

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari

Campus di Cesena

Corso di Laurea in

Viticoltura ed Enologia

RUOLO DELLA SELEZIONE CLONALE NEL VITIGNO
SANGIOVESE: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI
PRESUNTI CLONI

Tesi in

Viticoltura generale e vivaismo

Relatore:

Prof.ssa Ilaria Filippetti

Correlatore:

Dott. Chiara Pastore

Candidato:

Matteo Framban

Matricola N° 773897

Anno Accademico 2015/2016

Sessione unica

INDICE

1. IL MIGLIORAMENTO GENETICO IN VITICOLTURA
2. SELEZIONE CLONALE
 - 2.1. Origine di variabilità intra-varietale
 - 2.2. Selezione massale
 - 2.3. Selezione clonale
3. LA SELEZIONE CLONALE DEL SANGIOVESE
 - 3.1 La varietà
 - 3.2 Descrizione ampelografica
 - 3.3 I cloni
4. VALUTAZIONE MOLECOLARE DI PRESUNTI CLONI DI SANGIOVESE
 - 4.1. Reperimento del materiale vegetale
 - 4.2. Analisi del DNA
 - 4.2.1. I campioni
 - 4.2.2. Estrazione e purificazione del DNA
 - 4.2.3. Amplificazione del DNA via PCR
 - 4.3. Risultati
5. CONCLUSIONI
6. BIBLIOGRAFIA

1. IL MIGLIORAMENTO GENETICO IN VITICOLTURA ^[1]

L'attività di miglioramento genetico in viticoltura è iniziata nella seconda metà dell'800 a causa della distruzione dei vigneti di viti europee dovuta all'attacco di un afide poi identificato nella Fillossera. Questo evento diede un forte impulso al miglioramento genetico e il primo passo in questa direzione fu la ricerca e selezione di specie resistenti alla fillossera tra le quali vi erano le specie native americane che avevano sviluppato una forte resistenza nei confronti di questo insetto in seguito al lungo periodo di co-evoluzione. Su queste basi una strategia per combattere la Fillossera, che sulla *V. vinifera* creava ingenti danni solo nella parte ipogea e non nella epigea, fu quella di innestare le varietà di vite europea sulle specie americane *V. rupestris*, *V. berlandieri* e *V. riparia*, che oggi sono conosciute come le principali specie alla base degli attuali portinnesti. Queste specie vennero infatti incrociate tra loro ottenendo buoni risultati che permettevano oltre alla resistenza alla Fillossera anche l'adattamento a varie tipologie di terreni consentendo la viticoltura in diverse zone del mondo con terreni diversi e in alcuni casi avversi per lo sviluppo della vite.

Una seconda strategia adottata contro la Fillossera si basò sull'incrocio interspecifico creando ibridi tra *Vitis vinifera* e altre specie resistenti che combinassero una buona resistenza alla fillossera e una produzione di uve di qualità per la produzione di vino. Quest'ultimo tentativo fu vano in quanto le varietà ottenute non riuscivano a produrre uve comparabili a quelle della *Vitis vinifera*.

Successivamente i programmi di miglioramento genetico si incentrarono sulla selezione di piante che fossero resistenti alle malattie fungine nell'ottica di ridurre l'utilizzo di fitosanitari e ottenere così una produzione più salubre e rispettosa dell'ambiente. Oggi tra gli obiettivi del miglioramento genetico della vite, oltre alla ricerca di piante resistenti alle malattie si ricercano piante che siano tolleranti ai cambiamenti climatici che negli ultimi anni ha portato ad un aumento delle temperature medie stagionali con inverni meno freddi, estati molto calde e precipitazioni sempre meno frequenti con picchi delle precipitazioni in eventi di breve durata. Negli ultimi anni anche in Italia sono stati ottenuti alcuni ibridi resistenti alle malattie che sono stati iscritti nel Registro Nazionale delle

Varietà e ammessi alla coltivazione in alcune regioni: nel 2015 sono stati registrati 10 vitigni resistenti, 5 a bacca bianca e 5 a bacca rossa, attraverso un lavoro durato oltre 15 anni e che ha visto l'attuazione di centinaia di incroci tra varietà suscettibili come Chardonnay, Sauvignon, Sangiovese, Merlot e varietà resistenti. I risultati sono stati ottimi, le nuove varietà hanno infatti quantità di alcuni composti considerati negativi come il metanolo al di sotto del limite di legge. Nonostante ciò, l'affermarsi di nuove varietà ottenute con il miglioramento genetico tradizionale è da sempre stato difficile in vite poiché la viticoltura da vino, diversamente da quella da tavola, è una coltura basata su varietà tradizionali e perciò la selezione clonale rimane tutt'ora uno dei metodi per il miglioramento genetico più utilizzati in questa coltura.

2. SELEZIONE CLONALE

2.1. LA VARIABILITÀ INTRA-VARIETALE ^[2]

I viticoltori, fin dagli albori della viticoltura, per impiantare nuovi vigneti utilizzavano parti vegetative delle piante di vite, utilizzando praticamente solo quelle piante che soddisfacevano le loro esigenze e con le caratteristiche migliori. All'interno di una stessa varietà è possibile imbattersi in individui che si differenziano dagli altri per caratteristiche morfologiche e fisiologiche. Questo evidenzia che c'è una variabilità intra-varietale tra le piante che può derivare da diversi fenomeni.

Tra i fenomeni che determinano maggiormente queste differenze ci sono gli eventi mutageni dei tessuti meristemati delle gemme. Le mutazioni gemmarie possono avere origine da eventi naturali ma traumatizzanti per la pianta quali gli shock termici, meccanici e radiazioni ionizzanti. È evidente che la mutazione può essere anche indotta artificialmente tramite l'utilizzo di raggi gamma o di sostanze chimiche che abbiano un effetto mutageno, ma le mutazioni artificiali sono state praticamente ormai abbandonate nella pratica dati i pochi risultati.

A livello della pianta le mutazioni gemmarie possono interessare la struttura di un unico gene prendendo il nome di mutazioni monogeniche o possono interessare diversi geni chiamandosi così mutazioni poligeniche. Le prime possono ad esempio interessare il colore della buccia mentre le seconde variano caratteristiche quantitative come la capacità di accumulare zuccheri o sintetizzare metaboliti secondari come gli aromi o gli antociani. Possono avvenire inoltre mutazioni a livello cromosomico che comportano variazioni nella struttura del cromosoma o nel numero di cromosomi portando a piante tetraploidi, come il Moscato di Alessandria.

Le mutazioni avvengono spontaneamente con una frequenza di 1 gemma su un milione e, se tali gemme vengono poi selezionate per la propagazione daranno origine a piante con differenze morfo-fisiologiche più o meno marcate dipendenti dall'entità della mutazione. In genere comunque, la mutazione non è tale da essere individuabile e quindi rimane latente anche se in alcuni casi rimanendo stabile ha dato origine a genotipi che si sono ben differenziati dalla pianta madre. Un chiaro esempio è il Pinot Nero (figura 2.1) dal quale per mutazione si è ottenuto il Pinot Grigio (figura 2.2) e successivamente da quest'ultimo si è ottenuto il Pinot Bianco (figura 2.3).



Figura 2.1 Pinot Nero [7]

Figura 2.2 Pinot Grigio [7]

Figura 2.3 Pinot Bianco [7]

L'insorgenza di mutazioni può causare la presenza di diversi fenotipi per uno stesso vitigno.

2.2. SELEZIONE MASSALE ^[3]

La selezione massale consiste nella ricerca all'interno del vigneto da parte del viticoltore di piante visivamente sane e con buone caratteristiche produttive e qualitative a scopo di propagazione. La selezione massale si divide in negativa e positiva: nel primo caso vengono scartate le piante che presentano caratteristiche negative; nella positiva invece si scelgono le piante che hanno caratteristiche di pregio per il viticoltore. La selezione massale positiva può produrre risultati migliori rispetto alla negativa, in quanto quest'ultima porta a eliminare solo le piante che presentano caratteri negativi evidenti. Il procedimento di selezione massale positiva dura circa tre anni e ha inizio con una selezione di piante nel periodo antecedente la vendemmia così da avere una visione delle capacità produttive e qualitative delle piante. Successivamente, in primavera, si può rilevare se sono presenti sintomi da virosi, quali il legno riccio mentre in estate si verifica l'assenza di flavescenza dorata e in vendemmia si fanno nuovamente le valutazioni dell'anno precedente in modo da poter confermare i dati ottenuti. Tutto il processo viene riprodotto un terzo anno così da migliorare l'attendibilità dei dati. Le piante che arrivano alla fine della selezione divengono delle piante da cui ottenere nuove marze e vengono considerate le piante madri delle accessioni migliori.

2.3. SELEZIONE CLONALE ^{[4][5]}

In ambito viticolo la selezione clonale è attualmente considerata a livello internazionale il più rapido ed efficace mezzo di miglioramento genetico. Con la selezione clonale è possibile individuare e moltiplicare i biotipi ritenuti migliori per caratteri agronomici, produttivi, qualitativi ed enologici geneticamente determinati nell'ambito della variabilità presente all'interno di un vitigno. Rispetto alla selezione massale il processo di selezione clonale ha una durata più lunga, fino a 8 anni poiché devono essere verificati sia la sanità del materiale che l'attitudine enologica del presunto nuovo clone. La procedura segue una normativa che la definisce passo per passo, stabilendo i parametri da valutare a livello agronomico ed enologico, che devono essere migliorativi rispetto

alla popolazione della varietà di appartenenza. Inoltre, deve essere escluso che la variabilità del presunto clone sia attribuibile alla presenza di virus, perciò viene messa in atto anche una accurata selezione sanitaria. Negli anni '70 è stato messo a punto un protocollo standard per la selezione clonale, che disciplina le diverse fasi. In particolare, per quanto riguarda la selezione sanitaria, è previsto che vengano effettuati test sierologici subito dopo l'individuazione di piante sintomatiche nel vigneto e, una volta accertata la presenza di virus, l'immediata eliminazione delle piante infette. Per escludere invece che le differenze morfologiche siano dovute a fattori ambientali gli individui devono essere coltivati in campi di confronto diversi, in cui viene utilizzata la stessa tecnica colturale con valutazioni e rilievi condotti per 2/3 anni.

Riassumendo, il protocollo prevede: l'individuazione degli individui e la loro caratterizzazione dal punto di vista morfologico e sanitario (1-2 anni); sugli individui selezionati nella prima fase l'effettuazione di controlli morfologici tramite test ampelografici e controllo sanitario tramite test sierologici (1-2 anni); creazione di campi di confronto con i soli individui sani, dove dopo il terzo anno di impianto, vengono effettuati rilievi morfologici e attitudinali (5-8 anni); selezione di nuovi cloni ad elevato potenziale produttivo e/o qualitativo.

In Italia venne emanata nel 1969 in seguito alla direttiva CEE 68/193 del 9 Aprile del 1968 una norma che regolamentava la vendita del materiale di propagazione. Sostanzialmente vennero create tre categorie di materiale di moltiplicazione, ovvero il materiale di moltiplicazione di base, il materiale certificato e quello standard. La prima tipologia contraddistingue materiale che deriva da colture conformi ai requisiti previsti dalla legge per i materiali di base, deriva direttamente dalla selezione clonale e non è vendibile. La responsabilità del suo mantenimento in purezza è del costituente. Il materiale certificato deriva dal materiale di base che sia stato certificato dall'ente predisposto alla certificazione e può essere utilizzato per produzione di uve, quindi può essere commercializzato. Infine, il materiale di moltiplicazione standard deriva da colture conformi ai requisiti previsti dalla normativa per i materiali standard e verificati dall'ente predisposto e può essere utilizzato per la produzione di uve. La norma

riguardante la certificazione è stata poi modificata tramite la direttiva 2002/11/CE che conferisce l'attività di certificazione dei materiali di moltiplicazione delle categorie "certificato" e "standard", ovvero la quasi totalità della produzione, alla Regione; mentre al CRA-VIT compete la certificazione delle sole categorie "iniziale" e "base" che sono l'inizio della filiera vivaistica.

In seguito con lo scopo di ridurre i tempi di selezione nel 2001 venne proposta una modifica al protocollo di selezione che teneva invariati i principi teorici del precedente ma apportava delle modifiche. Gli individui che risultavano sani ai controlli sanitari venivano impiantati in un campo di controllo con minimo 24 piante più un controllo e dopo il terzo anno si effettuavano 3 anni di rilievi ampelografici, vegetativi, produttivi, qualitativi e enologici, infine, al settimo anno avveniva l'omologazione. Gli individui che invece risultavano infetti da virus venivano sottoposti a risanamento tramite termoterapia e micropropagazione. Venivano poi impiantati in un campo di controllo ed effettuati i rilievi, al decimo anno infine avveniva l'omologazione.

Nei rilievi vegeto-produttivi vengono osservate:

- le fasi vegetative quali il germogliamento, la fioritura, l'invasatura e la maturazione;
- la fertilità delle gemme;
- il peso medio del grappolo;
- la produzione del ceppo (grappoli per germoglio, numero di grappoli per ceppo);
- l'incidenza delle malattie;
- peso del legno di potatura;
- l'analisi del mosto (zuccheri, acidità, pH);
- rilievi specifici della selezione.

Nei rilievi ampelografici vengono descritti i giovani germogli e alla fioritura, le foglie, i grappoli e i tralci.

Nella valutazione enologica per le uve a bacca colorata dal 4° anno vengono effettuate analisi per il contenuto di antociani e polifenoli a maturazione ed effettuate micro-vinificazioni di almeno 50 Kg di uva per analisi sensoriali e chimiche mentre per le varietà a bacca bianca vengono effettuate le micro-vinificazioni per le analisi chimiche e sensoriali.

Per quanto riguarda il controllo sanitario nel decreto ministeriale del 24 giugno 2008 fu aggiornata la lista precisa con i virus e le virosi dai quali le piante dovevano essere esenti, vennero anche stabilite le tecniche di analisi con una particolare preferenza per i test in laboratorio; in quegli anni si sviluppavano infatti le tecniche diagnostiche, vennero quindi preferiti i test ELISA e PCR, più rapidi, affidabili e ripetibili dei test biologici su piante indicatrici che vennero mantenuti solo per alcuni virus.

Le piante devono essere esenti dai seguenti virus:

- a) agenti della degenerazione infettiva della vite (GLFV) e del mosaico dell'arabis (ArMV);
- b) GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 associati ai sintomi di accartocciamento fogliare;
- c) GVA e GVB associati ai sintomi delle sindromi del legno riccio "Kober stem grooving" e "corky bark".

Per quanto riguarda i virus sopra menzionati alle lettere b) e c) oltre ai saggi sierologici (test ELISA) e test biomolecolari (PCR) devono essere sottoposti a saggi biologici su piante indicatrici che per i sintomi di accartocciamento fogliare tra le piante sensibili ci sono il Barbera, il Cabernet sauvignon e il Cabernet franc; mentre per il Kober stem grooving il saggio va effettuato su Kober 5 BB.

3. LA SELEZIONE CLONALE DEL SANGIOVESE

3.1. LA VARIETÀ ^[6]

Il Sangiovese è la prima varietà coltivata in Italia nonostante il calo di superficie vitata registrato negli ultimi anni, con ben 53000 ettari (Figura 3.1), una produzione vivaistica altalenante negli anni ma che nel 2017 ha registrato 6679466 di barbatelle certificate prodotte (Figura 3.2), e una diffusione in tutto il mondo dagli Stati Uniti all'Asia. In Italia il Sangiovese entra a far parte di oltre 100 Denominazioni di Origine distribuite in tutto il territorio nazionale. Questa elevata diffusione insieme alla sua antica origine ha fatto sì che accumulasse una elevata variabilità fenotipica. Il Sangiovese è considerato un vitigno policlonale ad elevatissima variabilità derivante dall'elevata variabilità intra-varietale data non solo da mutazioni spontanee.

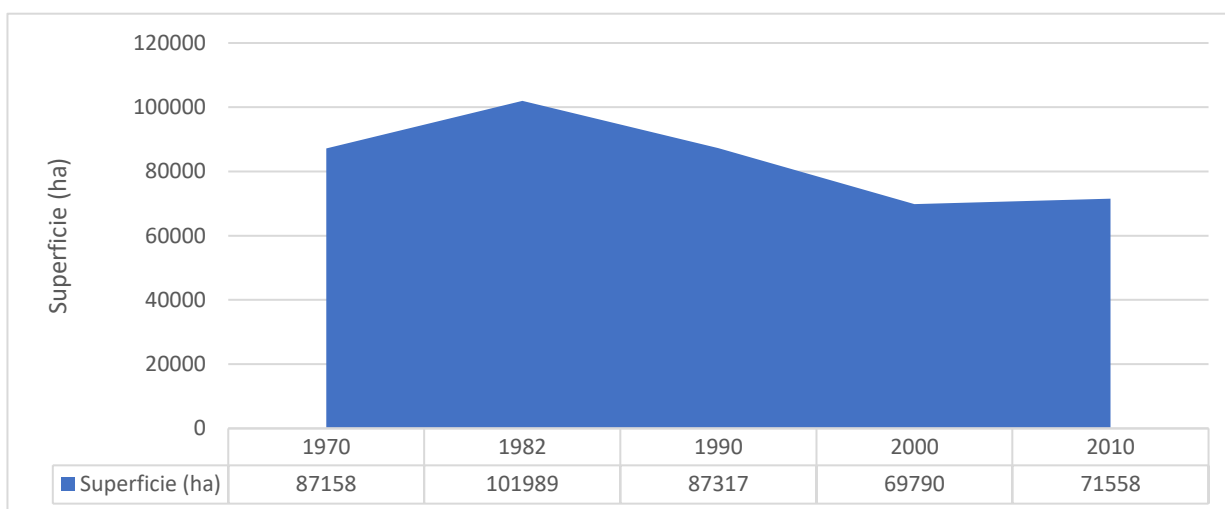


Figura 3.1 Superficie vitata a Sangiovese

Il Sangiovese è stato iscritto nel registro nazionale delle varietà il 25 Maggio 1970 col nome di SANGIOVESE N. e sinonimo ufficiale SANGIOVETO. Può essere utilizzato per la produzione di 12 vini DOCG, 102 vini DOC e 99 vini IGT.

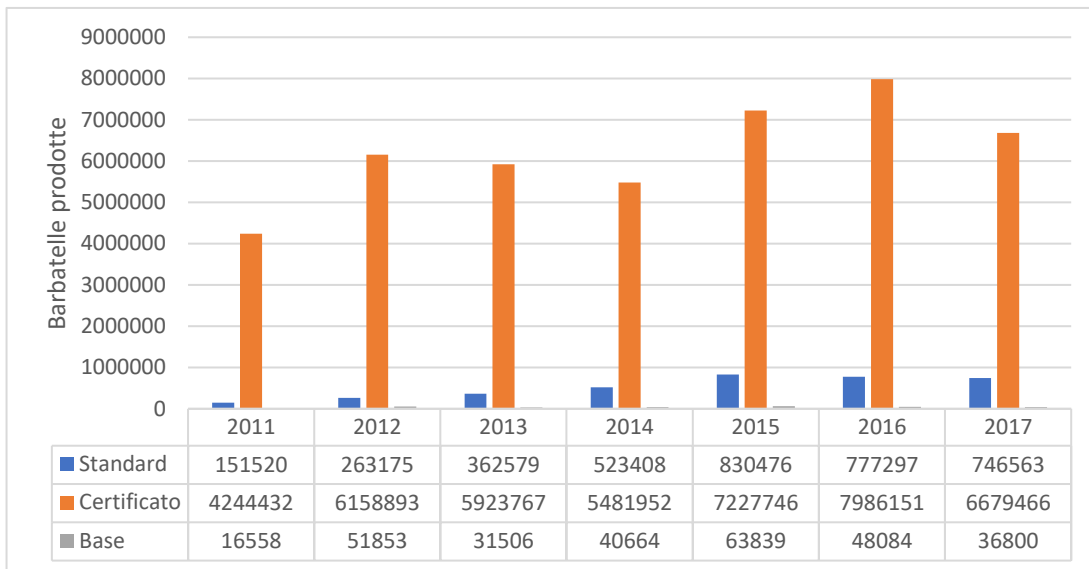


Figura 3.2 Barbatelle di Sangiovese prodotte

Nonostante questa sua fama il Sangiovese riserva ancora il mistero sulla sua origine. Sebbene vi siano svariate ipotesi sulla genesi del vitigno e del nome, nessuna è abbastanza supportata da elementi di prova che concludano questa questione. La maggior parte delle ipotesi sulla genesi del nome sono circoscritte alla zona toscano romagnola. Per quanto riguarda le ipotesi che favoriscono la Romagna come genitore del nome vi sono alcuni documenti risalenti alla seconda metà del 1600 appartenenti alla confraternita dei gesuiti di Faenza in cui veniva citato Sanzuvesa, termine dialettale che con l'italianizzazione è poi diventato Sangiovese. In Toscana il Sangiovese aveva un altro nome, ovvero Sangiovetto e ad avvalorare questo nome vi sono documenti che risalgono al XVI secolo. Il significato avrebbe molte sfaccettature, alcuni sostengono significati "sangue di Giove" in quanto secondo una tradizione di Santarcangelo di Romagna, un frate dell'ordine dei cappuccini di Santarcangelo in una serata offrendo il vino prodotto da loro affermò che quel vino fosse prodotto nel monastero situato sul monte Giove e che quindi fosse sangue di Giove. Un'altra ipotesi afferma che il termine Sangiovese derivi da un paese in Calabria chiamato Sangineto, questo è infatti un sinonimo del Sangiovese e ad avvalorare questa tesi vi sono documenti risalenti al medioevo che riportano collegamenti commerciali tra quel paese e la toscana e quindi l'esportazione di viti dal meridione alla Toscana. Vi sono poi le analisi del DNA con le

quali è stato visto che il Sangiovese deriverebbe da alcuni vitigni meridionali, ma i parentali certi di questo vigneto non sono ancora stati individuati.

3.2. DESCRIZIONE AMPELOGRAFICA ^[7]

Si riporta la descrizione ampelografica reperita sul Registro Nazionale delle varietà di vite e riferita a due biotipi di Sangiovese, il Sangiovese Grosso (SG) e il Sangiovese Piccolo (SP). Per il Sangiovese Grosso la descrizione ampelografica è stata fatta sui ceppi di selezione clonale della collezione ampelografica sperimentale della azienda "Monna Giovannella" della Facoltà di Agraria dell'Università di Firenze. Si sono prescelti i cloni provenienti da Lamole (Greve in Chianti), Brolio in Chianti, Vitignano, Scopeto, Fagliano e Catignano riferibili al "Sangiovese grosso" tipico. In precedenza e successivamente si sono confrontati i rilievi in circa 15 aziende del Chianti classico e 10 aziende di altre zone collinari dove il "Sangiovese" è molto diffuso, nel quadro del sistematico lavoro di individuazione dei migliori ceppi per il prelievo delle marze per gli innesti. Per il Sangiovese Piccolo la descrizione ampelografica è stata fatta su ceppi che, nelle diverse zone, erano segnalati come "Sangiovese piccolo", "Sangiovese forte", "Sangiovese montanino", e comparata con i rilievi effettuati sui ceppi di selezione clonale della collezione ampelografica sperimentale costituita dall'Istituto di Coltivazioni Arboree presso l'azienda "Monna Giovannella" della Facoltà Agraria dell'Università di Firenze, e classificati come riferibili al "Sangiovese piccolo". Non sempre vi è stata una perfetta concordanza. Questo fatto avvalorava quanto si è detto nella premessa circa la presenza di diversi biotipi che diversificano fra loro per qualche carattere, tutti riferibili al "Sangiovese piccolo".

Germoglio di 10-20 cm

Apice: [S.G.] medio; con tomento lanuginoso; di color bianco-verdognolo-chiaro con orlo leggermente carminato; [S.P.] espanso, ma talvolta anche medio; con tomento lanuginoso; di color verde-chiaro o bianco-argenteo; talvolta con orlo leggermente carminato.

Foglioline apicali (dalla 1a alla 3a): [S.G.] leggermente piegate a gronda ma talvolta anche semi-spiegate; con residui di tomento aracnoideo più o meno rado nella pagina superiore e con tomento aracnoideo più o meno intenso in quella inferiore; di colore bianco-giallo-verdognolo, spesso sfumato in rosa ai bordi; [S.P.] spiegate o piegate a gronda; con tomento aracnoideo; di color verde molto chiaro, con sfumature giallo-bronzate; talvolta leggera sfumatura rosa ai bordi.

Foglioline basali (dalla 4a in poi): [S.G.] generalmente spiegate; glabre o quasi nella pagina superiore e con leggero residuo aracnoideo in quella inferiore; di color verde piuttosto chiaro, talvolta tendente al giallastro; [S.P.] generalmente spiegate; glabre nella pagina superiore; di color verde chiaro, talvolta tendente al clorotico.

Asse del germoglio: [S.G.] generalmente ricurvo; [S.P.] più o meno ricurvo.

Germoglio alla fioritura

Apice: [S.G.] espanso o semi-espanso; aracnoideo; di color verde-biancastro; talvolta glabro al centro e vellutato od aracnoideo ai lati; [S.P.] espanso o semi-espanso; con forte residuo aracnoideo specie nella parte esterna del germoglio; di color verde-chiaro.

Foglioline apicali: [S.G.] leggermente piegate a gronda; quasi glabre nella pagina superiore; con tomento aracnoideo in quella inferiore; di color verde-giallastro; [S.P.] leggermente piegate a gronda o spiegate; glabre nella pagina superiore, con residuo di tomento aracnoideo in quella inferiore; di color verde-chiaro.

Foglioline basali: [S.G.] espanse o leggermente piegate a gronda; con residuo di tomento aracnoideo nella pagina inferiore; di color verde-giallastro, spesso con sfumature bronzate; [S.P.] espanse, ma spesso anche piegate a gronda; glabre nella pagina superiore e con leggero residuo di tomento aracnoideo in quella inferiore; di color verde chiaro, spesso con riflessi bronzati.

Asse del germoglio: [S.G.] generalmente ricurvo; [S.P.] più o meno ricurvo.

Tralcio erbaceo: [S.G.] di sezione circolare o ellittica; leggermente costoluto; glabro o con leggerissimo tomento aracnoideo di color verde; [S.P.] di sezione circolare quasi ellittica; generalmente glabro o con leggero tomento aracnoideo; di color verde.

Vitici: [S.G.] con distribuzione intermittente (formula 0-1-2-0-1-2-0) generalmente bifidi; di lunghezza media; di color verde o verde chiaro; [S.P.] a distribuzione intermittente (formula 0-1-2-0-1-2-0); piuttosto sottili; bifidi; di media lunghezza; di color verde.

Infiorescenza: [S.G.] di grandezza media; di forma cilindrico-piramidale; alata (con una o due ali); [S.P.] di grandezza diversa a seconda del biotipo (a grappolo medio o medio-grosso od a grappolo medio-piccolo o piccolo); di forma cilindroide o cilindro-piramidale; senza o con una o due ali.

Fiore: [S.G.] tipo morfologico: ermafrodita autofertile (Cosmo, 1940); bottone florale: cilindroide; di grandezza media; con stami di media lunghezza o medio-lunghi; antere ricche di polline; pistillo bene sviluppato; [S.P.] tipo morfologico: ermafrodita autofertile (Cosmo, 1940); bottone florale: cilindroide, mezzano, con stami di media lunghezza.

Foglia: [S.G.] di media grandezza; pentagonale; quinquelobata, talvolta trilobata; con seno peziolare ad U più o meno largo, talvolta a V un po' aperto; seni laterali superiori a lira più o meno chiusa con bordi talvolta sovrapposti; seni laterali inferiori (quando sono presenti) a V stretto ed a bordi paralleli; lobi abbastanza marcati, piani; angolo alla sommità dei lobi quasi acuto; lembo generalmente piano, piuttosto sottile, con superficie liscia ma talvolta anche leggermente ondulata; pagina superiore glabra con leggero residuo aracnoideo; di color verde con toni dal verde bottiglia fino al verde chiaro mediamente brillante a seconda delle esposizioni; nervature principali di color verde chiaro; pagina inferiore con tomento aracnoideo quasi setoloso all'incrocio delle nervature, di color verde chiaro, con nervature di 1°-2°-3° ordine sporgenti. Denti laterali irregolari, pronunciati, acuti con margine rettilineo e base piuttosto stretta; [S.P.] media; di forma più lunga che larga; quinquelobata e trilobata; seno peziolare ad U piuttosto aperto; seni laterali superiori non molto profondi; seni laterali inferiori (quando sono

presenti) poco profondi; lobo centrale piuttosto allungato con lobi laterali piuttosto evidenti; angolo alla sommità dei lobi quasi acuto; lembo sottile, piano, con superficie glabra nella pagina superiore; leggero tomento aracnoideo a fiocchetti nella pagina inferiore; nervature evidenti ma poco rilevate; di color verde-chiaro; spesso con residuo di tomento aracnoideo; nervature di 1°-2°- 3° ordine abbastanza sporgenti; dentatura irregolare più o meno pronunciata con margine rettilineo e base piuttosto stretta.

Picciolo: [S.G.] di media lunghezza o medio-lungo; di media grossezza; glabro di color verde talora soffuso leggermente di rosa; sezione trasversale con canale non molto evidente; [S.P.] di media lunghezza o medio-corto; di color verde, talvolta soffuso di rosa; sezione trasversale con canale non molto evidente.

Portamento della vegetazione: [S.G.] espanso; [S.P.] espanso, ma, a parità di forma di allevamento, più raccolto di quello del "Sangiovese grosso".

Acino erbaceo: [S.G.] subrotondo, talvolta quasi ellissoide; di color verde di tono medio, intensamente pruinoso; [S.P.] subrotondo, quasi ellissoide; di color verde; intensamente pruinoso.

Grappolo a maturità industriale: [S.G.] di grandezza media o medio-grosso (lunghezza 17-25 cm); di aspetto più o meno compatto; forma cilindrico-piramidale con una o due ali; peduncolo visibile, semi-legnoso, grosso; [S.P.] di grandezza diversa a seconda del biotipo (a grappolo medio o medio-grosso od a grappolo medio-piccolo o piccolo); di aspetto generalmente compatto; di forma cilindroide o cilindrico-piramidale; senza o con una o due ali; peduncolo visibile, robusto, erbaceo o semilegnoso.

Acino: [S.G.] di media grandezza (diametro trasversale mm 12-15); subrotondo talvolta quasi ellissoide; di forma regolare, piuttosto uniforme; ombelico non molto persistente; buccia molto pruinosa, di color nero-violaceo, consistente ma non molto spessa; polpa generalmente abbastanza sciolta, però talvolta, specie nei grappoli più grossi, anche compatta o di buona consistenza; succo colorato in rosa; pedicelli di media lunghezza o lunghi, di color verde chiaro; cercine mediamente evidente, verde, talvolta rossastro; pennello medio-corto, di color rossastro, non molto resistente al distacco; [S. P.] medio

o piccolo (diametro mm 12-18); subrotondo quasi ellissoide; ellissoide nei grappoli più compatti; forma più o meno regolare, non molto uniforme; ombelico non molto persistente; buccia consistente, molto pruinosa, di color nero-violaceo; polpa quasi carnosa; succo leggermente colorato in rosa; pedicelli piuttosto corti, di color verde-chiaro; cercine mediamente evidente, verde; pennello piuttosto corto, più resistente al distacco che nel "Sangiovese grosso".

Vinaccioli: [S.G.] in numero medio di 2-4 per acino; piuttosto grossi; con becco di lunghezza media o medio-corto; nessun acino sprovvisto di vinaccioli; [S.P.] in numero di 2-3 per acino; di media grossezza; piriformi con becco leggermente ricurvo verso la faccia ventrale; nessun acino sprovvisto di vinaccioli.

Tralcio legnoso: [S.G.] di media lunghezza, mediamente robusto; ramificato; corteccia resistente; sezione trasversale quasi ellittica; superficie un po' striata, leggermente pruinosa; glabro; nodi piuttosto evidenti, leggermente più scuri; meritalli di lunghezza media, ma più lunghi, in genere, di quelli del "Sangiovese piccolo" (circa 8-11 cm.), di color nocciola chiaro, talvolta anche cannella chiaro; cercine peziolare largo; diaframma piano-convesso; legno abbastanza duro; [S.P.] di media lunghezza e mediamente robusto, ramificato; corteccia resistente, striata e punteggiata; sezione trasversale più o meno ellittica; glabro; nodi abbastanza evidenti, leggermente più intensi di colore; meritalli di lunghezza media, ma sempre più corti che nel "Sangiovese grosso", di color nocciola di media intensità; cercine peziolare largo; diaframma praticamente piano; legno piuttosto duro.

Tronco: [S.G.] di buona vigoria; [S.P.] di buona vigoria.

Fenologia

Fenomeni vegetativi

Germogliamento: [S.G. e S.P.] prima-seconda decade di aprile.

Fioritura: [S.G. e S.P.] terza decade di maggio.

Invaiaatura: [S.G. e S.P.] terza decade di agosto.

Maturazione dell'uva: [S.G.] terza decade di settembre-15 ottobre; [S.P.] prima quindicina di ottobre.

Caduta delle foglie: [S.G. e S.P.] seconda quindicina di novembre.

Caratteristiche ed Attitudini colturali

Vigoria: [S.G.] notevole; [S.P.] buona, ma inferiore a quella del "Sangiovese grosso".

Produzione: [S.G.] abbondante e costante nel clone di cui ci si occupa; [S.P.] non molto abbondante, ma costante nel clone di cui ci si occupa.

Posizione del primo germoglio fruttifero: [S.G. e S.P.] 2°-3° nodo.

Numero medio di infiorescenze per germoglio: [S.G. e S.P.] 1-2.

Fertilità delle femminelle: [S.G. e S.P.] buona.

Resistenza alle malattie: [S.G. e S.P.] buona.

Comportamento rispetto alla moltiplicazione per innesto: [S.G. e S.P.] ha buona affinità di innesto.

3.3. I CLONI

Per cloni ci si riferisce a gruppi di individui originati da una pianta che possiedono lo stesso patrimonio genetico ottenuti tramite riproduzione agamica.

Vitigno	Cloni iscritti
Sangiovese N.	128
Nebbiolo N.	44
Merlot N.	42
Barbera N.	32
Glera (Glera B. + Glera lunga B.)	19
Primitivo N.	15

Tabella 3.3 Cloni iscritti delle principali varietà italiane (Fonte: Registro Nazionale delle Varietà di vite)

Il Sangiovese è la varietà che è stata sottoposta alla maggiore attività di selezione, osservabile mettendo a confronto il numero di cloni dei principali vitigni coltivati in Italia (tabella 3.3). I cloni iscritti nel registro nazionale delle varietà sono stati registrati tra il 1970 e il 2019 arrivando così a quota 128 anche se non tutti vengono ancora utilizzati. Sono stati rinvenuti la maggior parte in Toscana, regione famosa per la produzione di vini derivati da uve Sangiovese come il “Chianti classico DOCG” o il “Morellino di Scansano DOCG” ma alcuni sono stati reperiti in Emilia-Romagna dove viene prodotto il “Sangiovese di Romagna DOC”.

I vari cloni si differenziano l'uno dall'altro per diverse caratteristiche che possono riguardare la pianta in generale, la forma dei vari organi vegetativi, la forma del grappolo, la resistenza ad alcune malattie o le caratteristiche organolettiche. Troviamo infatti alcuni cloni che maturano in anticipo o in ritardo rispetto ad altri, più o meno vigorosi, con grappoli più o meno compatti e con acini di varie forme e dimensioni (figura 3.1, 3.2, 3.3). Per quanto riguarda le differenze a livello organolettico si possono trovare cloni con un livello di polifenoli più alto, oppure una produzione di aromi o zuccheri diverso dalla media che possono influire sulle caratteristiche compositive, fenologiche e aromatiche finali del vino.



Figura 3.1 Clone I - CVR 19 [7]



Figura 3.2 Clone I - CVR 116 [7]



Figura 3.3 Clone I - CVR 237 [7]

4. VALUTAZIONE MOLECOLARE DI PRESUNTI CLONI DI SANGIOVESE

4.1. REPERIMENTO DEL MATERIALE VEGETALE

Predappio è un paese in provincia di Forlì-Cesena, situato nell'appennino tosco-romagnolo. Famosa per essere una zona particolarmente vocata alla coltivazione di Sangiovese e per la produzione dell'omonimo vino, in questa zona sono stati individuati alcuni cloni come "I – RAUSCEDO 24", uno dei primi cloni registrati di Sangiovese, oppure "I – AMPELOS DVG 5", uno degli ultimi cloni iscritti nel registro nazionale delle varietà.

I biotipi oggetto della indagine sono stati individuati in un vigneto afferente alla azienda vitivinicola Fattoria Nicolucci di Nicolucci Alessandro è situata nel borgo, ai piedi della rocca, mentre il vigneto è posto nelle colline vicino il borgo, visibile dalla cantina, nelle immediate vicinanze di Predappio Alta, posto tra i 300 m e i 400 m s.l.m., e si estende sul versante sud di una collina della catena degli appennini ricoprendo 10 ettari di superficie. Il suolo della zona si presenta calcareo e ciottoloso. Il terreno su cui è impiantato il vigneto ha diverse pendenze e raggiunge in alcuni punti il 90%, rendendo così alcune operazioni molto faticose e impegnative. I filari sono orientati da nord a sud e le viti sono allevate a cordone speronato con 4 speroni per cordone. Il terreno è inerbito naturalmente. La difesa è integrata, prestando molta attenzione all'utilizzo dei prodotti fitosanitari così da ottenere un'uva sana salvaguardando l'ecosistema circostante e riducendo i costi dati dai trattamenti. La varietà allevata principalmente è Sangiovese, ma sono anche presenti piante di Merlot, Cabernet - Sauvignon e Terrano. Per quanto riguarda il Sangiovese la filosofia aziendale prevede l'utilizzo di vari cloni così da avere una maggior biodiversità, e si ritrovano così cloni ad acino piccolo, grosso e oblungo utilizzati per creare i vari vini prodotti in azienda. All'interno troviamo la vigna principale detta "Vigna del Generale" dalla quale viene prodotto il vino della tipologia riserva dell'azienda, è inoltre la vigna storica, impiantata ormai 80 anni fa.

La cantina si trova nel borgo di Predappio Alta, ai piedi della rocca. L'azienda comprende 2 edifici più un piccolo magazzino. Il primo edificio ospita l'ufficio e una sala

adibita a deposito. Il secondo edificio si sviluppa su due piani, uno al piano terra e uno interrato, al piano terra troviamo la zona adibita all'imbottigliamento e confezionamento, la zona di ricevimento clienti con una saletta per le degustazioni, infine è presente un piccolo piano da laboratorio per le analisi di base sulla materia prima e sul vino. Nel retro troviamo una vasca di ricevimento delle uve che si collega al piano interrato dove troviamo la zona di produzione e affinamento.

L'azienda possiede soprattutto vasi vinari in cemento dove effettua la maggior parte delle fermentazioni, inoltre possiede diverse botti grandi dove avvengono gli affinamenti dei loro vini, per quanto riguarda invece alcuni prodotti le fermentazioni vengono svolte in sempre-pieni d'acciaio o in vetroresina, sono presenti poi dei tank d'acciaio per l'affinamento. L'azienda possiede inoltre una diraspa-pigiatrice, una pressa a membrana, le diverse pompe per lo spostamento delle masse di vino e un impianto di raffreddamento collegato a tutti i vasi di cemento per il controllo della temperatura in fermentazione.

Le piante oggetto di studio sono state reperite in un piccolo appezzamento di circa 400 m² all'interno del vigneto aziendale. Nell'appezzamento sono presenti 9 filari con 21 piante molto vecchie allevate a cordone speronato, tra queste 21 piante alcune presentavano caratteristiche riguardanti il grappolo che permettono di differenziarle dalle altre e potrebbero rappresentare dei nuovi cloni di Sangiovese.

Per verificare la loro effettiva appartenenza alla cv Sangiovese abbiamo quindi proceduto ad effettuare una analisi del DNA con marcatori microsatelliti (SSR) che risultano essere in vite quelli a più alto potere discriminante a livello varietale.

4.2. ANALISI DEL DNA

4.2.1. I CAMPIONI

Le analisi sono state eseguite su tre piante i cui grappoli presentavano morfologia diversa rispetto alle piante adiacenti. In particolare, i grappoli si presentano di piccole dimensioni, spargoli, con acini oblunghi (Figura 4.1, 4.2); un campione di Sangiovese è stato inoltre utilizzato come controllo. Per ogni pianta di vite sono stati raccolti tre tralci che al momento del prelievo si presentavano in buone condizioni, con un grado di lignificazione ottimale. Il prelievo è avvenuto nel periodo invernale durante la fase di dormienza, dalle piante individuate e segnate durante la vendemmia. I tralci sono stati inseriti in ambiente favorevole il risveglio vegetativo in modo da ottenere le foglie necessarie per le analisi del DNA.



Figura 4.1 Grappolo della pianta oggetto di studio nella fase di ingrossamento acini



Figura 4.2 Grappolo della pianta oggetto di studio alla maturazione

4.2.2. ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DEL DNA ^[8]

L'estrazione del DNA dai campioni è stata effettuata tramite un protocollo sviluppato da Mercado et al. (1999) per l'estrazione del DNA di piante di *Fragaria* spp. L'estrazione e la purificazione degli acidi nucleici in alcune piante è spesso difficile a causa dell'elevato

contenuto di composti, come polifenoli e polisaccaridi, che interferiscono con l'estrazione del DNA. Il metodo utilizzato, a differenza dei metodi precedentemente utilizzati, permette tramite l'estrazione a pH basso di eseguire una buona polymerase chain reaction (PCR) prevenendo la precipitazione dei carboidrati e l'eliminazione dei polifenoli tramite polivinilpirrolidone (PVP).

Per eseguire questo metodo è necessario l'utilizzo dei seguenti composti: una soluzione per il lavaggio del materiale composto da 100 mM di acetato di sodio (pH 5), 20 mM di EDTA (pH 5) e 0,2 M di sorbitolo al quale prima dell'uso sono stati aggiunti 2% di PVP e 1% di β -mercaptoetanololo; sono stati utilizzati inoltre N-lauryl sarcosine al 10%, CTAB al 10%, diclorometano isoamilico in rapporto 24:1 e NaCl 5 M.

Per preparare 100 ml di soluzione di lavaggio abbiamo utilizzato 0.82 g di acetato di sodio, 4 ml di EDTA, 3.644 g di sorbitolo, 2 g di PVP e 1 ml di β -mercaptoetanololo. Per estrarre il DNA abbiamo pestato le foglie dei campioni in un mortaio utilizzando azoto liquido così da ottenere una polvere. Per ogni 0,5 g di campione abbiamo aggiunto 5 ml di buffer e mescolato tramite vortex per alcuni secondi, il campione successivamente è stato centrifugato a 3000 giri/minuto per 5 minuti così da ottenere un precipitato. Il pellet ottenuto è stato lavato nuovamente con un volume pari al precedente di soluzione di lavaggio e centrifugato nuovamente a 3000 giri/minuto. Eliminato il soprannatante è stato poi riportato in sospensione utilizzando 650 μ l di soluzione di lavaggio, 150 μ l di NaCl 5M, 100 μ l di N-laurilsarcosine 10% e 100 μ l di CTAB al 10%, mixato tramite vortex per alcuni secondi e incubato a 65°C per 15 minuti. Alla fine dell'incubazione, abbiamo aggiunto un eguale volume di diclorometano: isoamilico (24:1) e mescolato fino ad ottenere un'emulsione. È stata poi effettuata una centrifugazione a 10000 giri al minuto per 5 minuti, conclusa la quale abbiamo raccolto il supernatante che è stato trasferito in un tubo eppendorf pulito. Abbiamo poi ripetuto gli ultimi 3 passaggi e il DNA è stato poi fatto precipitare in 0.4 ml di isopropanolo freddo e incubato a -20 °C per 1 ora. Infine, abbiamo eseguito una centrifuga a 14000 giri per 10 minuti e il pellet infine lavato con etanolo 80% e risospeso in acqua sterile.

4.2.3. AMPLIFICAZIONE DEL DNA VIA PCR

Una volta estratto e purificato il DNA dei campioni è stato necessario amplificarlo in modo che fosse rilevabile per le successive applicazioni. Per fare questo si è effettuata una reazione di PCR, che permette di amplificare la sequenza di DNA iniziale grazie alla presenza di enzimi di sintesi detti Taq Polimerasi che in determinate condizioni e con specifici reagenti sono in grado di incrementare esponenzialmente le sequenze di nucleotidi. Per effettuare la reazione è necessario inoltre conoscere la sequenza nucleotidica del frammento ovvero la parte iniziale (primer forward) e finale (primer reverse) dell'amplificato. La reazione di amplificazione avviene in 3 fasi a temperature differenti e in più cicli nei quali viene duplicato il DNA sintetizzato precedentemente ottenuto, avendo così, una moltiplicazione esponenziale del materiale genetico. La prima fase, detta fase di denaturazione, prevede la denaturazione del DNA separando la doppia elica in due filamenti. Nella seconda fase, detta di annealing, avviene la creazione dei legami tra primer e le regioni complementari dei filamenti denaturati. Infine, nella terza fase, detta di allungamento, avviene la sintesi del filamento di nostro interesse. Nella reazione di PCR sono stati usati i reagenti presenti in tabella 4.1, per quanto riguarda i primer sono stati utilizzati quelli riportati in tabella 4.2 precedentemente marcati a fluorescenza. Il programma PCR usato per l'amplificazione dei frammenti di DNA di interesse è riportato in tabella 4.3.

	1x (µl)
Buffer (10x)	1.25
MgCl ₂ (25mM)	1
dNTPs (10mM ognuno)	0.25
Taq Polimerasi (5U/µl)	0.1
Primer forward + reverse (10µM)	0.5
Acqua sterile	8.4
DNA (10ng/µl)	1
Totale	12.5

Tabella 4.1 Protocollo di PCR per l'amplificazione del DNA

Terminata la reazione di PCR il DNA dei campioni è stato inviato al policlinico Sant'Orsola-Malpighi per il processo di elettroforesi su di un sequenziatore 3730 DNA

Analyzer a 48 capillari. 1µl dell'amplificato è stato diluito in 14µl di formamide e per ogni campione sono stati aggiunti 0.25µl di GeneScan TM 500 LIZTM Size Standard come marcatore di peso molecolare.

nome sequenza	primer forward	primer reverse
VVMD5	cta gag cta cgc caa tcc aa	tat acc aaa aat cat att cct aaa
VVMD7	aga gtt gcg gag aac agg at	cga acc ttc aca cgc ttg at
VVMD25	ttc cgt taa agc aaa aga aaa agg	ttg gat ttg aaa ttt att gag ggg
VVMD27	gta cca gat ctg aat aca tcc gta agt	acg ggt ata gag caa acg gtg t
VVMD28	aac aat tca atg aaa aga gag aga gag a	tca tca att tcg tat ctc tat ttg ctg
VVMD32	tat gat ttt tta ggg ggg tga gg	gga aag atg gga tga ctc gc
VVS2	cag ccc gta aat gta tcc atc	aaa ttc aaa att cta att caa ctg g
ZAG62	ggt gaa atg ggc acc gaa cac acg c	cca tgt ctc tcc tca gct tct cag c
ZAG79	cca tgt ctc tcc tca gct tct cag c	aga ttg tgg agg agg gaa caa acc g

Tabella 4.2 Sequenze dei 9 primers usati per le analisi molecolari.

Il processo elettroforetico consiste nella separazione di frammenti, nello specifico di DNA, all'interno di un tubo (capillare) stretto, di solito realizzato in silice fusa o teflon. La separazione è resa possibile applicando una differenza di potenziale tra le due estremità del capillare, in maniera che le molecole all'interno del campione comincino a migrare con velocità differenti lungo il capillare muovendosi verso l'elettrodo di carica opposta.

Temperatura	Tempo	Fase di PCR	
94°C	10 minuti	denaturazione	4 cicli diminuendo la temperatura di 1°C ogni volta
94°C	30 secondi	denaturazione	
60°C	1 minuto	annealing	
72°C	1 minuto	allungamento	30 cicli
94°C	30 secondi	denaturazione	
55°C	1 minuto	annealing	
72°C	1 minuto	allungamento	
72°C	5 minuti	allungamento finale	

Tabella 4.3 Programma PCR usato per l'amplificazione dei frammenti di DNA di interesse per l'analisi molecolare.

Al termine della corsa elettroforetica la fluorescenza emessa dal frammento di DNA marcato è raccolta da un detector e visualizzata attraverso software specifici (Peak Scanner Software v1.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sottoforma di picchi (elettroferogramma) a cui vengono assegnati, grazie alla presenza dello standard Liz di peso molecolare all'interno, una determinata lunghezza espressa in paia di basi nucleotidiche (bp).

4.3. RISULTATI

Al termine dell'elettroforesi abbiamo osservato la lunghezza dei frammenti di DNA in paia di basi per ogni primer da noi utilizzato e lo abbiamo confrontato con i dati presenti nel Registro Nazionale delle Varietà di Vite. Come riportato nella tabella 4.4 la lunghezza dei 9 alleli risulta uguale sia a quello del Sangiovese N. presente nel Registro Nazionale delle Varietà di Vite, sia al nostro controllo interno. Ciò significa che le piante oggetto di studio sono piante di Sangiovese ed è quindi possibile presumere che esse abbiano subito qualche mutazione che ha fatto sì che il grappolo fosse diverso dagli altri cloni di Sangiovese presenti in vigneto.

Marcatore SSR									
	VVMD5	VVMD7	VVMD25	VVMD27	VVMD28	VVMD32	VVS2	ZAG62	ZAG79
Campione n.1	222-232	236-260	238-238	176-182	231-241	249-253	129-129	192-194	240-256
Campione n.2	222-232	236-260	238-238	176-182	231-241	249-253	129-129	192-194	240-256
Campione n.3	222-232	236-260	238-238	176-182	231-241	249-253	129-129	192-194	240-256
Controllo	222-232	236-260	238-238	176-182	231-241	249-253	129-129	192-194	240-256
Sangiovese N.	222-232	236-260	238-238	176-182	231-241	249-253	129-129	192-194	240-256

Tabella 4.4 Lunghezza frammenti di DNA ai 9 loci microsatelliti analizzati.

5. CONCLUSIONI

In base ai risultati ottenuti le viti di Sangiovese analizzate, potrebbero essere utilizzate per avviare un processo di selezione clonale nella cv Sangiovese, prevedendo inizialmente le analisi sanitarie per escludere l'eventualità che la modifica morfologica sia dovuta a qualche virus che ha attaccato le piante.

Nel caso le analisi sanitarie avessero esito positivo e che quindi le piante fossero sane, il proprietario potrebbe iniziare la selezione in collaborazione con un centro di ricerca per ottenere così un clone ed iscriverlo nel Registro Nazionale delle varietà. Seguendo il protocollo previsto per la selezione clonale si potranno ottenere ulteriori informazioni sulle questo presunto clone come la descrizione ampelografica esatta, dati importanti per la coltivazione come le fasi fenologiche, i dati produttivi, la suscettibilità alle crittogame, la composizione delle uve e la qualità dei vini, verificando nel contempo che le interessanti caratteristiche morfologiche del grappolo e degli acini siano legate al genotipo e non all'ambiente. Gli aspetti che contraddistinguono questi supposti nuovi cloni che presentano grappoli piccoli e spargoli sarebbero inoltre molto interessanti nell'ottica di una viticoltura sempre più sostenibile e a basso impatto ambientale. Questo tipo di indagini potrebbe arricchire la scelta dei cloni di Sangiovese con particolare interesse per l'areale viticolo di Predappio nel quale il clone è stato selezionato e nel quale è in grado di esprimere al meglio le sue potenzialità in relazione all'ambiente, valorizzando le produzioni enologiche del territorio.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] La Vite e il Vino, capitolo: Miglioramento genetico (Maria Stella Grando)
<https://www.colturaecultura.it/capitolo/miglioramento-genetico-2>
- [2] La Vite e il Vino, capitolo: La Selezione Clonale (Lucio Brancadoro)
<https://www.colturaecultura.it/capitolo/selezione-clonale>
- [3] La selezione massale in Italia (Morando et al.)
<http://www.viten.net/files/a9e/a9e2a8a925747564adb34113b90abf05.pdf>
- [4] Il protocollo di selezione clonale della vite si aggiorna (Franco Mannini)
<http://www.viten.net/files/cc1/cc17843d6b492c7cd2209b0ebacd52d3.pdf>
- [5] Mipaaf: certificazione vite
<https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/10085>
- [6] Romagna Sangiovese: Storia e identità di un famoso vino e di un antico vitigno (Beppe Sangiorgi, Giordano Zinzani, Consorzio Vini di Romagna)
- [7] Registro nazionale delle varietà
<http://catalogoviti.politicheagricole.it/scheda.php?codice=218>
- [8] Mercado et al.: A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*