interesse, isolati da diverse piante di partenza, con l'obiettivo di creare individui che abbiano simultaneamente tutti i caratteri selezionati (Yali; 2024).

Per applicare il gene stacking possono essere utilizzati due tipi di approccio. Il primo è quello del metodo tradizionale di incrocio: come si può osservare nella Figura 1, si procede incrociando a coppie le piante madri con geni d'interesse differenti (es. P1 con P2), selezionando tra la progenie gli individui che presentino i tratti interessanti e procedendo con altri incroci tra le piante figlie ottenute dalle altre coppie genitrici, ad esempio incrociando $H_{(1)(2)}$ e $H_{(3)(4)}$ e successivamente $H_{(1,2)(3,4)}$ con

$H_{(5)(6)}$. Questo tipo di approccio si basa principalmente sull'ibridazione, operando quindi con cicli di incroci di ritorno, gene pyramiding e creazione di pedigree (Hospital et al., 2004).

Purtroppo però si tratta di un metodo lento, laborioso e leggermente impreciso, non facendo uso di marcatori molecolari.

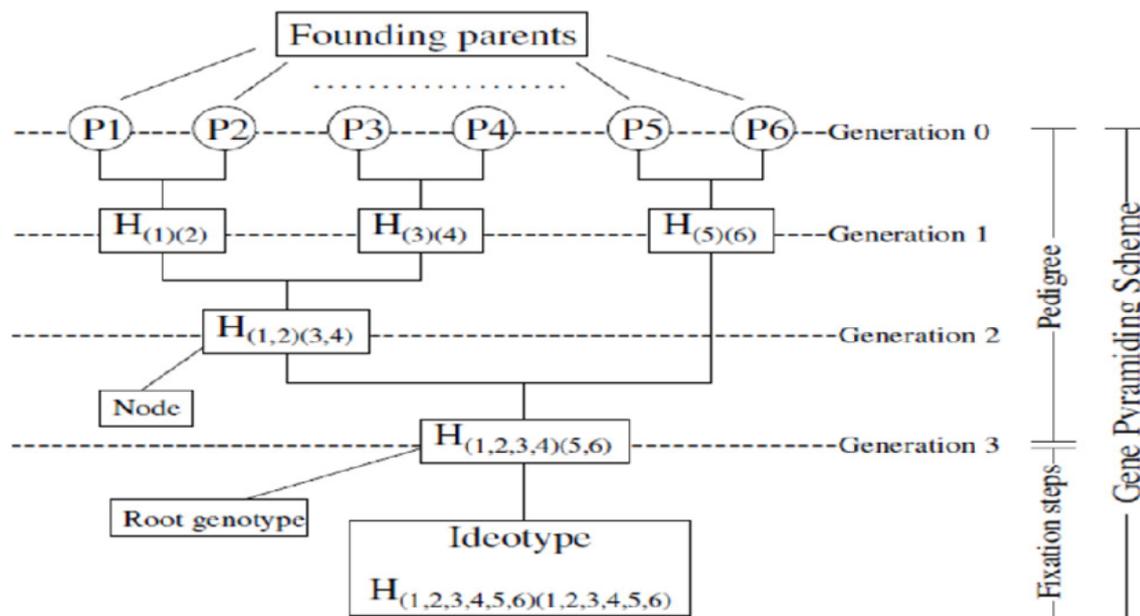


Figura 1 | Schema del metodo tradizionale del gene pyramiding (Hospital et al., 2004)

Il secondo metodo si basa sull'uso della tecnologia di assistenza fornita dai marcatori molecolari legati ai geni target e viene appunto detta “marker assisted gene pyramiding” (MAGP). Oltre a presentare una precisione molto maggiore, rispetto al metodo tradizionale, è molto più veloce. Se infatti senza marker sono necessari almeno sei generazioni per recuperare il 99.2% della parte ricorrente del genoma, sfruttando la MAGP sono necessari solamente due o tre generazioni per trasferire i geni o i QTLs ricercati, dal genoma delle piante madri, a quello della progenie (Pirello et al., 2023).

Inoltre, geni scelti per essere combinati possono avere diverse origini. Si può infatti procedere per GS verticale (se i geni di resistenza hanno tutti come target lo stesso patogeno o parassita, conferendo alla pianta una difesa a quell'organismo più forte); GS orizzontale (i geni conferiscono resistenza a diversi patogeni, parassiti o stress abiotici, creando una protezione più ad ampio spettro); major e minor GS (vengono uniti geni di resistenza più alta e geni con efficacia più moderata o solo parziale, dando un risultato più stabile); approccio transgenico (i geni incorporati provengono da individui non appartenenti alla stessa specie, sfruttando quindi l'ingegneria genetica vengono introdotti tratti normalmente non presenti nel pool genico della specie a cui verranno trasferiti); infine QTL

pyramiding (vengono per l'appunto combinati diversi quantitative trait loci, sfruttando la loro associazione a tratti complessi come produzione, resistenza a siccità e ad altre malattie).

Grazie al gene stacking, l'Università di Udine è riuscita ad ottenere una progenie d'élite combinando geni della famiglia *Ren/Run* per la resistenza ad *Erisiphe Necator*, rilasciando delle nuove varietà resistenti ai patogeni, tra cui Fleurtaï, Soreli e Cabernet Volos (Pirello et al., 2023).

Infine, il gene pyramiding è un prezioso strumento per la moderna agricoltura, che grazie al suo contributo nel creare piante resistenti a malattie, parassiti e nell'aumentare anche la resistenza a stress ambientali, rende possibile un approccio più ecologico che permette agli agricoltori di utilizzare meno pesticidi (Pirello et al., 2023).

3.4.4 Cisgenesi, transgenesi e intragenesi

Per definizione, la transgenesi è il processo di alterazione genetica di una pianta attraverso l'inserimento di uno o più geni che derivano da un organismo non appartenente alla stessa specie, sessualmente incompatibile e talvolta anche non derivante da una pianta.

La cisgenesi, al contrario, utilizza materiale genetico proveniente dalla stessa specie della pianta da modificare, o comunque da una specie sessualmente compatibile. Il processo di cisgenesi effettua una trasformazione genetica utilizzando l'unità genetica completa, includendo quindi anche gli elementi regolatori.

L'intragenesi invece viene effettuata in vitro, ricombinando e trasferendo elementi, come ad esempio promotori, isolati da diversi geni e riassembrandoli in un costrutto chimerico.

Sia nella cisgenesi che nell'intragenesi, al contrario della transgenesi, non vengono ottenuti prodotti che contengano DNA sequenziale proveniente da organismi che non siano piante e di conseguenza, i marcatori selettivi e gli eventuali residui di vettori non vengono espressi.

La cisgenesi può anche verificarsi spontaneamente in natura, o attraverso gli incroci tradizionali, ma con un miglioramento rispetto a quest'ultima: i tempi richiesti sono più corti e si riduce il rischio di trasmissione alla progenie di tratti potenzialmente dannosi (Pirello et al., 2023).

Una curiosità riguardo alla transgenesi, è che anch'essa talvolta può avvenire in natura: parrebbe infatti, stando a una ricerca effettuata da Kyndt e colleghi nel 2015, che le patate dolci siano frutto di alterazioni avvenute naturalmente a seguito di un'infezione da *Agrobacterium tumefaciens*.

Nonostante l'ampia scelta di geni di resistenza, la frequente mancanza di promotori e marcatori selettivi associati ad essi, la cisgenesi applicata alla vite risulta complicata; viene infatti utilizzata molto raramente come mezzo per indurre resistenza a malattie fungine e a oomiceti. Attualmente è noto un solo caso in cui è stata effettuata con successo l'applicazione della cisgenesi con questo obiettivo, ossia tramite il trasferimento, da Chardonnay a Thompson, del gene *VvTL-1*, che codifica una proteina simile alla taumatina e che vanta un ampio spettro di attività antifungina (Pirello et al., 2023). Alcune piante così trasformate, osservate in serra, hanno avuto come risultato una posticipazione di circa una settimana nello sviluppo di sintomi da oidio. La pecca di questo esperimento è che anche se catalogato come approccio cisgenico, in realtà la progenie presentava sia promotori virali che marcatori. Questo fatto quindi la dovrebbe collocare più vicino ad una applicazione di transgenesi.

Un caso di migliorata tolleranza all'oidio è stato ottenuto mediante il trasferimento di geni, isolati da diverse specie *Vitis* alla *V. vinifera*, appartenenti alla categoria degli stilbeni. Questi composti sono infatti composti fenolici che si accumulano nei siti d'infezione ed esercitano un'azione antimicotica, inibendo la germinazione dei conidi. In alternativa sono stati usati anche dei geni appartenenti alla (PR) protein pathway correlata alla patogenesi; queste proteine sono solubili e sono anch'esse rilasciate a seguito di stress biotici o abiotici e hanno la capacità di aumentare la resistenza alla *Plasmopara viticola*. Un miglioramento nei confronti della risposta a *P. viticola* è stato ottenuto anche mediante la trasformazione di *V. vinifera* mediante l'ausilio di un gene (*VaHAESA*) isolato da *V. amurensis* (Pirello et al., 2023).

Per contrastare la Botrytis cinerea, è stato utilizzato su un portainnesto 41B e su un individuo di cv. Sagraone, il gene (*VSTI*), responsabile della codifica della stilbene sintetasi. Questo approccio è stato confrontato con l'utilizzo di promoter PR10 (derivato da alfa-alfa) e del promoter 35S. I risultati ottenuti hanno evidenziato una riduzione di sintomi, probabilmente come conseguenza all'aumento di produzione di resveratrolo, che viene già prodotto naturalmente dalle piante a scopo protettivo nei confronti di agenti patogeni come funghi e batteri (Pirello et al, 2023).

Per concludere, parlando di approcci transgenici, la famiglia delle chitinasi si sono dimostrate efficaci come risposta ad *E. necator*. Due chitinasi isolate dal riso (*Chi11* e *RCC2*), applicati mediante transgenesi a piante di *V. vinifera* hanno infatti portato ad una maggior resistenza nei confronti del patogeno. Lo stesso risultato è stato ottenuto anche mediante l'utilizzo del costrutto genico doppio (*ech42-nag70*), isolato da *Trichoderma* spp., combinato al gene isolato da *Arabidopsis thaliana* (*RESISTANCE TO POWDERY MILDEW 8 - RPW8.2*) (Pirello et al., 2023).

Il problema più grande che riguarda gli approcci cisgenici e transgenici, è che le piante prodotte con esse vengono considerate OGM dal punto di vista legislativo. Questo è problematico dal punto di vista comunicativo, poiché i consumatori ignorano le tecniche biotecnologiche con cui si ottengono queste piante, e ciò genera preoccupazioni circa possibili rischi per la salute, come ad esempio allergie e intolleranze, specialmente per quello che riguarda la transgenesi.

Da questo punto di vista la cisgenesi, non presentando residui di DNA esogeno nel genoma della pianta ospite, potrebbe in parte risolvere le attuali problematiche di biosicurezza, con maggiore possibilità di essere accettata dai consumatori (Pirello et al., 2023).

Nella figura 2 è riportato uno schema dove vengono messi a confronto il metodo di incrocio tradizionale, la transgenesi e la cisgenesi.

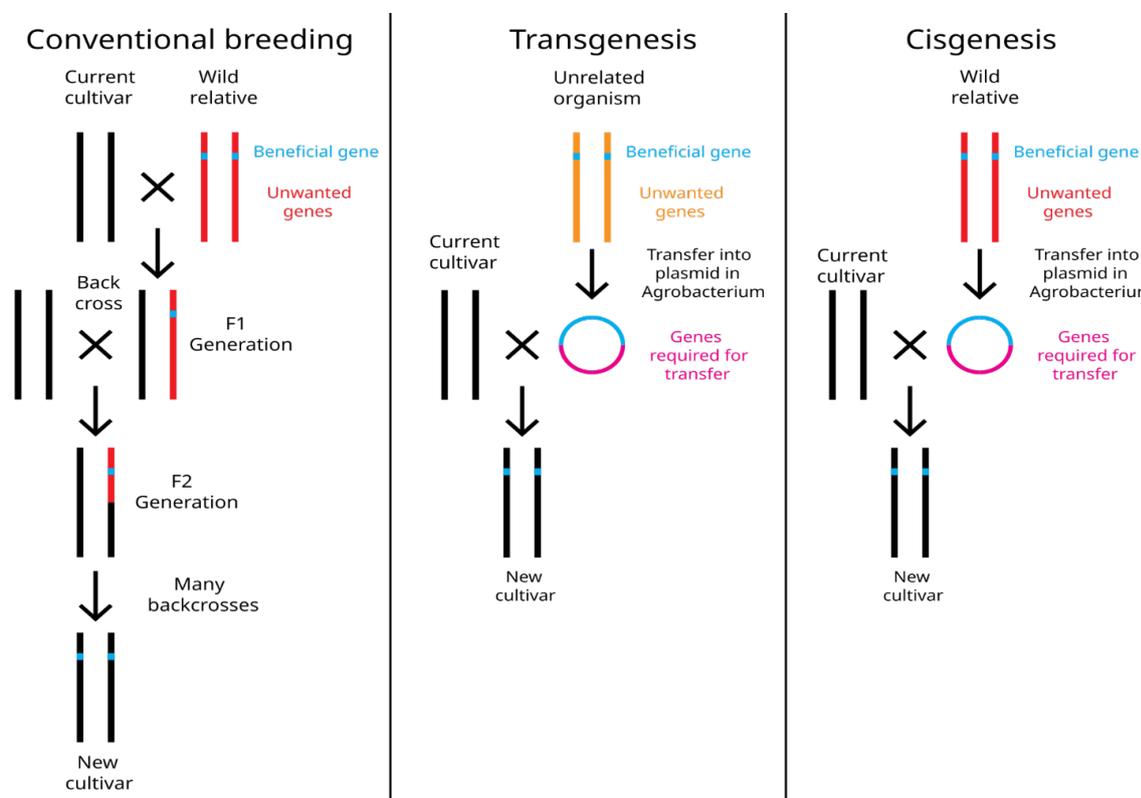


Figura 2 | Schema di confronto tra metodo di ibridazione tradizionale, transgenesi e cisgenesi (Copyright Wikipedia)

3.4.5 La trasformazione genetica e l'uso di *Agrobacterium tumefaciens*

Le trasformazioni genetiche in generale sono, come il Gene Stacking, operazioni che permettono di trasferire, inserire e integrare uno o più geni provenienti da un organismo all'interno di un altro, creando così organismi geneticamente modificati (OGM). Inoltre, non è necessario che vi sia

compatibilità sessuale tra organismo donatore e pianta ricevente. In questo modo si parlerà di transgenesi, altrimenti se compatibili sessualmente si parlerà di cisgenesi.

Il trasferimento dei geni può essere mediato attraverso l'ausilio di *Agrobacterium tumefaciens*, un batterio ubiquitario presente nel terreno e che quando penetra in una ferita di una pianta, è responsabile di formazioni tumorali chiamate galle (Palliotti et al., 2021).

La figura 3 mostra delle galle causate da *A. tumefaciens*.



Figura 3 | Galla da *Agrobacterium tumefaciens* (Clemson University - USDA Cooperative Extension Slide Series)

L'*A. tumefaciens*, trasferendo un segmento di DNA (il T-DNA) dal suo plasmide alla cellula della pianta, induce tramite l'auxina sintetasi e la citochinina sintetasi una crescita cellulare spropositata che andrà a formare la galla, e attraverso l'opine sintetasi stimolerà la produzione di opine nella cellula, così da fornire al batterio una fonte di nutrimento.

Le opine sono infatti degli amminoacidi usati dai batteri come nutrienti e presentano due classi strutturali: le opine derivate da ammine secondarie, ottenute dalla condensazione di un aminoacido con un chetoacido o uno zucchero (ne fanno parte le nopaline e le octopine) e le agrocinochine, che strutturalmente sono gluco-fosfodiesteri (Palliotti et al., 2021).

La trasformazione mediata da questo batterio avviene sfruttando il suo naturale meccanismo d'infezione; quando è presente una ferita nella vite, essa inizia a produrre elicitori (sostanze che stimolano la reazione di difesa della pianta) che vengono captati dai recettori *virA*, che a loro volta attivano il *virG* che funge da attivatore della trascrizione dei geni della virulenza del Ti plasmide.

Vengono così attivate due endonucleasi (*virD1* e *virD2*), che verranno ripetute in sequenza alla fine del T-DNA, del quale verrà duplicato un filamento, con un'estremità dotata di un'endonucleasi *virD2*,

che lo guiderà all'interno della cellula ospite. Nella Figura 4 è mostrata la rappresentazione di un plasmide di *A. tumefaciens* contenete i geni necessari al batterio per indurre la formazione di galle.

Per poter utilizzare l'*Agrobacterium* come mezzo di trasformazione genetica, vanno prima asportate le sezioni utili al batterio in natura ma inutili nella trasformazione (incluse quelle che codificano la sintesi di opine, citochinine e auxine) e successivamente introdotti i geni che vogliono essere trasferiti, accoppiati ad un promoter molto forte (Pallioti et al., 2021).

La scelta del ceppo del batterio influenza il successo della trasformazione, poiché ceppi diversi sono virulenti verso specie diverse. Inoltre, risultano incisive anche la densità al momento dell'infezione, i tempi e il terreno di coltura utilizzato. Ad esempio, un ceppo utilizzato per la vite è stato il LBA4404, che però presentava una scarsa efficienza.

Successivamente, sono stati sviluppati dei ceppi iper-virulenti, tra i quali l'EHA105 che è tutt'ora il più usato. Anche AGL1 viene proposto per la trasformazione della vite, con il quale sono stati registrati buoni risultati per il trasferimento di geni target (Campos et al., 2021).

Un problema ricorrente durante la trasformazione mediata da *Agrobacterium* è la necrosi dei tessuti, una risposta di difesa della pianta che pare essere specifica della cultivar. Questo imbrunimento è probabilmente dovuto all'ossidazione di polifenoli. Essi sono infatti stati ritrovati in presenza di ferite e in risposta a stress ambientali, portando a pensare che lo stress induca il rilascio di polifenoli dai vacuoli e ad un'ulteriore produzione.

Sono state proposte ipotesi secondo le quali questa ipersensibilità sia dovuta ad ossidazioni, causate a loro volta da un'alta presenza di attività perossidasi. Utilizzando una combinazione di polivinilpolipirrolidone e ditiotreitolo su cv. "Superior Seedless", è stata inibita la necrosi dei tessuti. In futuro un ulteriore mezzo per ridurre l'imbrunimento collaterale potrebbe essere quello di utilizzare il ceppo *Agrobacterium vitis*, che è un patogeno naturale della vite (Campos et al., 2021).

Infine, grazie ai marcatori genetici è possibile distinguere le cellule che hanno subito effettivamente la trasformazione e che contengono i geni target, sfruttando anche la presenza di un agente selettivo come, ad esempio, un erbicida o un antibiotico (Campos et al., 2021).

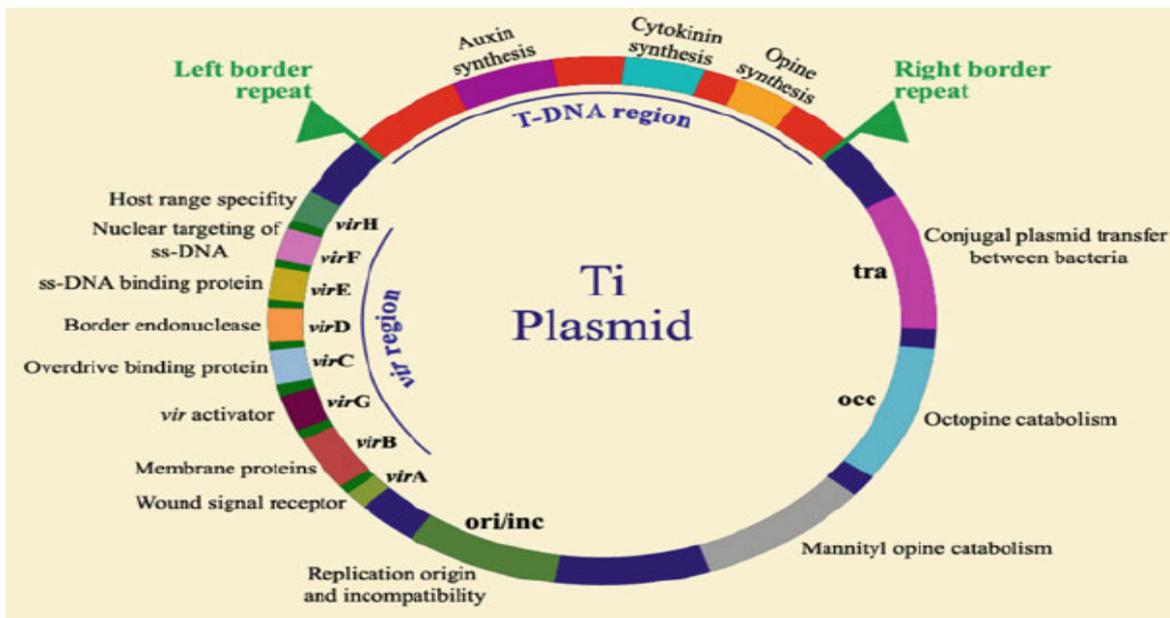


Figura 4 | *Ti plasmide dell'Agrobacterium tumefaciens, prima di essere modificato (Agrobacterium tumefaciens, Upbiotech.wordpress.com)*

3.4.6 Metodo biolistico

Poiché non sempre è possibile operare la trasformazione con agrobatterio a causa di incompatibilità con la specie, negli anni '80 è stato sviluppato il metodo biolistico. Successivamente è stato applicato alla vite a cavallo della fine degli anni '90 e l'inizio degli anni 2000. Questo, detto anche bombardamento con particelle (o gene gun), è un metodo fisico che permette il trasferimento di geni mediante microparticelle (generalmente di oro o tungsteno) ricoperte di DNA plasmidico che vengono letteralmente sparate all'interno delle cellule di una pianta target, penetrando la barriera cellulare (Dalla Costa et al., 2019).

Il procedimento, illustrato schematicamente in figura 5, consiste nell'applicare su un macro-proiettile (macrocarrier) le microparticelle ricoperte di DNA. Successivamente il macro-proiettile verrà colpito con la pressione dell'aria e sparato contro una piastra perforata (stopping screen) che lo fermerà, consentendo così solo ai microproiettili di raggiungere le cellule nel tessuto vegetale, che è conservato su una piastra Petri dall'altra parte della piastra protettiva. Quando i microproiettili entrano nelle cellule, i transgeni vengono rilasciati dalla superficie delle particelle e possono incorporarsi nel DNA cromosomico delle cellule. Dei marcatori selettivi vengono poi utilizzati per identificare le cellule che assorbono il transgene, le cellule vegetali riconosciute come trasformate vengono poi stimolate mediante ormoni per permettere loro di rigenerare nuove piante (Palliotti et al., 2021).

I difetti di questo metodo risiedono nel fatto che la cellula viene leggermente danneggiata e soprattutto non si ha la completa certezza che la particella colpisca direttamente il nucleo, ma c'è la possibilità che vada a modificare il genoma di plasmidi o dei mitocondri. Inoltre, un ulteriore problema è il tempo necessario per rigenerare una nuova pianta.

Con il progredire della ricerca si è visto che DNA, siRNA (small interfering RNA), miRNA e particelle ribonucleoproteiche (RNPs) sono trasferibili in maniera efficiente con questo metodo, anche se il DNA plasmidico è quello più facilmente utilizzabile nel caso della vite (Dalla Costa et al., 2019).

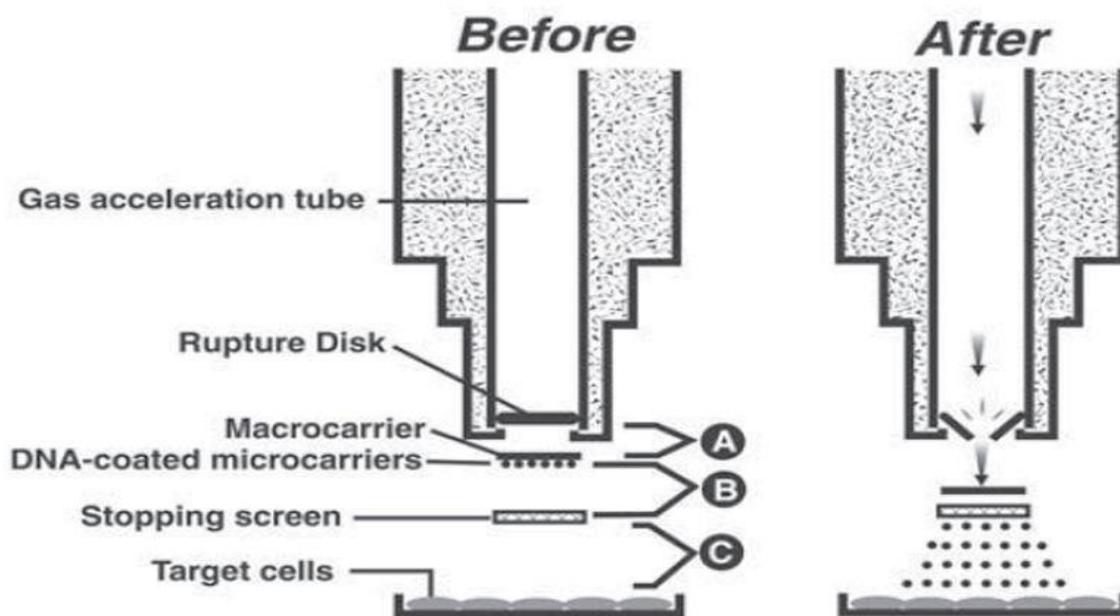


Figura 5 | *Rappresentazione schematica di una gene gun (Prasad et al., 2018)*

3.4.7 Elettroporazione

L'elettroporazione è stata inizialmente sviluppata per la trasformazione dei protoplasti (precedentemente trattati con degli enzimi, con lo scopo di rompere la loro parete cellulare ma lasciando comunque il materiale genetico intatto) e successivamente anche a cellule intere, come nel caso di riso e grano (Dalla Costa et al., 2019). Il principio di funzionamento (vedi figura 6) si basa sul creare una sospensione di cellule e geni da trasferire, per poi proseguire con l'applicazione di un forte impulso elettrico, che creerà temporaneamente dei pori nella membrana cellulare. Questo permetterà al DNA esogeno di entrare e una volta inserito, la corrente verrà tolta per permettere ai pori di richiudersi e al materiale genetico di non uscire (Sano et al., 2017).

È un metodo che, anche se al giorno d'oggi non più utilizzato sulla vite, ha come pregio quello di essere economico, poiché sono ormai presenti protocolli standardizzati e sono facilmente reperibili in commercio elettroporatori. Vanno però presi degli accorgimenti: un flusso di corrente troppo alto potrebbe danneggiare il materiale o uccidere la cellula, che può presentare essa stessa una limitazione nel caso la sua parete cellulare fosse troppo spessa (Dalla Costa et al., 2019).

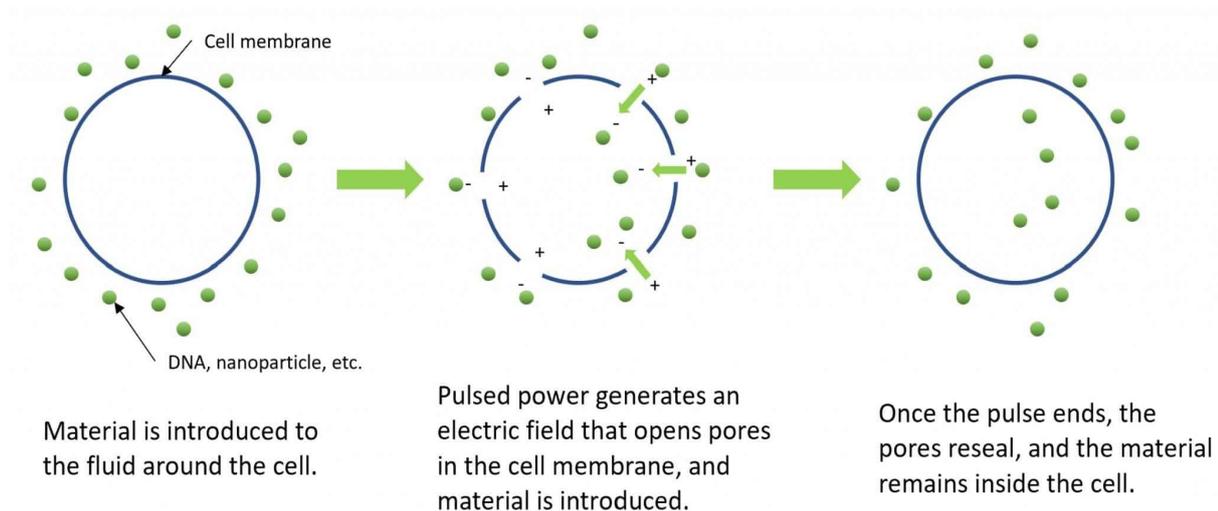


Figura 6 | Rappresentazione schematica elettroporazione (Sano, et al., 2017).

3.5 La rigenerazione delle piante

La propagazione *in vitro* viene usata per molti scopi, che vanno dalla conservazione del germoplasma al risanamento. Questo procedimento si basa sulla totipotenza delle piante, ossia la capacità di una cellula che anche se già differenziata, tramite un processo di de-differenziamento, può riprogrammarsi per generare un nuovo individuo completo di tutti gli organi. Generalmente le parti più usate per la rigenerazione sono apici meristematici, cellule isolate, meristemi gemmari o anche micro-talee erbacee.

Il protocollo della coltura *in vitro* prevede in generale questi step fondamentali: dopo aver espantato il tessuto che si vuole moltiplicare, nella maggioranza dei casi un apice meristematico, quest'ultimo verrà sterilizzato, per poi essere posto in substrati di crescita artificiali addizionati di sostanze come citochinine e auxine, garantendo il germogliamento in condizioni climatiche ottimali. Dopodiché i germogli verranno fatti radicare. La micropropagazione è quindi particolarmente vantaggiosa quando si ha la necessità di produrre rapidamente un grande quantitativo di piante a cui è richiesto un alto

standard sanitario, oppure nel caso in cui il materiale di partenza sia scarso e ci sia il bisogno di aumentarlo rapidamente. Oppure anche nel caso di specie che hanno difficoltà nel radicare. Infine possiamo sfruttarle quando le circostanze richiedono tempi molto brevi e sono disponibili solo spazi ridotti (Palliotti et al., 2021).

Un altro utilizzo della rigenerazione in vitro è quello di ottenere piante complete da cellule che hanno subito modificazioni genetiche.

La vite in passato era considerata poco predisposta alla trasformazione genetica, poiché dopo essere stata sottoposta a trasformazione e selezione tramite antibiotici, riusciva a rigenerare solamente tra il dieci e il trenta per cento del materiale. Inoltre, l'efficacia di trasformazione arrivava solo ad 1%. Superare il problema della rigenerazione dei tessuti trasformati è uno degli obiettivi principali nell'ambito della produzione di piante editate e transgeniche.

I fattori che vanno tenuti in considerazione sono: il genotipo della vite, il tipo di tessuto utilizzato e il metodo utilizzato per trasformarlo, la disponibilità di materiale rigenerabile trasformabile e infine la procedura di selezione mediata da antibiotici (Campos et al., 2021).

Nella vite, dunque, l'obiettivo precedente alla rigenerazione, deve essere la produzione di materiale in grado di rigenerarsi, abilità che dipende dal genotipo. Finora la rigenerazione è stata ottenuta con due metodologie: l'organogenesi e l'embriogenesi somatica. L'organogenesi può essere diretta quando si basa sulla capacità dei tessuti di formare nuove piante intere, direttamente dalle regioni meristematiche degli espianti, o indiretta, dalla quale deriva la variazione somaclonale, che coinvolge sia modifiche di tipo genetico ed epigenetico nelle piante rigenerate con questo metodo. Essendo richiesta un'omogeneità genetica nei soggetti trasformati, la rigenerazione è affiancata a marcatori molecolari (Butieuc-Keul et al., 2023).

L'embriogenesi somatica è uno dei migliori metodi di rigenerazione applicabili alla vite, nella quale la fonte del materiale di partenza, il tipo e la qualità delle colture embriogeniche sono fattori chiave per una trasformazione di successo (Campos et al., 2021).

Nonostante queste limitazioni però è stato comunque possibile produrre varietà resistenti a patologie fungine, virali e batteriche, grazie all'applicazione di protocolli di coltura dei tessuti in seguito a integrazioni transgeniche. Va tenuto però a mente che questo processo richiede molto tempo e l'aggiunta di antibiotici e altri reagenti, oltre che costosa si rivela anche dannosa per l'ambiente.

Per evitare l'utilizzo di questi prodotti, è stato osservato che la sovraespressione genica potrebbe essere una valida alternativa per migliorare sia il processo di trasformazione che di rigenerazione dei tessuti (Campos et al., 2021).

La rigenerazione *in vitro*, si è dimostrata essenziale per superare le difficoltà che vengono riscontrate nelle tecniche tradizionali, ma anche come metodo di preservazione e propagazione di genotipi interessanti, in alternativa alle serre, e come metodo per incrementare la variabilità genetica attraverso l'ingegneria genetica. (Butieuc-Keul et al., 2023).

Con l'avanzare delle tecnologie, i tessuti embriogenici sono diventati i più usati nelle trasformazioni genetiche e potrebbero essere anche un valido strumento per la risanazione di piante virosate. Tuttavia, alcuni genotipi sono risultati molto recalcitranti all'embriogenesi somatica. Nella vite la variazione somaclonale potrebbe anche apparire in seguito a diversi cambiamenti genetici dovuti a variazioni nella disposizione spaziale degli strati cellulari; ad esempio, le chimere periclinali, che sono piante stabili che producono gemme ascellari che hanno la stessa organizzazione del meristema terminale da cui sono state originate (Butieuc-Keul et al., 2023).

Generalmente gli embrioni somatici della vite derivano da una singola cellula e, come è stato osservato in un campione di Pinot Meunier mediante l'ausilio di microsatelliti, le caratteristiche clonali non sono state passate alla progenie. Tuttavia, diversi biotipi di Pinot Meunier presentano tre alleli nel locus VVS2; così come cloni di Pinot Noir, Pinot Gris e Pinot Blanc hanno due alleli sempre in questo locus. Questi cloni sembrerebbero essere quindi frutto di una mutazione di Pinot Meunier, che è stata poi trasmessa alla progenie attraverso la propagazione vegetativa di una chimera periclinale. Una situazione simile è stata osservata anche nel locus VVS19 nel callo embriogenico indotto dagli strati cellulari dei filamenti dell'antera nella cv. Primitivo (Butieuc-Keul et al., 2023).

Altri studi hanno dimostrato che la variabilità intracultivar all'interno del Pinot Nero e dello Chardonnay è dovuta anche a mutazioni in uno dei due alleli in uno degli strati cellulari del Pinot Meunier e al suo mantenimento attraverso la propagazione vegetativa di una chimera periclinale. Dunque, l'embriogenesi somatica può essere uno strumento estremamente importante per comprendere le origini, le strutture genetiche e le relazioni tra cultivar antiche e dovrebbe essere presa in considerazione prima di utilizzarle per la micropropagazione, la conservazione genetica o la trasformazione. Per concludere, considerata l'importanza dell'embriogenesi somatica nel miglioramento genetico e tenuti in conto i fattori critici che ne influenzano il successo, è necessario lo sviluppo di protocolli genotipo-specifici, adattabili alla maggior parte delle viti e facilmente riproducibili è strettamente necessario (Butieuc-Keul et al., 2023).

4. NUOVE METODOLOGIE BIOTECNOLOGICHE

4.1 Introduzione alle New Breeding Technologies

Le tecniche di miglioramento genetico classificate come “New Breeding Technologies” o (NBT), comprendono diversi metodi. Il più noto e che garantisce più precisione è il genome editing, in particolare l’uso di nucleasi programmabili, che è stata una delle svolte nell’ambito dell’ingegneria genetica applicata alle piante.

Queste nucleasi, infatti, sono degli enzimi in grado di tagliare il DNA in siti specifici del genoma, inducendo una rottura nel doppio filamento (induced double strand breaks - DSBs) che verrà poi riparata automaticamente dal meccanismo naturale di riparazione delle cellule, ovvero tramite l’unione delle estremità non omologhe (non-homologous end joining - NHEJ) che potrebbe indurre a variazioni a livello nucleotidico, o mediante ricombinazione omologa (homologous recombination - HDR) nel caso siano presenti nel DNA donatore bracci omologhi. In questo modo i risultati più probabili saranno o l’eliminazione o la sostituzione di un gene (Dalla Costa et al., 2019).

Le nucleasi programmabili più spesso utilizzate sono per la maggior parte appartenenti a tre classi, ossia le “zinc finger nucleases” (ZFNs), attivatori della trascrizione (transcription activator-like effector nucleases - TALENs) e infine “clustered regularly interspaced short palindromic repeats” (CRISPR), che potremmo tradurre come "brevi sequenze palindrome ripetute raggruppate a intervalli regolari", le quali sono associate alla nucleasi Cas9 (CRISPR associated protein 9) (Dalla Costa et al., 2019).

4.2. La CRISPR/Cas9

Inizialmente scoperto analizzando il sistema di immunitario adattativo dello *Streptococcus pyogenes*, il sistema CRISPR/Cas9 è il più apprezzato tra quelli attualmente disponibili per la trasformazione genetica, questo grazie alla sua semplicità e alla sua efficacia (Dalla Costa et al., 2019). Inoltre, è meno costoso più semplice da usare e più veloce rispetto alle altre tecniche enzimatiche (Pirello et al., 2022). Questa tecnologia è infatti già stata ampiamente usata per introdurre mutazioni in geni d’interesse sia in studi su piante e animali, ma anche in campo medico. Il suo funzionamento (Figura 7) avviene tramite gli RNA guida (gRNA), normalmente composti da uno spaziatore (spacer), complementare alla sequenza di DNA desiderata, e un complesso in grado di formare ‘impalcature’

(scaffold forming complex) con la Cas9. Di seguito, il complesso formato da Cas9 e l'RNA guida, scansiona il genoma per trovare complementarità, separando i due filamenti del DNA. Questo passaggio è fondamentale per trovare il sito target ed è reso possibile grazie al motivo adiacente al protospaziatore - protospacer-adjacent motif (PAM) - che viene riconosciuto dalla nucleasi. Una volta che il sito target sarà stato riconosciuto, la sopra menzionata nucleasi inizierà il processo di rottura del doppio filamento (DSB) - double-strand break process - che indurrà ad una mutazione che porterà ad un inserimento o un'eliminazione specifica (INDEL - insertion/deletion) nella sequenza del gene (Dalla Costa et al., 2019). La rottura del doppio filamento sarà poi riparata da uno dei due meccanismi, naturalmente presenti nelle cellule, che potranno sfruttare la giunzione terminale non omologa (non-homologous end joining - NHEJ), seguita da mutazioni in sito dovute alla INDEL di alcuni nucleotidi nel gene target, o la ricombinazione omologa (homologous recombination - HR o HDR) nel caso in cui il DNA sia in grado di essere ricombinato (Butieuc-Keul et al., 2023). Un esperimento effettuato su campioni di *E.Coli* viventi, ha valutato la cinetica della nucleasi Cas9 misurando il tempo necessario per separare i due filamenti di DNA e per la ricerca di complementarità al gRNA. Il risultato ottenuto ha mostrato che ogni target potenziale, ossia ogni regione che avesse un sito PAM, si lega in meno di 30 millisecondi permettendo di trovare uno singolo target specifico in circa sei ore (Dalla Costa et al., 2019).

Un problema legato alla CRISPR/Cas9, nonostante sia comunque migliore rispetto all'uso di ZFNs o TALENs, è la possibilità che possano avvenire occasionalmente mutazioni off-target. Inoltre, è un metodo influenzato da diversi parametri, come la metodologia, il genoma della pianta, il gene target, la rigenerazione *in vitro* e le condizioni di selettività (Pirello et al., 2022). Altri parametri che influenzano il risultato sono più specifici, come il riconoscimento del target, il design del gRNA, la scelta del promoter della Cas9, la frequenza delle riparazioni attraverso ricombinazione omologa, la potenziale presenza di proteine anti-CRISPR che possono inattivare la Cas9 e infine il mezzo di inserimento del gene nei tessuti della pianta ospite (Butieuc-Keul et al., 2023, Pirello et al., 2022).

Generalmente il gRNA e Cas9 sono inserite nelle cellule delle piante mediante diversi metodi, tra i quali *Agrobacterium*, vettori virali, PEG-mediated transformation, metodi biolistici, elettroporazione o nanoparticelle, e spesso la barriera cellulare può limitare significativamente l'efficacia di molti di questi mezzi. Per questo motivo il mediatore più usato è comunque l'*Agrobacterium* (Butieuc-Keul et al., 2023). L'alta specificità richiesta ai siti PAM adiacenti ai siti target limita il numero di target potenziali ed anche la dimensione delle nucleasi può risultare eccessiva, e quindi ostacolare il corretto funzionamento delle macchine utilizzate per l'editing che operano attraverso l'uso di complessi di endonucleasi o particelle virali. Per questo gli obiettivi attuali sul miglioramento di questa tecnica

riguardano il miglioramento della precisione (prevenendo quindi mutazioni indesiderate), una ricerca per espandere i siti PAM riconosciuti dalla nucleasi e la riduzione delle dimensioni delle molecole.

Attualmente, grazie ad amminoacidi chiave mutagenizzanti di SpCas9, sono state ottenute varianti di Cas più specifiche e in grado di riconoscere diverse sequenze PAM. Inoltre, diversi SpCas omologhi sono stati trovati all'interno di specie batteriche, che hanno mostrato diverse specificità ai siti PAM e dimensioni più contenute (Dalla Costa et. al, 2019).

Nonostante questi incomodi, l'applicazione del genome editing mediante CRISPR/Cas9 può comunque risultare molto utile in viticoltura, poiché le modifiche che apporta sono minime ed incentrate per la maggior parte in genotipi selezionati, quindi senza alterazioni al background genomico, che invece potrebbero verificarsi con tecniche di breeding tradizionale, preservando l'identità varietale (Pirello et al., 2022).

4.2.1 Applicazioni della CRISPR/Cas9 nella vite

I metodi applicati con successo alla vite sono due e riguardano da una parte l'integrazione stabile di componenti genomiche attraverso il trasferimento di geni mediato da *A. tumefaciens*, e dall'altra il trasporto diretto mediante l'uso di una proteina Cas9 e di un RNA guida purificati (Dalla Costa et. Al, 2019).

Una delle prime applicazioni di CRISPR/Cas9 mediata da *Agrobacterium* su vite, è stata fatta su una sospensione cellulare di Chardonnay con un singolo plasmide, contenente un RNA specifico a guida singola (sgRNA) che ha come target il gene L-idonate deidrogenasi (*IdnDH*) per alterare la via biosintetica dell'acido tartarico. Successivamente, in calli embriogenici delle varietà Neo Muscat, Chardonnay e del portainnesto 41B, tramite vettori binari di CRISPR/Cas9, è stato eliminato con successo il gene che codifica la fitoene deidrogenasi (Pirello et al., 2022).

Il primo tentativo di editare in genoma per indurre resistenza a *B. cinerea* fu eseguito su Thompson Seedless, avendo come target il gene fattore di trascrizione (TF) *VvWRKY52*; le mutazioni indotte di questo gene hanno portato ad una riduzione dello sviluppo di colonie fungine, specialmente nelle linee mutanti bialleliche.

Successivamente, la CRISPR/Cas9 è stata utilizzata anche per ottenere progenie mutanti di *V. vinifera* nelle quali fosse assente l'espressione dei geni *Downy Mildew Resistance 6* (DMR6) e *Mildew Locus O* (MLO), questi infatti sono geni di suscettibilità (S) sia nei confronti di *P. viticola* che *E. necator*.

La loro eliminazione ha quindi portato a un miglioramento della resistenza a questi patogeni fungini e oomiceti (Pirello et al., 2022).

Negli anni successivi alla prima applicazione di CRISPR/Cas9 su vite, sono stati utilizzati due promoter (*AtU6* e *AtU3*) ottenuti da *Arabidopsis spp.* per regolare l'espressione della sequenza dell'RNA guida. Inoltre, nel 2021 sono stati identificati nella vite quattro promoter *VvU3* e *VvU6* e due promoter dell'ubiquitina (UBQ), dimostrando che l'uso dei promoter identificati (*VvU3/VvU6* e UBQ2) è ampiamente in grado di incrementare l'efficienza dell'espressione dell'RNA guida e della Cas9.

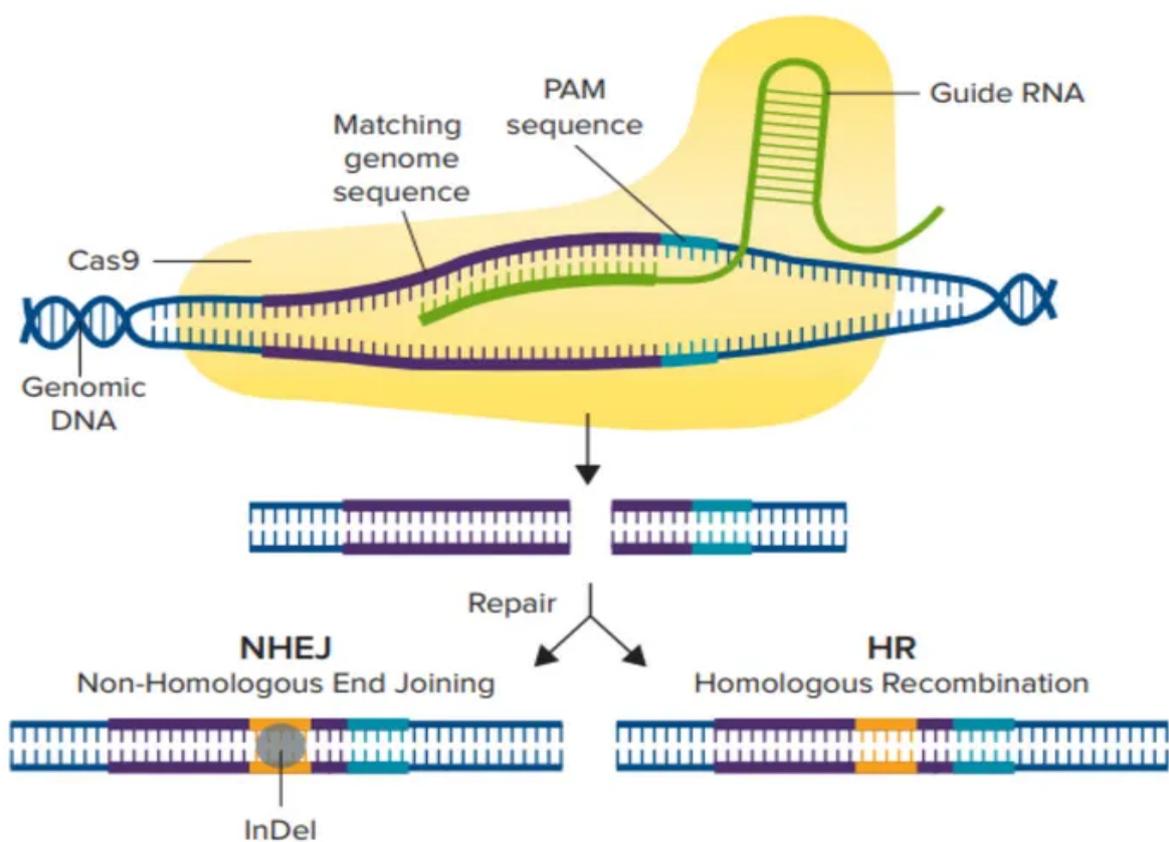


Figura 7 | Schema del funzionamento dell'azione di rottura del doppio filamento da parte della CRISPR/Cas9, che sarà poi riparata dal meccanismo di giunzione terminale non omologa (NHEJ) o di ricombinazione omologa (HR). (Hoang Ha, 2017)

Ricapitolando, i componenti della CRISPR/Cas9 hanno diversi metodi con i quali possono essere applicati alla cellula ospite: sottoforma di acidi nucleici; con geni codificanti Cas9 e gRNA trasportati usando vettori; con geni codificanti gRNA clonati all'interno di vettori assieme a Cas9 ricombinante e infine sottoforma di complesso ribonucleoproteico (RNP), costituito *in vitro* con una proteina Cas9 e un RNA guida trascritto *in vitro* o *in vivo* (Pirello et al., 2022). Purtroppo, il collo di bottiglia di

queste tecniche di genome editing, è l'uso di acidi nucleici applicando l'*Agrobacterium* come mediatore. Di conseguenza trovano gli stessi ostacoli legali delle varietà transgeniche.

L'utilizzo di RNP però, potrebbe risultare una metodologia valida per editare il genoma senza dover ricorrere alla introgressione di DNA esogeno. Va però tenuto presente che non potrebbe essere indotta una trasformazione mediante *Agrobacterium*; dunque, vi è la necessità di sviluppare ed implementare un nuovo metodo di associazione RNP, che appunto non sfrutta DNA esogeno nelle specie editate, in un sistema di trasformazione rapido, efficiente e che richieda una spesa contenuta.

Attualmente le migliori proposte sono le particle gun (le stesse del metodo biolistico) o le trasformazioni mediate da glicole polietilenico (PEG-mediated transformation) (Pirello et al., 2022).

Una prima applicazione diretta di RNP nei protoplasti della vite è stata effettuata su Chardonnay, dimostrando la possibilità di operare senza DNA esogeno, e successivamente perfezionata negli anni seguenti, adattando il protocollo per l'editing genomico nei protoplasti della vite. Tuttavia, la difficoltà principale riguarda la rigenerazione delle piante a partire da singole cellule.

Recentemente, per aggirare questo problema, è stato applicato su calli embriogenici cv. Crimson Seedless un metodo che ha sfruttato protoplasti transfettati - precedentemente modificati sul gene *VvDMR6-2* (downy mildew susceptibility gene), responsabile della suscettibilità alla peronospora - raggiungendo l'obiettivo di ottenere la rigenerazione completa di piante modificate a partire da protoplasti. Grazie al successo di questa ricerca, è stato dimostrato che è possibile superare anche lo scoglio della rigenerazione della vite, dando buone prospettive per il futuro dell'editing genetico su questa coltura. In tutti i casi che escludono l'uso di complessi ribonucleoproteici, la parete cellulare rimane un ostacolo, poiché la sua struttura e composizione è complessa e specifica del tessuto; inoltre potrebbe anche variare nel tempo, andando a complicare ulteriormente la situazione (Pirello et al., 2022).

Recentemente, in Italia, presso l'Università di Verona (Spin off EdiVite) è stato sviluppato e brevettato l'applicazione dell'editing genomico Dna-free nella vite tramite l'utilizzo di cellule private delle loro pareti (*protoplasti*) e la successiva rigenerazione ad intera pianta. Le piante editate sono state valutate per la resistenza a *peronospora*, uno dei principali agenti patogeni della vite, e al momento si trovano in serra nella sede del dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona.

4.3 Meccanismi a RNAi

L'RNAi è uno dei più importanti meccanismi naturali di regolazione e difesa coinvolti nel controllo della crescita, dello sviluppo e della risposta delle piante agli stress biotici o abiotici. Questo meccanismo permette il controllo sull'espressione dei geni endogeni e regola la risposta delle piante agli acidi nucleici indesiderati, ai trasposoni e all'attività dei transgeni.

Il meccanismo di silenziamento dell'RNA coinvolge in modo coordinato diversi componenti chiave, come le proteine Dicer-Like o (DCL), le proteine Argonaute (AGO) e le polimerasi RNA-dipendenti (RDR), che sono responsabili della genesi di sRNA da 21-24 nucleotidi e della loro funzione biologica. Questi geni sono stati trovati in diverse piante e ne sono stati descritti in dettaglio i ruoli nel sistema di difesa delle piante (Pirello et al., 2022). Sebbene una molecola di double-stranded RNA (dsRNA) funga da precursore per la successiva produzione di small RNA (sRNA), questi ultimi possono essere classificati in base alla loro origine come: small/short-interfering RNA (siRNA), micro-RNA (miRNA) o siRNA trans-attivi (ta-siRNA).

Durante il silenziamento genico trascrizionale, l'sRNA caricato sulle proteine AGO recluta le DNA metiltransferasi per metilare i residui di citosina del gene bersaglio corrispondente nel genoma, mentre durante il silenziamento dei geni post-trascrizionale, il complesso sRNA-AGO esamina il citoplasma alla ricerca di trascrizioni complementari per scissione e degradazione.

Dalla sua scoperta, che risale a quasi più di venti anni fa, l'RNAi è stato ampiamente utilizzato nella genetica inversa e nella genomica funzionale per ridurre l'espressione dei geni responsabili del controllo della tolleranza allo stress abiotico, dei processi di sviluppo e di altre risposte delle piante, nonché nelle attività di protezione delle colture per il controllo della resistenza a parassiti e patogeni (Pirello et al., 2022).

Finora, gli approcci RNAi convenzionali si sono basati sull'uso di virus vegetali ricombinanti indeboliti (virus-induced gene silencing, VIGS), transgeni espressi transitoriamente mediati da *Agrobacterium* e piante transgeniche trasformate stabilmente che usano l'espressione del dsRNA per silenziare geni specifici che controllano i tratti target (host induced gene silencing, HIGS).

Nonostante l'efficacia di questa tecnologia, l'uso e il commercio di colture transgeniche basate su RNAi, continua a destare preoccupazione e a ricevere critiche diffuse da parte dell'opinione pubblica, specialmente in merito a potenziali conseguenze a lungo termine sulla salute umana e sull'ambiente. A questo proposito, lo sviluppo di vettori di espressione virale, a bassa o nulla patogenicità, per l'applicazione di VIGS nelle colture pone sfide tecniche e di sicurezza (Pirello et al., 2022).

Il meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS) è ancora poco esplorato nella vite rispetto ad altre colture; tuttavia, questi meccanismi di silenziamento sono stati applicati in diversi modi durante l'interazione ospite-patogeno, prendendo di mira sia le sequenze ospite che quelle patogene.

Osservando il patogeno dunque, nello specifico *B. cinerea*, si è verificato il silenziamento dei geni della risposta immunitaria in *V. labrusca*, producendo piccoli RNA (sRNA) attraverso il sistema dicer-like per stabilire l'infezione. A questo proposito, è stata sviluppata una strategia PTGS basata su *BcDCL1* e *BcDCL2* come geni bersaglio del patogeno, ottenendo così un "silenziamento del silenziamento", che ha mostrato una crescita ridotta dei funghi con conseguente mitigazione della patogenicità. Un approccio simile è stato utilizzato per la gestione della peronospora prendendo di mira *PvDCL1* e *PvDCL2*, i geni responsabili del silenziamento di *P. viticola* durante l'infezione della vite (Pirello et al., 2022).

Oltre ai determinanti della relazione ospite-patogeno, un'infezione può anche essere contenuta sfruttando direttamente i meccanismi molecolari alla base dei processi vitali dell'organismo patogeno. Un esempio in cui è stato applicato questo approccio riguarda un campione di *Botrytis cinerea* su *V. vinifera* cv. Moscato, in cui sono stati identificati tre geni: *BcCYP51* (o *erg11*), *Bcchs1* e *BcEF2b*. Il gene *erg11* nello specifico, codifica una lanosterolo 14 α -demetilasi appartenente alla superfamiglia del citocromo P450 mono-ossigenasi (CYP), che controlla un passaggio chiave nel percorso biosintetico dell'ergosterolo, ed è un composto specifico dei funghi e il bersaglio dei principali prodotti antifungini a base di triazolo.

La chitina-sintasi 1 invece è coinvolta nell'accumulo di chitina nella parete cellulare fungina e la sua inattivazione in *B. cinerea* determina una crescita stentata a causa di una parete cellulare fungina indebolita. Infine, il fattore di allungamento 2, catalizza la traslocazione ribosomiale ed è il gene bersaglio dei prodotti commerciali derivati dalla sordarina (Pirello et al., 2022).

Indipendentemente dalla modalità di applicazione utilizzata, è stato osservato un crollo della virulenza di *B. cinerea* in tutti i trattamenti rispetto al controllo.

Analizzando la pianta ospite invece, la famiglia dei geni *Mildew Locus O* (*MLO*) della vite contiene i geni *S* di suscettibilità che *E. necator* usa durante il suo ciclo infettivo (Pirello et al., 2022).

I geni *S* della famiglia *MLO* sembrano regolare negativamente i percorsi di difesa associati alle vescicole e dipendenti dalla proteina actina nel sito di penetrazione di *E. necator*. Dei quattro geni *S* identificati in *V. vinifera* (*VvMLO6*, *VvMLO7*, *VvMLO11* e *VvMLO13*), solo gli ultimi tre sono noti per essere sovra regolati durante l'infezione da parte dell'oidio.

Una strategia di knockdown basata sul silenziamento genico indotto dall'ospite (HIGS) ha mostrato una diminuzione della gravità dei sintomi dell'oidio fino al 77%, silenziando *VvMLO7* in combinazione con *VvMLO6* e *VvMLO11* nella cv. Brachetto, senza effetti pleiotropici osservati.

Un altro lavoro sui geni S ha coinvolto il targeting del gene della vite *VvLBD1f7*, che codifica una proteina (LBD) contenente il dominio LOB (Pirello et al., 2022). Il prodotto di questo gene è il presunto omologo di un fattore di trascrizione LBD, lateral organ boundaries domain, un repressore dei meccanismi di difesa mediati da jasmonato nelle radici di *Arabidopsis* durante l'infezione del fungo parassita saprofita *Fusarium oxysporum*. La funzione interrotta di questo gene porta a una maggiore resistenza ai patogeni.

Un procedimento di silenziamento genico post-trascrizionale applicato con successo su *V. vinifera* (cv. Pinot noir) ha dato come risultati una significativa diminuzione della crescita e della sporulazione di *P. viticola* (Pirello et al., 2022).

Come già accennato, a causa delle forti restrizioni sulle principali tecniche di ingegneria genetica, la ricerca si è recentemente concentrata sullo sviluppo di metodi che non comportino la modifica del genoma ospite e, pertanto, non portino alla produzione di varietà considerate geneticamente modificate dalla legislazione vigente. Per queste ragioni, gli approcci basati su RNAi esogeno potrebbero essere una strategia più facilmente accettata e anche rispettosa dell'ambiente, basandosi sull'applicazione esogena diretta di molecole di RNA (dsRNA e/o sRNA) per migliorare la qualità delle colture e non facendo uso di DNA ricombinante. In seguito ai risultati emersi nell'applicazione di vari metodi RNAi per lo sviluppo di resistenza da parte delle piante, l'evidenza di come l'applicazione esogena di polinucleotidi possa influenzare i livelli di mRNA di importanti geni correlati alla virulenza di patogeni o piante si è rivelata fondamentale nel contesto dello sviluppo di nuove tecniche e strategie per la protezione delle colture (Pirello et al., 2022).

Ad esempio, descrivendolo in dettaglio, il silenziamento genico indotto da spray (spray induced gene silencing, SIGS) consente l'assorbimento di dsRNA da parte di cellule e tessuti vegetali, con l'RNAi machinery creato dalla pianta ospite o direttamente veicolato a livello cellulare del patogeno, innescando così il silenziamento genico attraverso l'RNAi machinery del patogeno stesso (Pirello et al., 2022).

Uno studio sperimentale ha dimostrato che l'applicazione esogena di dsRNA specifico per le trascrizioni dei geni *DCL1/2* di *B. cinerea* (che regolano l'espressione delle proteine Dicer essenziali per la produzione di sRNA) sulla superficie fogliare di *V. vinifera* ha portato a un assorbimento efficace da parte del fungo necrotrofico, migliorando così la protezione della pianta.

Inoltre, l'applicazione locale mirata di molecole di dsRNA codificanti per *VPS51* (vacuolar protein sorting 51) di *B. cinerea*, dinactina (*DCTNI*) e soppressore dell'actina (*SAC1*) su bacche d'uva ha portato a una crescita stentata del micelio del fungo e a una ridotta suscettibilità nella pianta. Utilizzando la tecnica SIGS in post-raccolta, sono stati osservati risultati positivi contro *B. cinerea* su grappoli (Pirello et al., 2022).

Tuttavia, nello sviluppo di strategie RNAi basate su dsRNA, i diversi aspetti da considerare sono la scelta del gene bersaglio, i metodi di somministrazione e la formulazione dell'incolo esogeno. Molti geni appartenenti a diverse classi che codificano per fattori di trascrizione possono essere identificati come promettenti bersagli per l'RNAi. Tra questi vi è anche la classe di geni *S* delle piante, che sono recessivi e meno adatti a programmi di selezione classica per la resistenza. Indagare queste classi di geni come possibili bersagli rappresenta una strategia promettente (Pirello et al., 2022).

4.4 Cell wall-penetrating peptides e Carbon dots

Il problema attuale delle biotecnologie applicate alle piante è l'assenza di un metodo di inserimento di biomolecole passivo e che non richieda l'aiuto di materiale genetico esterno. Le nanotecnologie cercano di risolvere questo problema, grazie alla loro ampia superficie, alla dimensione dei pori, all'abilità di trasporto, alla loro struttura, alla loro funzionalità personalizzabile nonché grazie al loro impatto ambientale quasi nullo. Ad esempio, i nanomateriali sono già ampiamente in uso come fertilizzanti e componenti antimicrobici, ad esempio nanoparticelle di rame e argento. Inoltre, un ulteriore vantaggio che porta l'applicazione di nanotecnologie a tecniche di modifica genetica, è che consente di svolgere operazioni in modo più semplice, con un'elevata efficienza. È possibile infatti utilizzare una quantità di materiale genetico anche fino a 1.000 volte inferiore rispetto alle tecniche convenzionali di modifica del DNA se si impiegano le nanotecnologie. Queste hanno inoltre maggiore versatilità, poiché le sono in grado di introdurre simultaneamente anche più molecole, tra le quali DNA, RNA e proteine. Inoltre, hanno la caratteristica di non essere dipendenti dalla specie della pianta su cui si opera e sono in grado di performare con grande successo, nonostante la presenza di ostacoli come la membrana cellulare di tessuti intatti (Campos et al., 2021).

In particolare, in agricoltura, la comunità scientifica si sta concentrando soprattutto sullo studio di una classe di nanoparticelle, i "cell wall-penetrating peptides" (CPPs), che sono apparentemente molto meno cito-tossiche rispetto ad altre nanoparticelle in oro o silicone (Pirello et al., 2022). I cell wall-penetrating peptides (o peptidi in grado di penetrare la parete cellulare) consistono in delle corte sequenze peptidiche composte da un numero compreso tra i cinque e i trenta residui di amminoacidi,

e con la capacità di facilitare la penetrazione della membrana cellulare. Recenti studi hanno infine dimostrato la loro efficacia nel trasportare all'interno di cellule diverse molecole, anche di grandi dimensioni.

Dunque, un metodo di rigenerazione che sfrutti il trasporto mediato dalle CPPs, applicato alla CRISPR/Cas9, potrebbe rappresentare una svolta per ottenere finalmente materiale viticolo modificato e privo di OGM (organismi geneticamente modificati) (Pirello et al., 2022).

I materiali carbon-based per la realizzazione delle nanoparticelle, rispetto ad altri materiali a base di metalli, hanno mostrato una tossicità ambientale molto minore e una biocompatibilità molto elevata, proprio grazie alla loro struttura a base di carbonio. Avendo il pregio di essere disponibili in diverse forme (nanosheets, nanotubes, nanodots) e dimensioni, sono una tecnologia di assistenza versatile e sostenibile e per questo facilmente apprezzati in ambito dell'agricoltura. Questi materiali, detti anche carbon dots (CDs), sono divisi in diverse classi, delle quali le più importanti sono: graphene quantum dots (GQDs), carbon nanodots (CNDs) e polymer dots (PDs) (vedi figura 8).

Queste nanoparticelle hanno generalmente una dimensione inferiore a 10 nm e hanno proprietà intrinseche di fotoluminescenza (photoluminescence, PL) regolabile, fotostabilità e biocompatibilità. Inoltre sono idrosolubili. (Campos et al., 2021).

I carbon dots, essendo molto più piccoli di materiali come i carbon nanosheets e i carbon nanotubes, sono in grado di passare molto più facilmente attraverso il biofilm di cellule di diverse specie vegetali, dimostrando efficacia anche quando applicati a tessuti vegetali immaturi e piante adulte, ma anche piante che in generale potrebbero essere ricalcitranti alle trasformazioni, come nel caso della vite. Inoltre, non è necessario l'uso di antibiotici nei terreni di coltura per la rigenerazione delle cellule trasformate, evitando così la perdita di vitalità dei tessuti e accelerando i processi di rigenerazione. Inoltre non provocano danni e non influenzano la fotosintesi o la crescita delle colture trasformate (Campos et al., 2021). I CDs sono quindi un'alternativa promettente e che può ancora essere sfruttata per migliorare la trasformazione e la rigenerazione della vite.

Nonostante non siano ancora molti i lavori di questo tipo sulla vite, questa tecnica dà buone prospettive per far fronte a protocolli di trasformazione più sostenibili, che porrebbero le basi per un miglioramento genetico della vite più affine alle attuali richieste in ambito di sicurezza alimentare e nutrizionale. Stanno oltretutto acquisendo rilevanza in quanto sono facili, veloci ed economici da produrre, richiedendo poche attrezzature per la loro realizzazione, e grazie alla loro adattabilità a diverse strategie applicative per ottenere piante geneticamente modificate. Ad esempio, i nanocomplessi formati da CD e plasmidi possono fungere da veicolo tramite il quale i plasmidi

possono essere trasportati nelle cellule somatiche delle piante, consentendo un'espressione transitoria dei geni d'interesse (Campos et al., 2021).

In figura 8, possono essere osservati i diversi tipi di Carbon Dots.

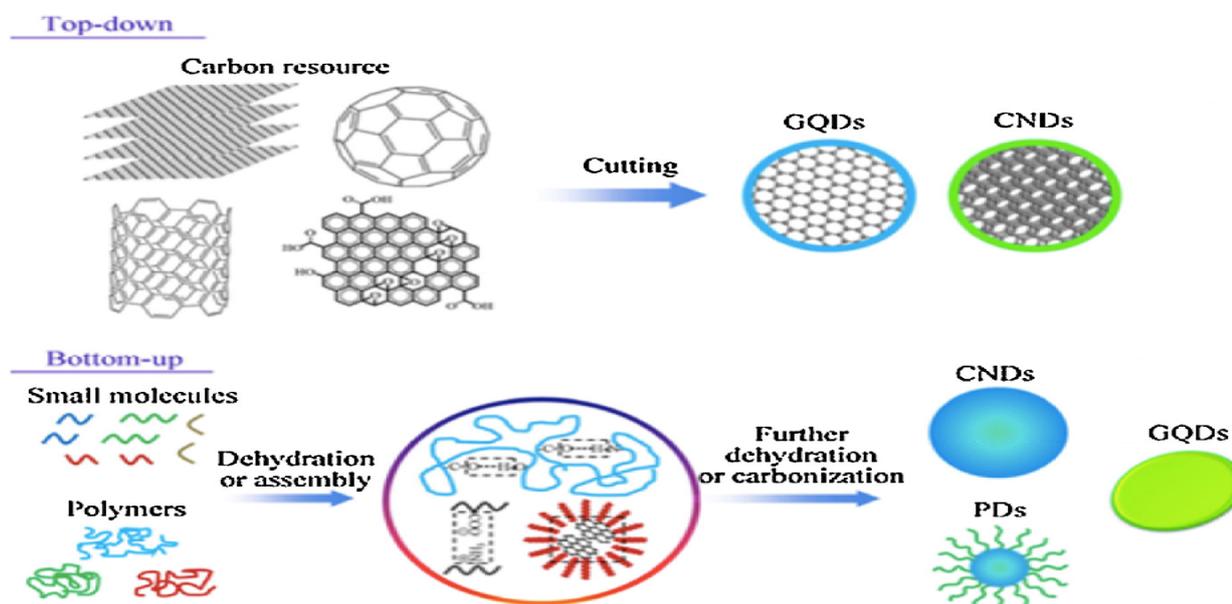


Figura 8| Rappresentazione dei Carbon Dots e come vengono ottenuti (Namdari et al., 2017)

Il primo caso di applicazione di successo delle carbon dots è stato condotto spruzzando direttamente su mais plasmidi contenenti il gene GFP e dotati di una sequenza di localizzazione nucleare (NLS) (Campos et al., 2021).

Successivamente, i carbon dots modificati con polietilenimmina (PEI) carichi positivamente, hanno fornito un sistema di rilascio del DNA altamente efficiente, garantendo un'espressione genica rapida e transitoria. In alcune piante, la resistenza può essere indotta anche immergendo direttamente le radici in complessi carbon dots-plasmidi.

Anche i nanotubi di carbonio multiparete ossidati (multi-walled carbon nanotubes - MWCNT) e quelli a parete singola (single-walled carbon nanotubes - SWCNT), sono stati studiati e non solo facilitano il trasporto di biomolecole nelle cellule vegetali, ma hanno anche funzione protettiva dei polinucleotidi nei confronti della degradazione della nucleasi, senza dover ricorrere a integrazione transgenica (Campos et al., 2021).

Dei carbon dots modificati con polietilenimmina (CDP) sono stati utilizzati per somministrare siRNA con applicazione a spruzzo, che ha portato ad un forte silenziamento dei transgeni del gene reporter GFP nei campioni. L'efficacia della loro somministrazione è stata dimostrata anche dal conseguente silenziamento dei geni endogeni che codificano enzimi necessari per la sintesi della clorofilla XL

(Campos et al., 2021). Dunque, grazie all'uso di nanoparticelle a base di carbonio, potrebbero essere ottenuti obiettivi come diminuzione dell'espressione genica, silenziamento o aumento dell'espressione genica, senza integrazioni geniche.

Su vite attualmente è stata condotta solo una ricerca di base utilizzando nanoparticelle, tuttavia si distingue già per i risultati ottenuti. È stato infatti dimostrato che i carbon dots basati sull'acido polilattico-co-glicolico (PLGA) sono capaci di attraversare la parete cellulare delle piante e la membrana delle colture cellulari di *V. vinifera* e dei funghi patogeni della vite. Per mezzo di microscopi a fluorescenza, è possibile verificare che i carbon dots di acido polilattico-co-glicolico entrino nei tessuti delle foglie di vite attraverso le aperture degli stomi, per poter essere poi assorbiti dalle radici e trasportati al germoglio attraverso i tessuti vascolari (Campos et al., 2021). I test di vitalità hanno dimostrato che i CD di PLGA non sono citotossici per le cellule coltivate in vitro di *V. vinifera*. Infine, l'assorbimento cellulare di nanoparticelle di PLGA da parte di alcuni importanti funghi patogeni della vite è un importante input per future applicazioni in agricoltura, permettendo di inserire come molecola da trasportare principi attivi antifungini.

In futuro, esperimenti di perfezionamento e ottimizzazione porteranno sicuramente a cultivar modificate molto più stabilmente e con maggiore precisione rispetto a quelle ottenute fino ad oggi. Tuttavia, come per tutti i tipi di modifiche genetiche, sarà necessario dimostrare un'efficacia elevata attraverso ricerche su diversi soggetti (Campos et al., 2021).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel corso di questa tesi, come propostosi nello scopo, sono stati analizzati e confrontati i principali metodi di miglioramento genetico tradizionali, alcuni dei quali, come l'incrocio interspecifico che ha portato ai portainnesti, hanno fatto la storia, con le nuove metodologie biotecnologiche.

I metodi tradizionali, come l'incrocio, la selezione clonale e la mutagenesi indotta, hanno dimostrato di essere efficaci nell'aumentare la variabilità genetica e nel conferire alla pianta resistenza a patogeni specifici. In particolare la selezione clonale permette soprattutto di preservare l'identità varietale e di selezionare unicamente piante che rispettino determinati criteri qualitativi e sanitari.

Tuttavia, alcune di queste tecniche hanno tempi lunghi, richiedono diversi incroci di ritorno e talvolta possono portare a mutazioni indesiderate.

Tra le metodologie più recenti, cisgenesi e transgenesi, nonostante l'efficacia dimostrata, sono ancora considerate legislativamente come OGM. Anche le trasformazioni mediate da agrobatterio purtroppo ricorrono all'uso di DNA esogeno e hanno il difetto di non essere sempre compatibili con le specie che si vuole migliorare.

Le nuove metodologie biotecnologiche, in particolare la CRISPR/cas9 abbinata all'utilizzo di complessi ribonucleoproteici, possono offrire un approccio più preciso, efficiente e che non debba ricorrere all'introduzione di materiale esterno. Tale tecnica è dunque in grado di modificare geni specifici, senza alterazioni nel background genomico, preservando comunque l'identità varietale e mantenendo una discreta stabilità genetica. Un'altra promettente opzione è rappresentata dallo sviluppo di nanomateriali non citotossici come i Carbon Dots come quelli basati sull'acido polilattico-co-glicolico, sia per il miglioramento che la rigenerazione della vite.

Un aspetto fondamentale, che accomuna sia tecniche tradizionali che nuove metodologie, è l'applicazione di protocolli di rigenerazione efficaci e che permettano, anche ad una specie come la vite che veniva in passato considerata recalcitrante, di reagire positivamente alle mutazioni indotte e rigenerare nuove piante migliorate. In particolare, la rigenerazione *in vitro* si è dimostrata estremamente utile a questo scopo, così come l'applicazione di protoplasti transfettati ha permesso di aggirare il problema della rigenerazione di nuove piante intere.

Infine parlando di eco-sostenibilità e cambiamento climatico, lo sviluppo di piante resistenti alla maggior parte delle possibili avversità che potrebbero essere trovate in campo, offre una possibilità concreta di ridurre sensibilmente l'utilizzo di pesticidi e fungicidi e permettere alle viti di resistere più facilmente a diversi stress abiotici. Questo non solo ridurrebbe i costi di gestione, soprattutto

quelli legati ai costi dei prodotti fitosanitari, ma verrebbe tutelata anche la produzione garantendone una maggiore stabilità e riducendo le perdite normalmente dovute alle malattie.

Per concludere, esprimendo un'opinione personale, l'integrazione di tecniche biotecnologiche (nonostante le normative che le limitano e l'opinione pubblica ancora diffidente nei riguardi di questi approcci) potrebbe rappresentare una svolta nel futuro della viticoltura, portando alla coniugazione di innovazione genetica, sostenibilità ambientale ed efficienza produttiva. Per questo l'innovazione va sostenuta e soprattutto la divulgazione della conoscenza sarà fondamentale per permettere al progresso di non fermarsi.

6. BIBLIOGRAFIA

Bertrand Servin, Olivier C Martin, Marc Mézard, Frédéric Hospital, Toward a Theory of Marker-Assisted Gene Pyramiding, *Genetics*, Volume 168, Issue 1, 1 September 2004, pp 513–523, <https://doi.org/10.1534/genetics.103.023358>

Butiuc-Keul, A., & Coste, A. (2023). Biotechnologies and Strategies for Grapevine Improvement. *Horticulturae*, 9(1), 62. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010062>

Campos G, Chialva C, Miras S and Lijavetzky D (2021) New Technologies and Strategies for Grapevine Breeding Through Genetic Transformation. *Front. Plant Sci.* 12:767522. doi:10.3389/fpls.2021.767522

Dalla Costa L., Malnoy M., Lecourieux D., Deluc L., Ouaked- Lecourieux F., et al. The state-of-the-art of grapevine biotechnology and new breeding technologies (NBTS). *OENO One*, 2019, 53 (2), pp.189-212. 10.20870/oeno-one.2019.53.2.2405. hal-02346687

Deo Prasad B., Kumari D., Sahni S., Ranjan T., (2018) Transgenic plants: methods and current innovations. *Plant Systematics & Biotechnology: Challenges & Opportunities*: pp 305-326

Decreto del Presidente Della Repubblica 24 Dicembre 1969, N. 1164

Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the Deliberate Release into the Environment of Genetically Modified Organisms and Repealing Council Directive 90/220/EEC (OJ L 106, 17.4.2001, pp. 1–60).

Direttiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi

Direttiva 68/193/CEE del Consiglio, del 9 aprile 1968, relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite

European Commission: Directorate-General for Research and Innovation. (2017). *New techniques in agricultural biotechnology*. Publications Office.

Gessler, C., Pertot, I., Perazzoli, M. Plasmopara viticola: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, Vol. 50, No. 1 (April, 2011), pp. 3-44. Firenze University Press on behalf of the Mediterranean Phytopathological Union

Namdari P., Negahdari B., & Eatemadi A. (2017). Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 87, 209–222. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.108>

Palliotti A., Poni S., Silvestroni O. (2021), *Manuale di Viticoltura*. Edagricole - Edizioni Agricole di New Business media srl.

Pirrello, C., Magon, G., Palumbo, F., Farinati, S., Lucchin, M., Barcaccia, G., & Vannozzi, A. (2023). Past, present, and future of genetic strategies to control tolerance to the main fungal and oomycete pathogens of grapevine. *Journal of experimental botany*, 74(5), 1309–1330. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac487>

Sano, M., Fan, R. & Xing, L., (2017) Asymmetric Waveforms Decrease Lethal Thresholds in High Frequency Irreversible Electroporation Therapies. *Sci Rep* 7, 40747

Kyndt T., Quispe D., Zhai H., Jarret R., Ghislain M., Liu Q., Gheysen G., & Kreuze, J.F. (2015). The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An

example of a naturally transgenic food crop, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112 (18) 5844-5849, <https://doi.org/10.1073/pnas.1419685112>

Yali W., (2024), Gene pyramiding and its importance in modern plant breeding, Biomedical Research and Clinical Trials,3(5); DOI: 10.31579/2835-7949/022

7. SITOGRAFIA

it.wikipedia.org/wiki/Agrobacterium_tumefaciens (consultato il giorno 01/03/2025)

www.upbiotech.wordpress.com (consultato il giorno 01/03/2025)

www.gazzettaufficiale.it (consultato il giorno 01/03/2025)

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo percorso di studi e di ricerca, desidero esprimere la mia sincera gratitudine a tutti coloro che hanno reso possibile la realizzazione di questa tesi.

Ringrazio di cuore la mia relatrice, la Professoressa Ilaria Filippetti, per la sua profonda competenza, la sua costante guida, i suoi preziosi consigli e la sua grandissima disponibilità. Senza le sue indicazioni sarebbe sicuramente stato più difficile districarmi tra le difficoltà della scrittura della tesi.

Sono molto grata anche dell'aiuto datomi dai miei correlatori, la Dott.ssa Alice Moffa e il Dott. Alberto Zanini, per il loro importante supporto, i loro consigli puntuali e le loro critiche costruttive.

Un sentito ringraziamento va a tutti i Professori del corso di laurea, per i loro insegnamenti che hanno arricchito la mia formazione durante questi anni.

Un grazie speciale a Christian Patregnani, la persona che più di tutte è stata capace di capirmi e sostenermi nei momenti difficili, condividendo con me le gioie, ma anche le sfide che si sono presentate durante tutto il percorso. Grazie Christian per aver sempre creduto che ce l'avrei fatta, anche quando io per prima non pensavo fosse possibile.

Inoltre non posso non ringraziare le due persone che hanno avuto più influenza nel mio percorso educativo: i miei genitori. Senza la vostra comprensione e il vostro sostegno, non sarei mai arrivata fino a qui. Grazie!

Grazie anche a tutta la mia famiglia, che mi ha costantemente incoraggiata e sostenuta con affetto.

Ringrazio anche chi non è più con noi. Spero che questo traguardo possa rendere fieri anche voi.

Infine, desidero ringraziare i miei amici e colleghi, che con me hanno percorso questo viaggio. La vostra amicizia sincera mi è molto cara.

Con immensa gratitudine,

Elisabetta Balsamini