



Proposta di progetto

Studio della variabilità intravarietale della cultivar Sangiovese attraverso i cambiamenti epigenetici

Partner coinvolti

- **Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali (Milano)**
- **Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Unità di ricerca per la viticoltura (Arezzo)**

1. PREMESSA

1.1 Le modificazioni epigenetiche

Sono sempre più numerose le evidenze sperimentali che suggeriscono come l'espressione genica sia determinata non solo dal codice genetico ma anche da una molteplicità di fenomeni, definiti epigenetici. I fenomeni epigenetici sono in grado di modificare l'espressione genica senza determinare cambiamenti nella sequenza del DNA e di trasmettersi di generazione in generazione. L'epigenetica è quindi, per definizione, *"lo studio delle modifiche ereditabili nella funzione del genoma che si verificano senza cambiamenti della sequenza di DNA"* (Haig 2004). Tra i meccanismi coinvolti nella regolazione epigenetica dei geni, un ruolo importante è svolto dalla metilazione del DNA e dalle modificazioni post-traduzionali degli istoni. Questi meccanismi sono spesso correlati tra loro ed entrambi prevedono cambiamenti nella struttura della cromatina (rimodellamento) mediante modifiche covalenti (Habu et al., 2001). La metilazione del DNA è una delle principali modificazioni epigenetiche coinvolta nel silenziamento genico (bloccando l'accesso di fattori di trascrizione ai rispettivi promotori) e nella modulazione della struttura della cromatina (reclutando complessi proteici che si legano al DNA metilato). Essa determina quindi la formazione di stati trascrizionalmente silenti della cromatina e permette la trasmissione di questi specifici pattern di attività genica attraverso le divisioni cellulari. La metilazione del DNA è inoltre associata con il controllo dell'integrità cromosomica, con eventi di ricombinazione genica e con meccanismi di difesa contro l'invasione di sequenze di DNA estraneo all'interno del genoma. Il controllo dell'espressione genica, mediato dalla metilazione del DNA, gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo degli



organismi vegetali (Finnegan et al., 1996). Nelle piante il livello di metilazione del DNA varia a seconda della specie presa in considerazione ed oscilla dal 6% in *Arabidopsis thaliana* al 25% in *Zea mays* (Steward et al. 2002).

Le piante, essendo organismi immobili devono essere capaci di strategie di risposta rapide ed efficienti in risposta a cambiamenti biotici e abiotici. Considerato che la metilazione del DNA rappresenta un meccanismo fondamentale di regolazione della struttura della cromatina e di modulazione dell'espressione genica (Dennis *et al.*, 1998), le piante spesso la utilizzano come strategia di adattamento e di risposta a condizioni di stress attraverso regolazioni epigenetiche (Steward *et al.*, 2002). Non a caso, il genoma vegetale ha un livello di metilazione maggiore rispetto a quello degli animali: più del 40% delle citosine sono metilate nelle piante, rispetto all'8% degli animali (Adams e Burdon, 1985). La metilazione e/o demetilazione del DNA possono quindi rappresentare un meccanismo con cui la pianta risponde o si adatta a condizioni di stress ambientale, attraverso la regolazione dell'espressione di geni coinvolti nella difesa e nella tolleranza allo stress (Kovarik *et al.*, 1997).

1.2 La variabilità intravarietale del Sangiovese

La storia del Sangiovese, ad oggi, risulta complicata e di difficile interpretazione, anche se numerose ricerche recenti hanno apportato molti elementi di chiarezza circa l'origine e la differenziazione genetica di questo grande vitigno dell'enologia italiana. Sono senza dubbio tanti i Sangiovesi, diffusi in molti ambienti e territori di Toscana, Romagna, Marche, Umbria, Lazio, Puglia settentrionale e Campania occidentale, chiamati localmente con nomi diversi: Prugnolo gentile, Brunello, Morellino (di Scansano e non di Pitigliano), Sanvicetro (con qualche dubbio), Sangiovetto. Tutti il medesimo vitigno, a conferma dell'origine policlonale della varietà, derivante da antiche propagazioni da seme. Tale ampia variabilità ha consentito la selezione clonale nell'ambito di biotipi anche molto diversi tra loro, tanto che si può parlare piuttosto di una famiglia del Sangiovese.

L'origine dei biotipi è legata alla moltiplicazione vegetativa della vite, che è alla base della sua propagazione. Questo metodo permette il mantenimento di un genotipo con tratti fenotipici di interesse, tuttavia, il verificarsi di mutazioni a livello delle gemme e il fissaggio di queste mutazioni per propagazione asexuata portano alla selezione di più linee clonali della stessa cultivar, aventi tratti genetici e fenotipi leggermente differenti da quelli della pianta madre (Franks et al. 2002) e così alla

formazione di biotipi che meglio si adattano a particolari condizioni di coltivazione. Tali variazioni nei livelli di espressione morfologici e fisiologici prende il nome di variabilità intravarietale.

In passato, la variabilità intravarietale della cultivar Sangiovese è stata ampiamente indagata dal punto di vista genetico tramite i marcatori molecolari di tipo SSR, anche se con scarso successo (D'Onofrio et al. 2009), dovuto sia alla laboriosità della tecnica che ne limita il numero di analisi ed ai costi ad essa associati, sia perché questi marcatori molecolari non sono sottoposti a pressione selettiva. Oggi, la disponibilità di tecniche di sequenziamento ad alta processività (NGS: new generation sequencing) permette di definire lo stato epigenetico di un organismo attraverso lo studio globale dei cambiamenti epigenetici in tutto il genoma (epigenomica), e pertanto di associare questi cambiamenti alle differenze fenotipiche.

1.3 Scopo del progetto

Lo scopo di questo lavoro è quello di identificare i cambiamenti epigenetici alla base della variabilità intravarietale della cultivar Sangiovese. A questo scopo, saranno scelti sei cloni di Sangiovese, presenti nella collezione ampelografica del CREA di Arezzo, con marcate differenze fenotipiche a livello di bacca per i caratteri legati alla qualità dell'uva, provenienti da ambienti ben distinti, come Romagna e Toscana.

2. METODOLOGIA

2.1 Analisi fenotipiche

I cloni di Sangiovese saranno caratterizzati fenotipicamente a livello di bacca per i caratteri legati alla qualità dell'uva, contenuto di antociani, polifenoli e composti aromatici, dall'invaiaitura alla maturazione. I dati saranno raccolti per due anni consecutivi.

2.2 Analisi genetiche

Campioni di bacche a diversi stadi di sviluppo, dall'invaiaitura alla maturazione, saranno prelevati dai cloni di Sangiovese e utilizzati per le analisi epigenetiche. Le analisi saranno effettuate per due anni consecutivi.

2.3 Analisi meteorologiche

Nei due anni di sperimentazione, saranno rilevati i dati relativi ai parametri ambientali, come pioggia e temperature.

2.4 Analisi dei dati

I dati fenotipici e genetici saranno combinati per poter definire i meccanismi epigenetici alla base delle differenze fenotipiche tra i cloni selezionati.

3. DURATA DEL PROGETTO

La durata totale del progetto è di tre anni. Nella Tabella 1 è riportato la suddivisione delle attività previste dal progetto nell'arco temporale dei tre anni.

Tabella 1. Diagramma delle attività del progetto distribuite nell'arco temporale.

Attività		ANNI		
		1	2	3
2.1	Analisi fenotipiche	X	X	
2.2	Analisi genetiche	X	X	
2.3	Analisi meteorologiche	X	X	
2.4	Analisi dei dati	X	X	X

4. BIBLIOGRAFIA

Habu Y, Tetsuji K, Jerzy P. 2001. Epigenetic developmental mechanisms in plants: molecules and targets of plant epigenetic regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* 11:215–220.

HAIG D. 2004. The (Dual) Origin of Epigenetics. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Volume LXIX.

Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. 1996. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8449-8454.

Steward N, Mikako I, Yube Y. 2002. Periodic DNA methylation in Maise Nucleosomes and demethylation by environmental stress. *The Journal of Biological chemistry*, 277: 37741-37746.

Adams RLP, Burdon RH. 1985. *Molecular Biology of Methylation*. Springer-Verlag, New York.

Kovarik A, Koukalova B, Fajkus J, Siroky J. 1997. Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS*, 414:289-92.



**fondazione
banfi**

- Franks T, Botta R, Thomas MR, Franks J. 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 104:192–199.
- D’Onofrio C, De Lorenzis G, Giordani T, Natali L, Cavallini A, Scalabrelli G. 2010. Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. *Tree Genetics & Genomes*, 6:451-466.